

N° d'ordre : 10/2020-C/S.B

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université des Sciences et de la Technologie -Houari Boumediene-
Faculté des Sciences Biologiques



THESE DE DOCTORAT

Présentée pour l'obtention du grade Docteur

En : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie

Par : MOHAMED Sara

**Caractérisation des métabolites actifs produits par
de nouveaux taxons bactériens thermo-halophiles
isolés à partir de sebkhas Algériennes**

Soutenue publiquement le : **26 Février 2020**, devant le jury composé de :

Mme TOUIL C.	(Professeur, USTHB)	Présidente
Mr HACENE H.	(Professeur, USTHB)	Directeur de thèse
Mr ABDERRAHMANI A.	(Professeur, USTHB)	Examineur
Mme BOUANANE A.	(Professeur, USTHB)	Examinatrice
Mr JAOUADI B.	(Maitre de conférences A,CBS)	Examineur
Mr TALHI W.	(Maitre de conférences A, CRAPC)	Examineur

Résumé

La richesse de l'Algérie en biotopes hypersalins est illustrée par le nombre important de sebkhas et de chotts chauds et fortement salins largement distribués sur le territoire national. Ces écosystèmes se présentent comme un champ d'investigations privilégiés pour la recherche de nouvelles souches thermo-halophiles productrices de biomolécules actives. Les recherches menées par l'équipe de microbiologie mettent en évidence régulièrement de nouveaux taxons originaux.

Notre thématique porte essentiellement sur l'étude des activités antimicrobiennes et enzymatiques des souches bactériennes thermohalophiles nouvellement isolées des environnements hypersalins. 3 souches extremophiles aérobies ont été étudiées : *Melghirimyces algeriensis* Nari EX, *Melghirimyces thermohalophilus* Nari 11A et *Melghiribacillus thermohalophilus* Nari 2A.

L'étude entreprise dans le cadre de cette thèse a en effet permis de mettre en évidence deux nouvelles biomolécules: une molécule bioactive antagoniste, à faible poids moléculaire, résistante à des hautes température, halotolérante, acidophile et une chitinase thermostable non-halodépendante, produites par la souche *Melghiribacillus thermohalophilus* Nari 2A, ont été purifiées et caractérisées. Ces molécules potentiellement intéressantes sur le plan biotechnologique font l'objet de ce travail.

Mots clés : biotechnologie, bactérie thermohalophile, molécules extracellulaires, activité antimicrobienne, enzyme thermohalophile, Chitinase.

*Remerciements et
dédicaces*

Remerciements

Je suis très reconnaissante envers tous ceux qui, par leurs Compétences scientifiques et leurs qualités humaines, ont contribué au bon déroulement de cette thèse.

*Je tiens à remercier tout d'abord **Professeur HACENE Hocine**, pour ses valeureux conseils et pour la confiance et la sympathie qu'il m'a accordée en acceptant de m'encadrer et qu'il m'a témoignée au cours de ce projet de doctorat, ainsi de sa bienveillance, sa disponibilité et son soutien qu'il m'a apporté.*

*Je remercie très sincèrement **Professeur TOUIL** de m'avoir honoré et accepté de présider le jury.*

*Il m'est agréable de remercier **Professeur ABDERRAHMANI** de m'avoir prodigué encouragements et conseils, il a toujours manifesté à mon égard gentillesse et marques de sympathie. Je suis très honorée qu'il ait accepté d'examiner ce travail.*

*Je suis très sensible à la présence dans ce jury de **Professeur BOUANANE**.*

C'est un honneur pour moi de vous avoir comme examinatrice.

Qu'elle soit assurée de mes meilleurs remerciements pour la critique de cette thèse.

*Je tiens à remercier particulièrement **Docteur JAOUADI** d'avoir accepté de se déplacer et de m'avoir fait l'honneur d'être examinateur de cette thèse.*

J'éprouve un profond respect pour ces travaux.

*Je suis particulièrement reconnaissante envers **Docteur TALHI**, Le regard critique et avisé que vous avez porté sur mes travaux ne peut que m'encourager à être encore plus perspicace et engagée dans mes recherches.*

Merci de m'avoir suivie sur paillasse et de votre aide indéfectible.

*Il me tient également à cœur d'adresser ma gratitude et mes sincères remerciements à **Docteur BOUMEHIRA** qui m'a suivie de près et m'a dirigée durant toutes les années de cette thèse, merci pour votre savoir-faire, pour votre rigueur et d'avoir toujours été disponible pour moi, chaque fois que j'en avais besoin, Les conseils que vous m'avez prodigués m'ont permis d'avancer efficacement dans mes travaux.*

*Je tiens à remercier **Professeur DJEBBAR** pour son aide. Je suis très admiratif envers vous pour votre simplicité, énergie, optimisme et votre rigueur scientifique (Laboratoire de physiologie végétale).*

*Je remercie aussi toute l'équipe de **CRAPC** « Yassine, Rédha, Abdennour, Lila et Aya » qui m'ont beaucoup aidé et soutenue.*

Mes vifs remerciements vont à mes enseignants qui m'ont apporté savoirs, savoir-faire et méthodes. Vos qualités pédagogiques et humaines sont pour moi un modèle et ont toujours suscité mon admiration.

*Particulièrement **Professeur NATECHE** pour son amabilité, ses conseils, son accueil et surtout sa bonne ambiance, **Dr. BENMALEK** pour ses idées pertinentes, **Dr. HADJ-RABIA**, **Dr. MADDOUR**, **Dr. ABDELLAZIZ Akila**, **Dr. SELLAMA**, **Dr. ADDOU**, **Dr. MEKNACI** et **Dr. ANTRI**.*

*Mes remerciements les plus chaleureux vont à mes collègues et amis, **Dr. QUADRI Ines**, **Dr. BOUACEM Khelifa**, **Dr. HASSANI Ikram**, **Dr. ABDELLAZIZ Lamia**, **Dr. ABBAS Amina**, **Dr. AMEZIANE Meriem**, **Dr. DJOUADI Lydia** et **Dr. MECHRI Sondes**,*

*Au Ingénieurs du laboratoire en particulier **M^{me} AMEUR Assia**, **M^{me} YAICI Lamia** et **M^{me} HAMZAOUI Nora** pour leurs aides et amabilités.*

Je tiens à remercier tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce travail trouvent ici l'expression de nos remerciements les plus chaleureux.

Dédicaces

Louange à Allah le Miséricorde

*Merci à mon dieu de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir,
la force d'y croire,
la patience d'aller jusqu'au bout du rêve et le bonheur.*

A mon cher père,

A ma chère mère,

*Qui n'ont jamais cessé, de formuler des prières à mon égard, de me soutenir et de m'épauler
pour que je puisse atteindre mes objectifs, qui me sont les plus chers au monde.*

Qu'Allah me les garde.

Leurs conseils ne m'ont jamais fait défaut tout au long de mes études.

*Je voudrais à travers ce modeste travail, vous rendre un hommage mérité et vous dire
combien je suis fière de l'éducation que vous m'avez donnée.*

Que Dieu vous protège et vous procure bonne santé et longue vie.

A mon adorable ange « Ryma »,

qui m'as donné la joie et l'espoir à ma vie.

A la jumelle de mon âme « Hayet » ma sœur,

*qui n'a jamais cessé de me soutenir et de m'encourager, je t'adore plus fort que moi-même,
que Dieu te protège.*

A mon cher frère « Rachid » et à ma belle-sœur « Fahima »

*à qui je souhaite un avenir prospère et mes deux nièces « Lyna et Malek » en témoignage de
mon amour et ma profonde admiration.*

En témoignage de tout mon amour,

*je dédie ce travail à mes deux copines « Hayet et Assia »,
qui m'ont toujours encouragé, poussé et motivé dans mes études.*

A toute ma famille, Oncles, Tantes, cousins et cousines.

*A tous mes ami(e)s et collègues, Hanane, Fairouz, Ikram, Fawzi et zineb.
Merci pour votre sincère amitié et des moments agréables que nous avons passés
Ensemble.*

A tous ceux que j'aime et ceux qui m'aiment.

*Listes des tableaux et
des figures*

Liste des tableaux

Tableau I : Les principales caractéristiques des environnements extrêmes	3
Tableau II : Conditions extrêmes les plus fréquemment retrouvées et exemple d'organisme colonisateurs	4
Tableau III : Principaux sebkhas et chotts en Algérie	9
Tableau IV : Les catégories de micro-organismes halophiles	10
Tableau V : Différentes catégories des bactéries halotolérantes	10
Tableau VI : Définition des différentes catégories des thermophiles	17
Tableau VII : La classification des antibiotiques selon la structure chimique	27
Tableau VIII : Résultats des tests d'antagonisme	62
Tableau IX : Résultats du test d'antibiogramme des deux souches d' <i>Archaea</i>	62
Tableau X : Les poids moléculaire des différents types des phtalates	72
Tableau XI : Différents organismes producteurs de phtalates	77
Tableau XII : Activité enzymatique des 3 souches bactériennes	78
Tableau XIII : Poids moléculaire de plusieurs chitinases	81
Tableau XIV : Alignement de la séquence des acides aminés terminaux NH ₂ de la chitinase purifiée Chia-Mt45 de la souche <i>thermohalophilus Melghiribacillus</i> Nari 2A avec d'autres séquences des chitinases de <i>Bacillus</i>	82

Liste des figures

Figure 1 : Environnements hypersalins les plus important au monde	8
Figure 2 : Environnements hypersalins Algériens	8
Figure 3 : L'arbre universel phylogénétique basée sur la petite sous-unité des séquences de gènes ARNr, et la distribution des microorganismes halophiles dans l'arbre	12
Figure 4 : Classement des organismes selon la température optimale de croissance	16
Figure 5 : Procédure d'extraction du produit actif élaboré par Nari 2A	49
Figure 6 : L'appareillage de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) utilisée (Laboratoire du CRAPC)	53
Figure 7 : Aspects microscopiques des trois souches <i>Melghiribacillus thermohalophilus</i> Nari 2A (a), <i>Melghirimycetes algeriensis</i> Nari EX (b) et <i>Melghirimycetes thermohalophilus</i> Nari 11A (c)	60
Figure 8 : Cinétiques de l'évolution de la croissance, et de production de l'activité antiarchéenne de la souche <i>Melghiribacillus thermohalophilus</i> Nari 2A	64
Figure 9 : Résultat de l'antibiographie des deux extraits de la souche <i>Melghiribacillus thermohalophilus</i> Nari 2A	64
Figure 10 : Chromatogramme sous UV à 254 et 365 nm en utilisant le mix des solvants (butanol- acide acétique -eau) (a) et le mix (dichlorométhane + méthanol) (b)	65
Figure 11 : Bioautographie (a) la première plaque CCM (b1) antibiographie de la fraction A (b2) antibiographie de la fraction G (b3) antibiographie de la fraction C (b4) antibiographie de l'extrait brut	67
Figure 12 : Effet de pH sur l'activité de l'extrait actif de la souche Nari 2A	68
Figure 13 : Thermostabilité de l'extrait actif de la souche Nari 2A	68
Figure 14 : Résultats de traitement de l'extrait (A) avec de la proteinase K (B) avec du charbon actif	69
Figure 15 : Spectre UV-Visible de l'extrait actif	70
Figure 16 : Spectre infra-rouge de l'extrait actif déshydraté de la souche Nari 2A	71
Figure 17 : Chromatogramme de l'HPLC analytique de l'extrait brut de la souche Nari 2A (gradient de H ₂ O - méthanol) le débit est de 1 mL minute	71

Figure 18: Spectres de masse de l'extrait actif de la souche Nari 2A	73
Figure19 : Spectre des analyses RMN,H de la fraction active C	74
Figure 20 : Structure chimique de la molécule ATA	75
Figure 21 : Cinétique de production de la chitinase comparée à celle de l'antibiotique ATA avec la croissance de la souche <i>Melghibacillus thermohalophilus</i> Nari 2A	79
Figure 22 : Chromatographie de la chitinase Chia-Mt45 sur le système HPLC en utilisant un Zorbax PSM 300 HPSEC	80
Figure 23 : (a) SDS-PAGE du marqueur protéique purifié de la chitinase Chia-Mt. (b) La zymographie Chitine azurée par coloration de la chitinase purifiée Chia-Mt45	81
Figure 24A : Effet du pH sur l'activité de la chitinase purifiée Chia-Mt45 de la souche <i>Melghiribacillus thermohalophilus</i> Nari2A	84
Figure 24B : Effet de la température sur l'activité de la chitinase ChiA-Mt45 de la souche <i>Melghiribacillus thermohalophilus</i> Nari2A	84
Figure 24C: Effet du NaCl sur l'activité la chitinase ChiA-Mt45	85

Liste des annexes

- Annexe 1** : Composition des milieux de culture.
- Annexe 2** : Masses moléculaires des autres molécules de l'extrait actif ATA détectées par LC-MS.
- Annexe 3** : Les spectres RMN.

Table des matières

Table des matières

Introduction	1
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique	
1.1. Les environnements extrêmes et les microorganismes extrémophiles	3
1.2. La vie microbienne dans les environnements hypersalins	5
1.2.1. Les types d'environnements hypersalés	6
1.2.1.1. Environnements thalassohalins	6
1.2.1.2. Environnements athalassohalins	6
1.2.2. Les écosystèmes hypersalins en Algérie	6
1.2.3. Les microorganismes halophiles et l'arbre phylogénétique de la vie	10
1.2.4. Stratégies d'adaptation à l'halophilie (osmo-adaptation) (stratégie « salt-out » « salt-in »)	12
1.2.5. Adaptation des protéines aux fortes salinités	15
1.3. La vie à haute température	15
1.3.1. Les microorganismes thermophiles	16
1.3.2. Diversité phylogénétique des thermophiles	17
1.3.3. Stratégies d'adaptation des microorganismes aux fortes Températures	17
1.3.3.1. Les membranes cytoplasmiques	18
1.3.3.2. Les acides nucléiques	18
1.3.4. Les protéines	19
1.3.4.1. Stabilité intrinsèque	19
1.3.4.2. Facteurs extrinsèques de la thermostabilité des protéines	20
1.4. Les organismes polyextrémophiles	22
1.5. Stratégies de criblage des souches extrémophiles produisant des molécules bioactives d'intérêt	23
1.5.1. Antibiotiques et classification	25

1.5.2.	Enzymes	42
1.6.	Les bactéries extrêmophiles étudiées	43
1.6.1.	<i>Melghiribacillus thermohalophilus</i>	43
1.6.2.	La famille des <i>Thermoactinomycetaceae</i>	44
1.6.2.1.	L'espèce <i>Melghirimyces algeriensis</i>	45
1.6.2.2.	L'espèce <i>Melghirimyces thermohalophilus</i>	46

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

2.1.	Cultures des souches étudiées	47
2.2.	Criblage des trois souches retenues pour la production de molécules bioactives	47
2.2.1.	Tests d'antagonisme	47
2.2.2.	Etude des produits bioactifs élaborés par les souches actives	48
2.2.2.1.	Etude de la cinétique de croissance et de production	48
2.2.2.2.	Extraction du composé antimicrobien produit par la souche Nari 2A	48
2.2.2.3.	Analyse et Séparation du produit actif par Chromatographie sur couche mince (CCM)	49
2.2.2.4.	Révélation microbiologique par bioautographie	50
2.2.2.5.	Etude de la stabilité de l'extrait actif (ATA)	51
2.2.2.6.	Essai de détermination de la nature chimique de l'extrait actif (ATA)	51
2.2.3.	Caractérisation chimique du produit actif	51
2.2.3.1.	Spectre UV de l'extrait actif	51
2.2.3.2.	Etude par Infra-rouge de produit actif	51
2.2.3.3.	Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	52
2.2.3.4.	Spectrométrie de Masse	52
2.2.3.5.	Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	53

2.3.	Détermination des activités hydrolytique	55
2.3.1.	Tests d'activités enzymatiques	55
2.3.2.	Sélection de la souche à activité chitinase	56
2.3.3.	Étude de la chitinase purifié	56
2.3.4.	Essai d'activité chitinase	56
2.3.4.1.	Production de la chitinase	56
2.3.4.2.	Procédure de purification de l'enzyme	56
2.3.4.3.	Quantification des protéines, électrophorèse et spectrométrie de masse	57
2.3.4.4.	Dégradation Edman	57
2.3.4.5.	Caractérisation biochimique de la chitinase purifiée ChiA-Mt45	57

Chapitre 3 : Résultats et discussion

3.1.	Revivification des souches bactériennes retenues	59
3.2.	Etude du métabolome des trois souches étudiées	60
3.2.1.	Tests d'antagonismes	60
3.2.2.	Caractérisation du produit bioactif élaboré par la souche <i>Melghirimyces thermohalophilus</i> Nari 2A	63
3.2.2.1.	Essais de caractérisation du composé anti-archaea	63
3.2.2.1.1.	Etude des cinétiques de croissance et production de la molécule active	63
3.2.2.1.2.	Extraction du composé antimicrobien produit par la souche Nari 2A	64
3.2.2.1.3.	Etude chromatographique sur couche mince de l'extrait actif	65
3.2.2.1.4.	Révélation microbiologique par bioautographie	66
3.2.2.1.5.	Etude de la stabilité de l'extrait ATA	68
3.2.2.1.6.	Essai de détermination de la nature chimique de l'extrait actif (ATA)	69
3.2.2.2.	Caractérisation chimique de la Molécule bioactive	70

3.2.2.2.1.	Spectre UV de l'extrait actif	70
3.2.2.2.2.	Etude par Infra-rouge de l'extrait actif (ATA)	70
3.2.2.2.3.	Analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	71
3.2.2.2.4.	Détermination du poids moléculaire de la molécule active ATA71	72
3.2.2.2.5.	Détermination de la structure de l'ATA par RMN	74
3.2.2.2.6.	Détermination de la structure de la molécule active ATA	74
3.3.	Criblage des activités hydrolytiques des 3 souches bactériennes	78
3.3.1.	Tests d'activités enzymatiques	78
3.3.2.	Sélection de la souche à activité chitinase	78
3.3.3.	Les mesures cinétiques de la chitinase purifiée	79
3.3.3.1.	Cinétique de croissance bactérienne et production de la chitinase	79
3.3.3.2.	Procédure de purification de l'enzyme	80
3.3.3.3.	Détermination de poids moléculaire et analyse zymographique de ChiA-Mt45	81
3.3.3.4.	Ordre des acides aminés NH ₂ -terminaux de ChiA-Mt45	82
3.3.3.5.	Caractérisation biochimique de la ChiA-Mt45 purifiée	83
Conclusion et perspectives		86
Références Bibliographiques		88
Annexes		

Introduction

En dépit de leur importance scientifique et économique, notre connaissance des microorganismes reste limitée. C'est particulièrement le cas des habitats fortement salins et souvent chauds que l'on qualifie d'extrêmes, où prospèrent des microorganismes singuliers appelés extrémophiles. L'étude de ces organismes atypiques, au cours des 30 dernières années, a eu de profondes répercussions sur les différentes branches des sciences de la vie. Leurs étonnantes capacités de résistances à des conditions hostiles et inhospitalières, fruits d'adaptations fonctionnelles dépendantes de molécules spécifiques et de voies métaboliques atypiques, en fait d'eux une source très convoitée en molécules aux propriétés inédites. Par ailleurs, ils peuvent être employés comme d'excellents modèles pour la compréhension de nouvelles physiologies et des limites de la stabilité des molécules biologiques, et constituent de ce fait, un réservoir en molécules stables et efficaces pour différents domaines.

D'autre part, la mise au point de métabolites bioactifs d'origine microbienne, durant les années 1980, a progressé de manière substantielle grâce aux progrès technologiques. Malheureusement, parmi les métabolites découverts, nombreux sont des analogues de molécules déjà connues, des composés faiblement actifs ou encore des composés toxiques. La découverte de nouvelles familles chimiques innovantes se raréfie, alors qu'entre-temps, les besoins pour combattre les infections dues à des germes multi-résistants sont en constante augmentation. Face à cette situation critique, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a tiré la sonnette d'alarme en 2017 en déclarant que l'augmentation des multirésistances développées par des bactéries que l'on désigne par l'acronyme ESKAPE (*E.coli*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Enterococcus*) et le faible nombre de nouveaux antibiotiques en développement dans le monde conduira inévitablement à une grave impasse thérapeutique dans les toutes prochaines décennies.

Les causes des résistances microbiennes aux antibiotiques sont nombreuses. On peut citer par exemple, l'utilisation irraisonnée de ces molécules dans les élevages en tant que facteurs de croissance, les prescriptions médicales souvent inutiles, la pollution de l'environnement général qui favorise l'émergence de nouvelles résistances. De nombreux rapports prédisent que d'ici 2050, les bactéries multirésistantes pourrait causer au moins 10 millions de morts par an. L'Algérie ne sera pas épargnée par ce fléau compte tenu des mauvaises pratiques en milieu d'antibiothérapie et de la pollution de l'environnement. L'une des stratégies recommandées par l'OMS est la recherche-développement de nouveaux composés efficaces et échappant aux résistances microbiennes.

Le moyen le plus utilisé pour la recherche de nouvelles molécules actives consiste à isoler ces molécules, notamment à partir de microorganismes. La découverte de nouvelles souches microbiennes extrémophiles peu étudiées jusqu'à présent peut conduire à l'isolement de nouvelles molécules bioactives, en utilisant les bactéries du groupe ESKAPE comme germes-cibles.

Pour contribuer à cet effort, un groupe de recherche dont nous faisons partie a été constitué au sein de l'équipe de Microbiologie et du laboratoire de Biologie cellulaire et moléculaire de la FSB. Il a pour objectif de cibler des microorganismes extrémophiles, encore très peu explorés, pour les cribler en vue d'aboutir à des molécules antibiotiques ou enzymatiques originales.

Comparativement au domaine de la recherche en antibiotiques, celui concernant la biocatalyse connaît depuis quelques années un essor considérable. L'ampleur des recherches est due en

particulier aux extrêmozymes (enzymes produites par des extrémophiles) qui permettent aux bio-industries de faire face aux problèmes d'instabilité auxquelles se heurtent les enzymes dans des conditions de leur utilisation, notamment les hautes températures et fortes salinités.

Notre travail de thèse s'intègre dans cette problématique. Il porte sur l'étude du métabolome de microorganismes thermo-halophiles isolés de sebkhas du Sahara par Addou (2013) et complète notamment les travaux de Hacène *et al.*, 2004, Addou *et al.*, 2015, Bouanane-Darenfed *et al.*, 2016, Boumehira *et al.*, 2016, Quadri *et al.*, 2016, Bouacem *et al.*, 2018 et Menasria *et al.*, 2019.

Pour mener ce travail, nous avons adopté les parties suivantes :

Une introduction suivie d'une partie bibliographique en rapport avec les environnements extrêmes et les microorganismes extrémophiles en mettant en exergue les thermohalophiles, ainsi que le criblage, la diversité métabolique et biotechnologique de ces derniers.

Une partie dévolue au matériel utilisé et aux méthodes employées, avec des détails au niveau des annexes.

Une partie dédiée aux résultats et discussions portant sur l'étude du métabolome des trois nouvelles souches étudiées, la purification et la caractérisation des produits bioactifs élaborés par l'une entre-elles (*Melghirimyces thermohalophilus* Nari 2A), par des techniques biologiques, chimiques et spectroscopiques.

Chapitre 1 :

Synthèse bibliographique

1.1. Les environnements extrêmes et les microorganismes extrémophiles

Un environnement est qualifié d'extrême lorsque ses paramètres physico-chimiques sont hostiles à la vie et conduisent à une spécialisation et/ou une diminution de la biodiversité existante : pH inférieur à 5 ou supérieur à 9, pression atmosphérique supérieure à 20 MPa, température supérieure à 50°C, salinités supérieures à 3-4% (Gregoire *et al.*, 2009). D'autres types de facteurs extrêmes peuvent aussi être considérés comme la disponibilité de l'eau, des niveaux élevés de radioactivité, de métaux lourds et de composés toxiques (Satyanarayana *et al.*, 2005).

Il existe différents groupes de milieux extrêmes. Tous sont répartis en fonction des paramètres physiques (pression, température...), ou chimiques (acidité, salinité ...). Au moins, sept principaux biotopes naturels peuvent être reconnus quand un des trois facteurs (température, pH et salinité) est dans l'extrême (Kristjansson et Hreggvidsson, 1995) (tableau I). Les habitats extrêmes les mieux étudiés sont ceux qui sont caractérisés par une forte température, pH élevé ou faible et une forte salinité.

Tableau I : Les principales caractéristiques des environnements extrêmes (Kristjansson et Hreggvidsson, 1995)

Habitat	Température (C°)	pH	Salinité (g/l)
Eau douce alcaline de sources chaudes	>60	>7	<6
Champs acides sulfatares.	>60	<3	<6
Les boues anaérobies et le sol géothermique	>60	5 à 7	<6
Zones acides riches en soufre et en pyrite	<50	<3	<6
Milieux alcalins carbonatés	<50	>8	<6
Les lacs de sodes	<50	>9	>10
Les lacs hypersalins	<50	5 à 8	>10

Les cheminées hydrothermales, les sources chaudes, les marais salants, les lacs de soude alcalins, les solfatares sont des environnements extrêmes rencontrés dans la nature. A ces écosystèmes, s'ajoutent des environnements extrêmes artificiels comme les installations domestiques ou industrielles d'eaux chaudes, les aliments séchés ou fermentés en présence de fortes concentrations en sels, les saumures artificielles ...etc.

Ces environnements sont colonisés par de nombreux groupes de microorganismes qui peuvent croître et se reproduire de façon optimale lorsqu'une ou plusieurs conditions de stress se situent dans la plage de l'extrême, que l'on qualifié d'extrémophiles (Mac Elroy, 1974 ; Albers *et al.*, 2001). Parmi les microorganismes extrémophiles strictes, on distingue ceux qui requièrent des conditions extrêmes pour leur survie, leur développement et leur multiplication, et les extrémophiles modérés ou extrémotolérants, qui tolèrent des facteurs extrêmes mais peuvent croître également dans des conditions plus modérées. Le terme extrémotrophe est employé pour désigner les microorganismes capables de tolérer des conditions extrêmes, sans qu'elles soient pour autant optimales pour leur croissance (Mueller *et al.*, 2005). Une liste non exhaustive des conditions extrêmes les plus fréquemment retrouvées est dressée dans le tableau II.

Tableau II : Conditions extrêmes les plus fréquemment retrouvées et exemples d'organismes colonisateurs (Hacène, 2016).

Paramètre Environnemental	Condition Optimale	Groupe de microorganismes	
		Groupe	Exemple
Température	Supérieure à 80 °C	Hyperthermophiles	<i>Sulfolobus, Pyrococcus,</i> <i>Pyrolobus, Methanopyrus</i>
	Entre 50 et 80 °C		Thermophiles <i>Thermoplasma acidophilum</i> <i>Bacillus stearothermophilus</i>
	De 5 °C à 25 °C	Psychrotrophes <i>Yersinia enterocolitica</i>	
	Inférieur à 15 °C	Psychrophiles <i>Micrococcus psychrophilus</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i>	
pH	pH < 2	Acidophiles <i>Picrophilus oshimae</i> <i>Picrophilus torridus</i>	
	pH > 10	Alcalophiles <i>Bacillus alcalophilus</i> <i>Natronococcus</i>	
Salinité	2,5 M à 5 M NaCl	Halophiles	<i>Halobacterium</i> <i>Natrialba</i> <i>Halofera</i>
Pression Hydrostatique	0,1 MPa ou plus	Piezotolérant <i>Dermococcus abyssi</i>	
	> 0,1 MPa	Piezophiles <i>Marinitoga piezophila</i>	
Éléments externes	Fortes concentrations en métaux lourds et radiations ionisantes	Métalophiles <i>Alcaligenes eutrophus</i> <i>Cupriavidus metallidurans</i>	
		Radiophiles <i>Deinococcus radiodurans</i> <i>Deinococcus radiophilus</i> <i>Rubrobacter radiotolerans</i>	

La diversité des espèces vivantes dans les écosystèmes extrêmes est assez restreinte et de nombreux groupes taxonomiques ne peuvent y survivre. Ainsi, dans les lacs salins et chauds, et dans les sources hydrothermales, la présence des plantes supérieures n'a jamais été rapportée. Dans les écosystèmes extrêmement chauds, seuls les organismes procaryotes ont été isolés (Jaenicke et Sterner, 2006).

Les microbiologistes utilisent le terme « extrémophile » pour décrire les microorganismes qui vivent normalement dans des conditions extrêmes que d'autres formes de vie ne peuvent supporter. Par contre, les extrémodures sont les microorganismes qui peuvent survivre, mais ne se multiplient pas dans ces environnements. (Wainwright, 2003)

La majorité des extrémophiles sont représentés par les microorganismes. Ils appartiennent aux trois domaines de la vie : *Archaea*, *Bacteria* et *Eucarya*. Leur diversité phylogénétique est très complexe à cerner. Certains ordres ou genres microbiens ne renferment que des extrémophiles, tandis que d'autres regroupent des taxons extrémophiles et d'autres non extrémophiles.

Les extrémophiles adaptées à la même condition extrême peuvent aussi être dispersés dans l'arbre phylogénétique de la vie. Il existe également des groupes d'organismes appartenant à la même famille phylogénétique qui se sont adaptées à des conditions extrêmes très diverses

(Rampelotto, 2013). Le caractère extrémophile n'a donc pas de valeur phylogénétique. En effet, aucune souche ne peut être affiliée à un taxon sur la base exclusive de son caractère extrémophile, même s'il existe une certaine corrélation entre les adaptations environnementales d'un microorganisme et sa position phylogénétique (António, 2002).

Une riche diversité physiologique est retrouvée chez les microorganismes de l'extrême. Ils peuvent être aérobies, anaérobies, chimioorganotrophes, photoautotrophes, chimiolithotrophes et photohétérotrophes (Jiang *et al.*, 2006).

Les premiers microorganismes extrémophiles isolés font partie du groupe des halophiles (du grec *halos* : sel, *phile*: aimer), découverts dans un environnement que l'on croyait dépourvu de vie, d'où le nom de mer morte. Ils vivent dans des concentrations en sels proches de la saturation. Toutefois, les chercheurs ne se sont pas intéressés à ces microorganismes qu'après la découverte de Woese et Fox (1987) du 3ème domaine du vivant, celui des *Archaea* auquel ils ont été rattachés. Ces organismes « du sel » ont été, par la suite, isolés de différents autres environnements hypersalins.

1.2. La vie microbienne dans les environnements hypersalins

Le sel est utilisé depuis les temps anciens pour conserver les aliments, un procédé appelé salage ou salaison, car on pensait qu'en forte concentration, il était létal pour toutes les cellules vivantes (Lentzen *et al.*, 2006). Pour cette raison, les milieux caractérisés par de fortes salinités sont restés longtemps considérés hostiles à toute forme de vie. Cette idée est révolue depuis la découverte d'une grande diversité de microorganismes dans les écosystèmes hypersalins.

La salinité n'est pas le seul facteur environnemental qui peut limiter la biodiversité. Elle peut être associée à d'autres comme la faible concentration en oxygène, la température élevée ou faible, le pH qui est quelquefois très alcalin. D'autres facteurs peuvent influencer la biodiversité de ces environnements comme la pression, la faible disponibilité en éléments nutritifs, les radiations, la présence de métaux lourds et d'autres composés toxiques (Ventosa, 2006; Rodriguez-Valera, 1988).

Certains considèrent qu'un environnement est hypersalin lorsque la concentration en sels est supérieure à celle de l'eau de mer, qui est d'environ 35 g/L (DasSarma et DasSarma, 2012). D'autres, appliquent des limites inférieures arbitraires qui vont de 30 à 120 g/l en argumentant que dans les systèmes hypersalins, les fortes concentrations en sels conduisent à une réduction de la diversité des espèces (Post *et al.*, 1983; Por, 1980). D'autres encore, établissent la limite entre 100 et 120 g/l (Litchfield et Gillevet, 2002). En dessous de 100g/l, ce sont divers facteurs environnementaux connue comme la composition ionique, le pH etc. qui déterminent la diversité des espèces alors qu'au-dessus de 120g/l la salinité devient le facteur primordial (Ollivier *et al.*, 1994).

1.2.1. Les types d'environnements hypersalés

Les environnements hypersalins sont retrouvés sur tous les continents. Il existe deux types de milieux hypersalins, les environnements thalassohalins et athalassohalins, qui diffèrent selon leur composition ionique et sont colonisés par des organismes « halophiles ».

1.2.1.1. Environnements thalassohalins

Les environnements thalassohalins ont une composition ionique reflétant celle de l'eau de mer, avec des proportions en cations et en anions similaires et une prédominance du NaCl. Les eaux sont considérées comme salines lorsque leur concentration en sels solubles dépasse 0,3% (p/v) et hyper-salines lorsqu'elles présentent des concentrations salines supérieures à celle de l'eau de mer 3,3% (p/v) (Edgerton et Brimblecome, 1981). Le pH des environnements thalassohalins est légèrement alcalin (Oren, 2006). Les environnements thalassohalins peuvent être d'origine anthropique, comme les marais salants, ou naturelle, comme les sebkhas, les lacs intérieurs ou les lagons.

1.2.1.2. Environnements athalassohalins

Les environnements athalassohalins ont une composition ionique différente de celle de l'eau de mer et dérivent de sources d'eau douce. L'environnement hypersalin le plus étudié au monde est d'origine athalassohaline. Il s'agit de la mer morte : un lac fermé partagé entre la Jordanie et la Palestine où la concentration saline est de 340 g.L⁻¹ (Figure 1). Le pH de la mer Morte est relativement bas, de l'ordre de 5,8-6 (Oren, 2006). Il existe également des environnements athalassohalins alcalins : les lacs de soude. Ces lacs sont riches en ions carbonates et bicarbonates, responsables de l'alcalinité du lac, et qui représentent une partie importante des anions totaux, en plus du chlorure et du sulfate.

1.2.2. Les écosystèmes hypersalins d'Algérie

Les environnements salins ont une très grande extension dans les pays du Maghreb. La cause réside dans les conditions arides ou semi-arides d'une grande partie de cette région où les précipitations limitées, les possibilités d'évaporation sont considérables et à la présence fréquente de dépôts géologiques salifères. En Algérie, on dénombre environ 3,2 millions d'hectares avec des degrés de salinité variable. Le phénomène de salinisation se localise principalement dans les régions steppiques et sahariennes où le processus de salinisation est plus marqué du fait des températures élevées durant presque toute l'année, du manque d'exutoire naturel et de l'absence de drainage efficient (Halitim *et al.*, 1988).

Les environnements hypersalins en Algérie sont représentés essentiellement par les sebkhas et les chotts, répandus notamment dans les zones arides et semi-arides. 22 sebkhas et 43 chotts sont inscrits sur la liste RAMSAR des zones humides d'importance internationale. Le terme sebkha (mot arabe) désigne des plaines salines soumises à des inondations périodiques dans des dépressions et qui ne sont occupées que temporairement par de l'eau. Une forte évaporation conduit à la formation caractéristique d'une croûte d'évaporites qui tapisse le fond de ces dépressions. Dans le tableau III nous répertorions les plus importantes sebkhas et chotts connus.

La différence entre les sebkhas et les chotts réside dans leur mode d'alimentation. Les sebkhas sont sous la dépendance d'apport des eaux de crues et les Chotts sont alimentés respectivement par les apports de ruissellement et par les nappes artésiennes profondes arrivant jusqu'en surface par des sources et/ou des suintements (Pouget, 1980).

Les Chotts seraient de véritables « machines évaporatoires » (Coque, 1962). En période pluvieuse, une couche d'eau de quelques centimètres, saturée en sel recouvre la surface, laissant après évaporation des dépôts de sels, parfois exploitables comme c'est le cas de la société ENASEL qui extrait le sel de El Meghaier (chott Melghir) et le commercialise à l'échelle nationale. Ces sources hypersalines existent depuis des millénaires et le commerce du sel est un élément indispensable à la survie des populations locales qui l'échangeait ou le troquait contre des denrées alimentaires. Après de fortes pluies, les Chotts peuvent constituer de véritables lacs de plusieurs centimètres de profondeur, mais quelques mois après, l'évaporation très forte assèche complètement la surface. Le vent balayant cette surface desséchée et dénudée peut, dans certaines conditions, entraîner des particules argileuses et des cristaux de sels (Chlorure de sodium, gypse plus connu sous le nom de roses des sables) qui s'accumulent en bordure de la dépression (Pouget, 1980). Les chotts Algériens les plus connus sont : Chott Echergui, Chott Gharbi, Chott Melghir, Chott Hodna, etc.



Figure 1 : Environnements hypersalins les plus important au monde; **A** : la mer morte (moyen orient) ; **B** : Great Salt Lake (Utah, Etat unis); **C**: Marais salant (Espagne) ; **D** : Marais salants de la baie de San Francisco (Sites Web 1, 2, 3).



Figure 2 : Environnements hypersalins Algériens ; **A** : Chott Melghir ; **B** : Sebkhha El Golea (Site web 4,5)

Tableau III : Principaux sebkhas et chotts d'Algérie (Addou, 2013).

Nom de la zone humide	Superficie (ha)	Type de zone humide	Wilaya
Chott Melghir	551.500	Chott et Sekha salins continentaux	El Oued et Biskra
Chott Echergui	855.500	Chott salin, continental saumâtre et d'eau douce. Forêt humide de Tamarix	Saïda, Nâama, El Bayadh
Chott El Hodna	362.000	Chott et sebkha continentaux, sources d'eau douce	M'Sila et Batna
Chott Merouane et Oued Khrouf	337.700	Chott continental alimenté d'eau de drainage	El Oued et Biskra
Marais de la Macta	44.500	Marais côtier et Oued	Mascara, Oran et Mostaganem
Sebkha d'Oran	56.870	Sebkha ou lac salin continental	Oran
Zehrez Chergui	50.985	Chott et sebkha continentaux	Djelfa
Zehrez Gharbi	52.500	Chott et sebkha continentaux	
Sebkhet El Hamiet	2 509	Lac salin saisonnier	Sétif
Sebkhet Bazer	4 379	Lac salin permanent	
Chott El BeïdhaHamam Essoukhna	12223	Lac salin saisonnier, prairie humide	
Chott Tinsilt	2 154	Chott et sebkha	Oum el Bouaghi
Les Salines d'Arzew	5 778	Lac salin saisonnier	Oran
Le Lac Mellah	2 257	Lac d'eau saumâtre	El Tarf
Sebkhet El Meleh (Lac d'El Goléa)	18 947	Lac salin	Ghardaïa
Chott Oum Raneb	7 155	Lac salin	Ouargla
Chott Sidi Slimane	616	Lac saumâtre permanent	
Chott Aïn El Beïda	6 853	Lac salin	
Sebkha de Tindouf	3 615	répression saline	Tindouf

1.2.3. Les microorganismes halophiles et l'arbre phylogénétique de la vie

Les microorganismes halophiles se développent dans des environnements ayant des concentrations très élevées en sel. Elles sont capables d'équilibrer la pression osmotique du milieu et de résister à l'effet de la dénaturation provoqué par le sel (Grant *et al.*, 2001).

Litchfield (1998) classe les organismes halophiles en deux catégories : (1) les *Archaea*, capables de se développer à des concentrations en sel atteignant les 34 % (w/v), et dont la croissance est impossible à des concentrations inférieures à 10-12 % (w/v). Ces organismes sont considérés comme halophiles obligatoires. La deuxième catégorie regroupe les bactéries et les algues halotolérantes.

Différentes autres classifications ont été proposées pour distinguer les organismes en fonction de leur comportement vis-à-vis du sel (Vreeland, 1987; Ramos-Cormenzana, 1989), mais la plus couramment utilisée est celle de Kushner (1978) (Tableau IV). Celle-ci tient compte de différents degrés de dépendance au sel.

Tableau IV : Les catégories de micro-organismes halophiles (Kushner, 1978).

Catégorie	NaCl(M)		NaCl (g/l)	
	Gamme	Optimum	Gamme	Optimum
Non halophiles	0 - 1	<2	0 - 60	<10
Faiblement halophiles	0,2 - 2,0	0,2 - 0,5	10 - 115	10 - 30
Halophiles modérés	0,4 - 3,5	0,5 - 2,0	25 - 200	30 - 115
Halophiles extrêmes	2,0 - 5,2	>3,0	115 - 300	>175
Halotolérants	0 - >1,0	<0,2	0 - >60	<10
Haloversatiles	0 - >3,0	0,2 - 0,5	0 - >175	10 - 30

De nombreuses définitions ont été proposées dans la littérature pour qualifier les termes halotolérant et halophile. Leur distinction a été faite en se basant sur les seuils de concentrations de sels requises ou tolérées. Le terme « halophile » désigne les bactéries nécessitant obligatoirement la présence de sel (NaCl) dans le milieu pour leur croissance. En revanche, le terme « halotolérant » signifie que les bactéries tolèrent différentes concentrations en sel durant leur croissance et peuvent même croître en absence de sel.

Les bactéries halotolérantes ont une croissance meilleure dans les milieux qui contiennent une concentration de sel <0.2 M (~1%) mais peuvent aussi tolérer des teneurs élevées (Yoon *et al.*, 2003). Parmi les organismes halotolérants, Tiquila *et al.* (2006) reconnaissent trois catégories différentes (tableau V).

Tableau V : Différentes catégories des bactéries halotolérantes (Tiquila *et al.*, 2006).

Catégories	Optimum de croissance (NaCl)
Légèrement halotolérantes	6 à 8%
Modérément halotolérantes	18 à 20 %
Halotolérantes extrêmes	20 à 30%.

L'examen de la répartition des microorganismes halophiles dans l'arbre phylogénétique de la vie basé sur les séquences de petites sous-unités d'ARNr, montre que les microorganismes halophiles se situent dans les trois domaines du vivant : *Archaea*, *Bacteria* et *Eukarya*. Dans chacun de ces domaines, on rencontre des représentants halophiles qui peuvent croître jusqu'à des concentrations saturantes en sel (NaCl) (Oren, 2002b ; 2008 ; Siglioccolo *et al.*, 2011). La figure 3 représente la distribution des microorganismes halophiles dans l'arbre phylogénétique de la vie.

Suite au développement des techniques de biologie moléculaire appliquées à la systématique bactérienne, de nouvelles espèces bactériennes halophiles et halotolérantes ont été isolées dans divers environnements salins et hypersalins. D'une manière générale, on note que la plupart des halophiles intégrés dans le domaine *Bacteria* sont des halophiles modérés plutôt que des halophiles extrêmes (Oren, 2002b).

Aucune corrélation n'est évidente entre la place d'un organisme au sein de l'arbre universel de la vie et de sa capacité à croître à des concentrations élevées en sel. De nombreux microorganismes halophiles sont le plus souvent insérés parmi les organismes non-halophiles. Ainsi, dans le domaine *Archaea*, sont incluses des familles halophiles méthanogènes comme les *Methanospirillaceae* et *Methanosarcinaceae*. Certains d'entre-elles peuvent croître à des concentrations de sel saturantes, mais sont phylogénétiquement très liés à des méthanogènes non halophiles (Seckbach et Oren, 2004 ; Ratnakar *et al.*, 2013).

Les *Archaea* sont très diversifiées et englobent plusieurs représentants halophiles à savoir les représentants de la classe *Halobacteria* (nommée *Archaea* halophiles extrêmes) et des *Archaea* halophiles méthanogènes (Khallef *et al.*, 2018).

Les *Archaea* halophiles extrêmes sont un groupe diversifié des Euryarchaeota (Falb *et al.*, 2008). La classe III est composée d'une seule famille, *Halobacteriaceae* (Grant *et al.*, 2001). Plus récemment, Gupta *et al.* (2015) ont proposé deux nouveaux ordres au sein de la classe, les *Natrialbales* et *Haloferacales*, contenant les nouvelles familles *Natrialbaceae* et *Haloferacaceae*.

Le domaine des *Bacteria* contient de nombreux types de microorganismes halophiles et halotolérantes, réparties sur un grand nombre de sous-groupes phylogénétiques. On les retrouve dans les Phyla *Cyanobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Spirochaetes*, *Bacteroidetes* et *Actinobacteria*, (Oren, 2008). Parmi, le Phylum *Actinobacteria*, plusieurs organismes halophiles ont été isolés à partir d'eau de mer, de sols et d'habitats salins et alcalins. Néanmoins la plupart des Actinobactéries halophiles ont été isolées à partir des sols salins. Aussi, le nombre des Actinobactéries tolérant le sel et résistant à la sécheresse ont été isolées à partir des zones arides algériennes, de la péninsule arabe, d'Iranien, d'Asie centrale et d'Australie (Hacène *et al.*, 2004 et Al-Mueini *et al.*, 2007).

Au sein du phylum des *Actinobacteria*, les espèces halophiles sont classées principalement dans les ordres *Streptosporangiales*, *Streptomycetales*, *Pseudonocardiales*, *Actinopolysporales* et *Micrococcales*. Cependant, la cohérence phylogénétique et physiologique ne pourrait être établie que dans les genres *Nesterenkonia*, *Nocardiopsis*, *Salinispora* et *Streptomonospora* qui regroupent presque entièrement des espèces halophiles ou halotolérantes.

La notion de l'activité de l'eau (a_w) permet d'exprimer quantitativement le degré de la disponibilité de l'eau, et correspond au rapport de la pression de vapeur de la solution à celle de l'eau pure à la même température (Brock, 1994). Plus l'activité de l'eau diminue, plus la quantité de l'eau nécessaire pour la solubilisation des nutriments, les processus métaboliques et l'hydratation des protéines et des acides nucléiques diminue (Litchfield, 1998). D'une manière générale, la croissance bactérienne est inhibée à une valeur de l'activité de l'eau inférieure à 0,72 parce que les membranes biologiques sont perméables à l'eau, les cellules ne peuvent maintenir l'activité de l'eau de leur cytoplasme plus élevée que celui de la saumure environnante, car cela conduirait à une perte rapide de l'eau à l'environnement (Brock, 1994). Par conséquent, tous les microorganismes halophiles exposés à une faible activité de l'eau, qui constitue une caractéristique principale des écosystèmes salins partagent une propriété fondamentale: leur cytoplasme doit être au moins iso-osmotique avec leur milieu environnant (Galinski, 1995 ; Oren, 1999 ; Siglioccolo *et al.*, 2011). Les *Archaea* halophiles sont même capables de se développer à une activité de l'eau inférieure à 0,72 (Litchfield, 1998). Outre la faible activité de l'eau, les milieux salins sont caractérisés par une forte pression osmotique. La capacité des organismes à s'adapter aux fluctuations de l'osmolarité est indispensable à la survie de la cellule dans un environnement donné (Csonka, 1989). Pour cela, les microorganismes emploient différentes stratégies pour faire face à des concentrations élevées en sel dans leur environnement. Ainsi, les halophiles ont développé des mécanismes de base différents pour répondre au stress osmotique (Kanekar *et al.*, 2012).

Une grande diversité des mécanismes de réponse au stress osmotique est développée par les microorganismes halophiles et halotolérantes qui résistent à la grande pression osmotique exercée par leur milieu fortement salin (Kanekar *et al.*, 2012). Les moyens d'équilibre osmotique diffèrent considérablement entre les différents groupes des halophiles (Rainey et Oren 2006). En règle générale, les microorganismes développent une ou deux stratégies principales: l'accumulation d'ions inorganiques non toxiques, par les *Archaea* halophiles (et certaines bactéries) « stratégie Salt-in » ou l'accumulation de molécules organiques compatibles avec leurs activités métaboliques internes (communément appelés "solutés compatibles") de nature chimique différente, développé par des bactéries et des eucaryotes halophiles modérées et halotolérantes (Ventosa et Arahal, 2002a).

- **La Stratégie « Salt-in »**

La composition ionique du cytoplasme diffère généralement fortement de celle du milieu, qui, dans la plupart des cas, contient du NaCl en tant que sel principal. L'environnement intracellulaire est caractérisé par la présence de concentrations molaires de KCl (Oren, 1999 Oren *et al.*, 2002 et Grant, 2004).

L'ajustement thermodynamique de la cellule peut être obtenu en augmentant la concentration en sel dans le cytoplasme (Kanekar *et al.*, 2012). La stratégie « Salt-in » est basée sur l'accumulation d'ions inorganiques, principalement du K^+ et Cl^- à des concentrations élevées dans le cytoplasme, jusqu'à ce que s'équilibre, la pression osmotique à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule. Les membranes de ces microorganismes sont doués d'un grand nombre d'antiports Na^+/H^+ , pour créer un gradient de protons et l'exclusion des ions Na^+ à partir du cytoplasme (Oren, 2001, Karan *et al.*, 2012).

Cette stratégie est utilisée par de nombreux *Archaea* halophiles de l'ordre des *Halobacteriales* et des représentants des bactéries (Oren *et al.*, 2013 et Gunde *et al.*, 2018).

- **Stratégie d'accumulation des solutés organiques**

Le mécanisme des osmolytes organiques est employée par la majeure partie des bactéries halophiles et halotolérantes, des plantes halophytes et également par des *Archaea* (Li *et al.*, 2010). En réponse à un stress osmotique, ces dernières excluent le sel du cytoplasme et cumulent de grandes concentrations de molécules organiques de faible poids moléculaire appelées osmolytes ou solutés compatibles (Brown, 1978, Empadinhas et Da Costa, 2008).

Le nom de solutés compatibles leur est attribué en raison de leur compatibilité avec la machinerie cellulaire car, ils n'interfèrent pas avec les fonctions cellulaires, même à fortes concentrations (Brown, 1976). Ils jouent un rôle important dans le maintien de l'équilibre cellulaire chez tous les organismes vivants allant des bactéries jusqu'à l'homme (Lentzen et Schwartz, 2006). Ils préviennent la dénaturation, l'inhibition et l'inactivation des enzymes et des molécules dans les milieux à faible activité de l'eau, protégeant ainsi les cellules des effets délétères du sel, en fortes concentrations (Setati, 2010). La quantité d'osmolytes accumulés est fonction des fluctuations d'osmolarité et varie dans les cellules de quelques millimolaires (Lentzen *et al.*, 2006). La concentration des osmolytes dépend également de l'organisme, de la disponibilité des osmolytes dans le milieu, du type, du degré, de la sévérité et de la durée du stress osmotique (Lentzen *et al.*, 2006).

Les solutés compatibles à poids moléculaire bas, non ionique hautement solubles dans l'eau, ne perturbent pas le métabolisme même à des concentrations cytoplasmiques élevées. Elles sont définies comme des solutés qui, à des concentrations élevées, permettent aux enzymes de fonctionner efficacement. Les enzymes "classiques" semblent bien fonctionner, en présence de concentrations molaires de ces solutés. Une grande diversité existe dans les types de solutés rencontrés et la liste des solutés osmotiques organiques connus ne cesse de croître (Oren, 1999). Elles se répartissent en trois catégories chimiques générales : les solutés zwitterion, les solutés non chargés et les solutés anioniques. Ces osmolytes ont aussi d'autres rôles dans les cellules, notamment la stabilisation des structures macromoléculaires (Kanekar *et al.*, 2012). Les concentrations intracellulaires de solutés osmotiques organiques sont réglementées en fonction de la salinité du milieu, et la stratégie d'utilisation de solutés compatibles organiques permet ainsi un degré élevé d'adaptabilité des cellules à l'évolution de la concentration en sel de leur environnement.

L'accumulation des osmolytes chez les microorganismes peut s'effectuer de deux manières, soit par synthèse de novo ou par importation à partir du milieu extérieur. Dans les environnements naturels, les microorganismes peuvent libérer les solutés compatibles par le processus d'efflux ou suite à la mort cellulaire.

Les solutés deviennent ainsi disponibles à d'autres microorganismes pourvus de systèmes de transport adéquats et les utilisent dans l'osmoadaptation ou comme source de carbone (Empadinhas et Da Costa, 2008). La nature des osmolytes est très variable et appartient à différentes classes de composés : polyols, acides aminés, proline...

Les osmolytes jouent un rôle important dans la stabilité des molécules biologiques telles que les protéines globulaires et membranaires, et les acides nucléiques (Lentzen et Schwarz, 2006). D'une manière générale, ils exercent un effet physique sur les propriétés de l'eau, conservent l'équilibre de la pression osmotique et stabilisent les macromolécules en maintenant un niveau élevé d'hydratation de leur surface (Lentzen et Schwartz, 2006, Arakawa et Timasheff, 1985).

1.2.5. Adaptation des protéines aux fortes salinités

L'un des volets les plus passionnants de la recherche sur les organismes extrémophiles est l'étude de la stabilité des constituants cellulaires, plus particulièrement les protéines, face au stress de leur environnement. Les protéines sont composées d'acides aminés hydrophiles et hydrophobes, dont l'interaction avec le solvant détermine le degré d'hydratation indispensable à la stabilité de la protéine, à son repliement et à ses propriétés fonctionnelles (Enache et Kemekura, 2010).

A de fortes concentrations en sel, l'altération de l'hydratation est consécutive à la séquestration des molécules d'eau par les ions salins, avec pour conséquence une perturbation de la structure de la protéine, affectant son activité (Hough et Danson, 1999). Les protéines halophiles ont la particularité de maintenir leur hydratation dans les conditions naturelles de leur environnement (Karan *et al.*, 2012). Elles sont stables et actives de manière extraordinaire à de fortes concentrations en sel. Contrairement aux protéines des bactéries halotolérantes à halophiles modérées, celles des *Archaea* halophiles extrêmes sont inactives et irréversiblement dénaturées à des concentrations relativement faibles de NaCl (Setyorini *et al.*, 2006), et se distinguent de leurs homologues non halophiles par le maintien d'une conformation soluble et active dans des concentrations élevées de sel pouvant atteindre 5 M en NaCl. La caractérisation biophysique et thermodynamique de nombreuses protéines halophiles a montré que le sel (NaCl ou KCl) améliorait leur stabilité (Wright *et al.*, 2002). Cette capacité est le fruit d'adaptations structurelles. En effet, les enzymes halophiles extracellulaires (haloenzymes) sont caractérisées par une abondance d'acides aminés acides et par une charge négative répartie à leur surface (Paul *et al.*, 2008). Le résultat de cette adaptation fait des protéines halophiles les plus acides des protéines. Les acides aminés acides sont privilégiés en raison de leur forte capacité à se lier aux molécules d'eau (Enache et Kamekura, 2010). La charge négative à la surface des protéines amène à la création d'un réseau d'ions de sel hydratés assurant l'hydratation nécessaire à la stabilité des protéines halophiles (Dym *et al.*, 1995). Les protéines halophiles sont également caractérisées par une diminution des acides aminés hydrophobes et des lysines, notamment à la surface (Ortega *et al.*, 2011 et Haque *et al.*, 2019).

Les caractéristiques principales des enzymes halophiles sont:

- Une activité optimale à des concentrations élevées en sel.
- Une forte stabilité en présence de sel.
- Une haute réversibilité après exposition à des conditions dénaturantes.
- Une mobilité limitée lorsqu'elles sont soumises à une électrophorèse SDS-PAGE, en raison de leur faible capacité à se lier aux molécules de SDS (Tokunaga *et al.*, 2008).

1.3. La vie à haute température

La température est une variable importante dans chaque écosystème. La vie aux températures élevées est classée en forme thermophile ou hyperthermophile. Les microorganismes thermophiles se développent à des températures relativement élevées, entre 45°C et 80°C. Les hyperthermophiles sont des thermophiles particulièrement extrêmes pour lesquelles les températures optimales sont supérieures à 80°C (Stetter, 2006).

1.3.1. Les microorganismes thermophiles

Les thermophiles (du grec *Thermos*=chaleur, *phile* = aimer) sont des microorganismes qui se développent à des températures supérieures à la gamme des températures mésophiles comprises entre 25°C et 40°C qui caractérisent la forme de vie dominante (Robb *et al.*, 2008) (Figure 4). Ces micro-organismes sont retrouvés dans des habitats géothermiques naturels largement répandus sur notre planète et souvent associés à des zones tectoniques actives.

Les organismes thermophiles sont classés en plusieurs groupes (figure 4 et tableau VI) :

- Les thermophiles modérés, dont la croissance optimale est observée entre 50°C-65°C (*Bacillus caldolyticus*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Thermoactinomyces vulgaris*, *Clostridium thermohydrosulfuricum*, *Thermoanaerobacter ethanolicus* et *Thermoplasma acidophilum*)
- Les thermophiles extrêmes dont la température optimale de croissance est comprise entre 65-80°C (*Thermus aquaticus*, *T. thermophilus*, *Thermodesulfobacterium commune*, *Sulfolobus acidocaldarius* et *Thermomicrobium roseum*)
- Les hyperthermophiles qui exigent des températures supérieures à 80°C pour une croissance optimale (*Methanoccus jannaschii*, *Acidianus infernos*, *Archaeoglobus profundus*, *Methanopyrus kandleri*, *Pyrobaculum islandicum*, *Pyrococcus furiosus* ; *Pyrodictium occultum* ; *Pyrococcus abyssi* et *Thermococcus kodakarensis*) (Satyanarayana *et al.*, 2005 et Orita *et al.*, 2019).

D'autres auteurs classent les organismes en fonction de leur tolérance à la température en thermophiles, ayant des optima de croissance à des températures qui se situent entre 45°C et 85°C et les hyperthermophiles regroupant les bactéries capables de se développer à des températures supérieures à 80°C (Taylor et Vaisman, 2010). Les hyperthermophiles sont ceux qui ont bénéficié de plus d'études (Madigan et Oren, 1999). La limite supérieure de température de croissance rapportée est de 113°C pour les *Archaea*, 95°C pour les bactéries et 62°C pour les eucaryotes unicellulaires (Newton, 2010; Horikoshi et Bull, 2011).

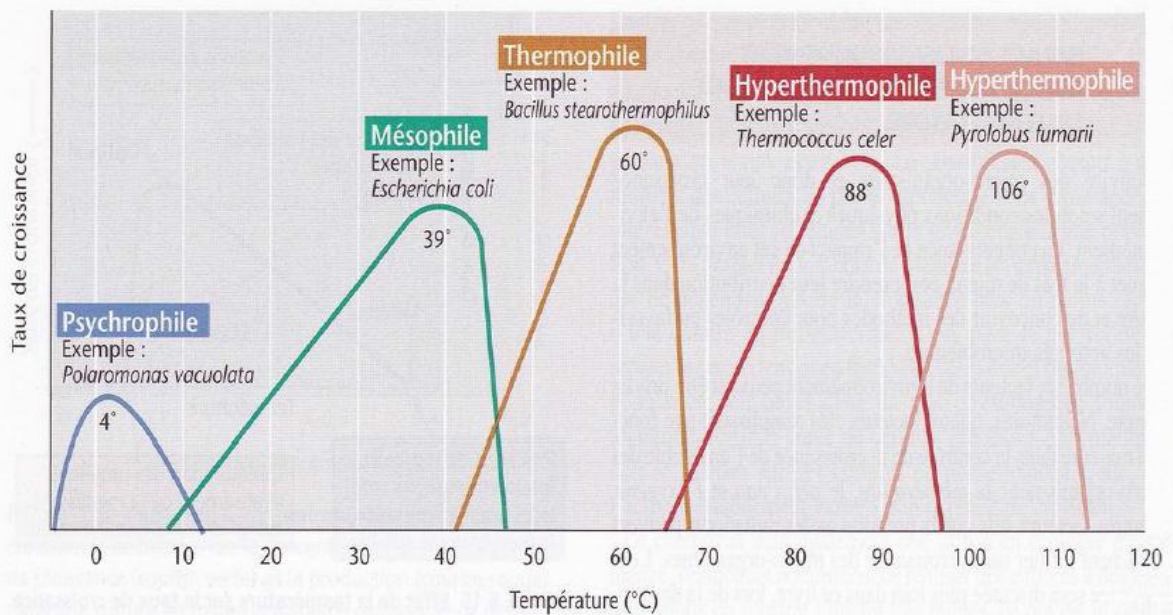


Figure 4 : Classement des organismes selon la température optimale de croissance (Madigan et Martinko, 2007).

Tableau VI : Définition des différentes catégories des thermophiles (Mesbah, 2008).

Caractère de croissance	Minimum	Optimum	Maximum
Thermotolérants	Tmin --	Topt < 50°C	Tmax < 60°C
Thermophiles modérés	Tmin --	Topt ≥ 50°C	Tmax > 60°C
Thermophiles extrêmes	Tmin ≥ 35°C	Topt > 65°C	Tmax < 85°C
Hyperthermophiles	Tmin ≥ 60°C	Topt > 80°C	Tmax ≥ 85°C

1.3.2. Diversité phylogénétique des thermophiles

Les micro-organismes thermophiles appartiennent aux domaines des *Bacteria*, des *Archaea* et de certains *Eucarya*. Ils possèdent des caractéristiques physiologiques et métaboliques très diverses et interviennent dans la plupart des grands cycles biogéochimiques.

Les hyperthermophiles sont pour la plupart affiliés au domaine des *Archaea*, L'ordre des *Desulfurococcales* comporte les organismes les plus thermophiles : les espèces des genres *Pyrodictium* et *Pyrolobus* sont en effet capables de se développer à des températures supérieures à 100°C. *Pyrolobus fumarii* isolé en 1997 d'une cheminée hydrothermale de la dorsale medio atlantique aux États-Unis (profondeur de 3650 mètres) détient le record de la température de croissance la plus élevée (113°C) chez les *Archaea* (Blöchl *et al.*, 1997).

Elle a été longtemps considéré comme l'organisme vivant le plus thermophile avant que ne soit isolée *Methanopyrus kandleri* qui une croissance optimale à 122°C.

Chez les thermophiles modérés, une plus grande diversité phylogénétique est retrouvée. En effet, ils appartiennent aux *Eubacteria*, *Archaea* et *Fungi* (Taylor et Vaisman, 2010). On considère que le transfert horizontal de gènes durant les dernières étapes de l'évolution de la vie est à l'origine de cette diversité phylogénétique (Pikuta *et al.*, 2007). La plupart des *Bacteria* thermophiles extrêmes sont des *Firmicutes* anaérobies mais également des espèces aérobies appartenant au phylum des *Deinococcus-Thermus*. À des températures plus élevées (parfois au-delà de 80°C), on retrouve des membres des phyla *Aquificae*, *Thermotogae* et *Thermodesulfobacteria* qui sont pour la plupart anaérobies et capables de réduire les composés soufrés, excepté les *Aquificae* dont les représentants sont essentiellement des micro-aérophiles pouvant croître en autotrophie en utilisant l'hydrogène comme source d'énergie (Madigan *et al.*, 2007)

1.3.3. Stratégies d'adaptation des microorganismes aux fortes températures

Si les microorganismes peuvent maintenir un gradient constant de pH ou de sel à travers la membrane, comme nous l'avons décrit précédemment, ils ne peuvent pas s'isoler de leur environnement chaud. Pour prospérer, les thermophiles ont subi de nombreuses adaptations physiologiques et biochimiques pour le maintien de l'intégrité et la fonction de leurs cellules. Aux fortes températures, les protéines et les acides nucléiques se dénaturent, la fluidité membranaire augmente et la solubilité des gaz indispensables au fonctionnement cellulaire est altérée (Satyanarayana *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2007). Les thermophiles doivent donc mettre en place des mécanismes pour contrebalancer les atteintes thermiques et maintenir l'intégrité cellulaire afin de pouvoir prospérer dans leurs milieux (Satyanarayana *et al.*, 2005). Ces mécanismes d'adaptation se situent à trois niveaux :

1.3.3.1. Les membranes cytoplasmiques

La fluidité et la perméabilité des membranes cytoplasmiques dépendent de leur composition en lipides et constituent le facteur principal qui détermine la température maximale de croissance (Konings *et al.*, 2002). Les microorganismes doivent être capables de moduler la composition de leur membrane en réponse aux facteurs de stress dans le milieu environnant. Ceci est d'autant plus important à fortes températures qui confronte les cellules à la difficulté de contrôler la perméabilité membranaire aux ions et aux protons, due aux mouvements des lipides (Konings *et al.*, 2002; Koga *et al.*, 2012).

Chez les thermophiles, le contrôle de la perméabilité membranaire est accompli par l'augmentation de la longueur des chaînes des acides gras, du ratio des ramifications iso/antéiso et/ou le degré de saturation de la chaîne acyle (Konings *et al.*, 2002). Ces adaptations confèrent aux membranes une fluidité optimale afin de leurs permettre d'accomplir leurs rôles et de croître à des températures plus élevées en fournissant le bon degré de fluidité nécessaire au bon fonctionnement des membranes (Ulrih *et al.*, 2010).

1.3.3.2. Les acides nucléiques

L'une des premières questions posées est celle de la stabilité du matériel génétique en sachant que la composition en acides nucléiques des thermophiles est identique à celle des mésophiles, et qu'à des températures élevées, l'ARN se dégrade et l'ADN se dénature *in vitro* (séparation des deux brins de la double hélice) puis se dégrade (Quérellou et Guézennec, 2010).

Les acides nucléiques doivent préserver leur conformation native dans les conditions physiologiques. A cet effet, leur stabilité à fortes températures nécessite des ajustements au niveau des interactions au sein de ces molécules. Si le génome est de petite taille chez les Archae hyperthermophiles, il contient le même nombre de gènes que les autres organismes. Toutefois, leur contenu élevé en paires de guanine-cytosine est favorable pour la stabilité des acides nucléiques. Des études menées sur le contenu en GC d'ADN, d'ARNr (5S, 23S et 16S), et d'ARNt, ont montré qu'une corrélation étroite existe entre la température optimale de croissance d'un microorganisme et le pourcentage du GC des ARNr et ARNt, mais pas celui de l'ADN (Unsworth *et al.*, 2007). La résistance des ribosomes des organismes thermophiles à hautes températures est conférée par la résistance des protéines qui les constituent (Barton, 2005). Chez les bactéries et les Archae hyperthermophiles, l'ADN est maintenu dans une conformation stable par une association avec deux types de molécules : les protéines cationiques qui contribuent à une meilleure spiralisation de l'ADN et à la formation du nucléosome ; et les topoisomérases de type 1 dépendante de l'ATP (reverse gyrase) qui augmentent l'entrelacement des deux brins chez de nombreux *Archaea* et assurent une bonne orientation de l'hélice d'ADN (Stetter, 1999).

Par ailleurs, les solutés compatibles accumulés par les thermophiles jouent un rôle prépondérant dans la stabilité des acides nucléiques et des complexes acides nucléiques-protéines (Allison et Anchordoquy, 2000, Kurz, 2008). D'autres types d'osmolytes sont rencontrés chez les hyperthermophiles tels que le di-myoinositol-1,19-phosphate (DIP) et les polyamines polycationiques. Des concentrations allant jusqu'à 0,4% (de la biomasse cellulaire) de putrescine, de spermidine, de norspermine, de thermospermine, et de spermine ont été détectées chez de nombreuses souches de l'Archaea *Sulfolobus* (Holden, 2009). Cependant, l'accumulation de solutés organiques n'a pas été observée chez d'autres hyperthermophiles isolés d'environnements non-salins (Santos *et al.*, 2011). D'autres molécules sont aussi

susceptibles d'apporter une protection des acides nucléiques contre les dommages causés par les températures élevées. Parmi celles-ci, les composés aliphatiques poly-cationiques de faible poids moléculaire, tels que les amines et les polyamines (Kumar et Satyanarayana, 2013, Barton, 2005). La stabilité des acides nucléiques est également garantie par les ions inorganiques, principalement les cations bivalents de magnésium et monovalents de sodium et de potassium qui ont la capacité d'augmenter la température de fusion des acides nucléiques (Kurz, 2008). Il a été démontré que la thermodégradation de l'ADN est réduite en présence de concentrations de sels monovalents (50 à 500 mM de KCl ou de NaCl) ou divalents (1 à 25 mM de MgCl₂) (Quérellou et Guézennec, 2010).

1.3.4. Les protéines

La remarquable caractéristique des thermophiles et des hyperthermophiles est la grande thermostabilité de leurs protéines et tout particulièrement de leurs enzymes (Madigan *et al.*, 2010). Généralement, chaque protéine est le résultat d'une évolution propre qui optimise son repliement et les interactions externes avec les solvants (Jaenicke, 2000). D'autre part, les stratégies adoptées ne sont pas nécessairement utilisées toutes simultanément pour conférer à une protéine une thermostabilité accrue et beaucoup de dispositifs impliqués dans la thermostabilisation des enzymes et des protéines solubles n'apparaissent pas dans le cas des protéines membranaires (Schneider *et al.*, 2002 ; Trivedi *et al.*, 2006)

Les altérations chimiques susceptibles de se produire chez les protéines sont la déamination, la formation du succinimide et du lanthionin, l'oxydation de l'histidine, de la méthionine, de la cystéine et du tryptophane. Les dommages causés par ces réactions sont plus importants à fortes températures. La stabilité d'une protéine est définie comme étant sa capacité à maintenir sa conformation structurale active en présence de facteurs dénaturants comme les fortes températures (Chen *et al.*, 2018). Les thermophiles et les hyperthermophiles sont dotés de protéines qui déploient des stratégies uniques de thermostabilité et une relation structure/fonction singulière (Hunter *et al.*, 2018). Le travail pionnier de Thomas Brock et ses collègues pendant les années 1960, a suscité l'intérêt d'étudier la stabilité des protéines à température élevée. Depuis lors, de nombreuses études ont été dédiées à la thermostabilité des protéines, afin d'appréhender les mécanismes par lesquelles elles assurent leurs fonctions et préservent leur structure à des températures dénaturantes pour la plupart des biomolécules (Sternier et Liebl, 2001).

D'une manière générale, la stabilité des protéines (hyper) thermophiles est la conséquence d'une architecture protéique définie (stabilité intrinsèque) et l'influence de la composition intracellulaire (facteurs extrinsèques) (Santos *et al.*, 2002).

1.3.4.1. Stabilité intrinsèque

- **Rôle des interactions intramoléculaires**

Une combinaison d'améliorations mineures dans les interactions moléculaires (hydrophobes, ioniques, ponts disulfures...) entre les acides aminés à différents endroits de la protéine thermophile, constitue l'élément déterminant pour une meilleure thermostabilité (Tigerström, 2005). Les interactions et les adaptations structurales déterminées pour la plupart des protéines thermophiles leur conférant une meilleure thermostabilité, peuvent être : Une augmentation de la compacité (Russel *et al.*, 1997), une hydrophobicité supérieure du cor de la protéine (Schumann *et al.*, 1993), un nombre élevé de liaisons ioniques (Vetriani *et al.*, 1998), une augmentation des ponts disulfures (Beeby *et al.*, 2005), des liaisons entre les résidus

aromatiques et des liaisons hydrogènes (Jaenicke et Bohm, 1998), une diminution de la surface des boucles (Thompson et Eisenberg, 1999), une stabilisation des dipôles présents aux extrémités des hélices (Satyanarayana *et al.*, 2005) et un raccourcissement de la longueur de la protéine (Das et Gerstein, 2000; Tekaia *et al.*, 2002).

- **Rôle des substitutions des acides aminés**

La nature des acides aminés qui entrent dans la composition des protéines en général et des enzymes en particulier influe d'une manière importante sur le degré de la stabilité et de flexibilité (Jaenicke et Bohm, 1998). La recherche sur la stabilité des protéines thermophiles, n'a permis de découvrir aucun acide aminé ou motif structural nouveau qui expliquerait le fonctionnement de ces molécules dans des conditions hostiles (Zhou *et al.*, 2008). Les différentes expériences ont montré que les remaniements dans la composition en acides aminés constituent la base de l'adaptation aux fortes températures (Berezovsky et Shakhnovich, 2005). Les travaux de protéomique comparée ont permis d'établir que la thermostabilité d'une protéine est liée à une augmentation du nombre des résidus acide glutamique (E) et lysine (K) combinée à une réduction des résidus glutamine (Q) et histidine (H). Un rapport $(E + K) / (Q + H)$ supérieur à 4,5 signifierait la présence d'un hyperthermophile.

La comparaison des structures de protéines thermophiles et mésophiles indiquent que les protéines thermophiles contiennent une forte proportion d'acides aminés chargés, contrairement aux protéines mésophiles qui sont riches en acides aminés polaires/non chargés (Vogt *et al.*, 1997a, b, Deckert *et al.*, 1998 ; Chakravarty et Varadarajan, 2000 et Tompa *et al.*, 2016). Le nombre de résidus chargés aurait un impact sur la solubilité tandis que leur position serait importante pour la stabilité. Il semble également que les ponts disulfures aient un rôle important dans la stabilisation des protéines thermostables (Beeby *et al.*, 2005 ; Ladenstein et Ren, 2008). L'abondance des acides aminés chargés dans les protéines thermostables, spécialement à la surface, favorisent l'établissement des liaisons ioniques, assurant la stabilité thermique (Scandurra *et al.*, 2000 ; Szilágyi et Závodszy, 2000, Nakashima *et al.*, 2003), ainsi que la différence de structure entre les protéines des thermophiles et mésophiles (Amadei *et al.*, 2018).

1.3.4.2. Facteurs extrinsèques de la thermostabilité des protéines

- **Stabilisation par les osmolytes**

En plus des facteurs intrinsèques, la stabilité des protéines thermophiles est aussi garantie par des facteurs extrinsèques. Le stress thermique provoque des effets délétères sur les protéines et les molécules biologiques au même titre que le stress salin. Pour faire face à ces effets, une stratégie commune est adoptée par les organismes halophiles et thermophiles. Les organismes halophiles protègent leurs constituants cellulaires du stress osmotique en accumulant de grandes concentrations d'osmolytes. Ces mêmes solutés compatibles jouent un rôle important dans la stabilisation des protéines chez les organismes qui se développent aux fortes températures (Roberts, 2005, Santos *et al.*, 2011). L'hydroxyectoine est accumulée par *Streptomyces* lors de l'élévation de la température (Malin et Lapidot, 1996), et à une concentration de 1 M ce soluté montre une haute efficacité pour la stabilisation de certaines enzymes-clés du métabolisme tel que la phosphofructokinase et la lactate-déshydrogénase (LDH) (Lippert et Galinski, 1992). Les solutés accumulés par les thermophiles ou « thermosolutés » sont chargés négativement, ce qui constitue une caractéristique distinctive avec les solutés accumulés par les mésophiles (Santos *et al.*, 2007). Ils entrent dans deux catégories : les dérivés d'hexoses avec un

groupement hydroxyle sur le C1, dont le principal est le 2- α -O-mannosylglycerate (MG) et les polyols-phosphodiester comme le DIP ou le di-glycérol phosphate. Le MG, est actuellement reconnu comme l'un des solutés les plus répandus chez les (hyper) thermophiles appartenant à des lignées phylogénétiques éloignées (Santos *et al.*, 2007). Outre les solutés compatibles, d'autres solutés à effet stabilisant sur les protéines sont produits par les organismes thermophiles, parmi eux figurent les polyamines, les solutés organiques (Satyanarayana *et al.*, 2005), le potassium et les ions inorganiques (Coolbear *et al.*, 1992, Mueller *et al.*, 2000). Parmi ces facteurs, les protéines chaperonnes (thermosomes) rencontrées chez les archées hyperthermophiles. Elles sont thermostables et résistantes à la protéolyse. Les chaperonines de l'Archaea *Sulfolobus solfataricus* empêchent l'agrégation de la protéine-cible dénaturée et catalysent son repliement par addition d'ions K⁺ (Chaston *et al.*, 2016 et Shoemark *et al.*, 2019).

- **Rôle des protéines de choc thermique**

Bien qu'une grande variété de réponses adaptatives existe chez les cellules lorsqu'elles sont exposées à un facteur de stress environnemental tels que la chaleur, la dessiccation et le stress chimique, la production des protéines de choc thermique (HSP) constitue la réponse la plus couramment utilisée. Les HSPs (Heat Shoc Protein) font partie des facteurs extrinsèques qui assurent la stabilisation des protéines aux fortes températures. Les classes HSP 100, HSP 90, HSP 70, HSP 60 et les small HSPs sont les plus retrouvées chez les microorganismes, principalement les thermophiles (Trent, 1996; Uehara *et al.*, 2018). Les HSPs fonctionnent comme des chaperonnes moléculaires, assurant le repliement des protéines dénaturées par les températures élevées, suppriment les repliements incorrects et reversent les mauvais repliements, favorisent le repliement correct des nouveaux polypeptides, et préviennent l'agrégation des protéines. Il n'est donc pas surprenant que la concentration de ces protéines soit élevée chez les microorganismes qui se développent à hautes températures.

- **Autres facteurs extrinsèques assurant la thermostabilité**

Les ions métalliques utilisés comme co-facteurs, augmente la stabilité thermique. De nombreuses amylases et protéases thermophiles se servent de cette stratégie, l'ion requis pour la stabilité et l'activité catalytique étant le Ca²⁺. Le rôle du Zn²⁺ dans la thermostabilité a été rapporté pour la ferrédoxine thermophile de *Sulfolobus* (Barton, 2005). D'autres facteurs extrinsèques susceptibles d'améliorer la thermostabilité in vitro ont été décrits pour les protéines thermophiles. On peut citer la présence de sels, l'augmentation de la concentration en protéines, la présence des coenzymes, des substrats, des activateurs et des molécules stabilisantes comme la thermamine (Faria *et al.*, 2004). Il a été aussi démontré qu'une pression élevée stabiliserait de nombreuses enzymes des hyperthermophiles. Elle serait responsable d'une plus grande compacité de la protéine et confèrerait ainsi une rigidité et une thermostabilité structurale plus accrue (Gomes et Steiner, 2004 et Synowiecki, 2010).

1.4. Les organismes polyextrêmophiles

Au cours des dernières décennies, les scientifiques ont été intrigués par la présence de microorganismes vivants en présence de nombreux facteurs de stress (salins, températures, acidité, alcalinité...). Ces organismes, appelés polyextrêmophiles, prospèrent dans des habitats qui, pour d'autres formes de vie terrestres, sont intolérablement hostiles ou même létales (Horikoshi *et al.*, 2011 ; Seckbach *et al.*, 2007 ; Seckbach *et al.*, 2012). Pour chaque condition environnementale extrême étudiée, une variété de microorganismes a montré qu'ils peuvent tolérer ces conditions, mais ont aussi souvent besoin de ces conditions pour leur survie (Rampelotto *et al.*, 2010).

Alors que les définitions des microorganismes extrêmophiles se basent sur leur adaptation à un seul facteur environnemental extrême comme la température ou la salinité, certains extrêmophiles font partie de deux catégories ou plus, le nombre croissant d'espèces et de souches isolées de ces milieux extrêmes multiples, parmi lesquelles figurent les thermohalophiles (Albuquerque *et al.*, 2012), les psychro-halophiles (Collins et Deming, 2013), les thermo-acidophiles, les thermo-alcalophiles (Prowe *et al.*, 2001), les halo-alcalophiles (Mesbah et Wiegel, 2005; 2012; Bowers *et al.*, 2009) ou même des psychrophiles, halophiles et barophiles à la fois (Deming *et al.*, 1988). Ces organismes baptisés polyextrêmophiles, sont beaucoup moins fréquents que les organismes adaptés à un seul facteur extrême (Kumar et Satyanarayana, 2013). Ils prolifèrent dans des environnements qui imposent plus d'un seul facteur de stress, tels que les environnements hypersalins formés suite à l'évaporation de l'eau sous l'effet des rayons du soleil. L'existence des halophiles avec des températures optimales de croissance élevées, appelés thermohalophiles, est probablement une adaptation aux fortes températures atteintes dans des environnements chauffés par l'énergie solaire, ou des sources chaudes (Mesbah et Wiegel, 2005). *Dichotomicrobium thermohalophilum* ([NaCl] 1.8 M, avec une température optimale de 50° C) est la première bactérie thermohalophile décrite et isolée du lac solaire Sinaï en Egypte (Hirsch et Hoffman, 1989).

Bowers et Wiegel (2011) considèrent tout microorganisme qui se développe à des concentrations de Na Cl égales ou supérieures à 1,7 M, pH supérieur ou égal à 8,5, et des températures supérieures ou égales à 50°C comme alcalothermohalophiles. Tous les alcalothermohalophiles (bactéries et archées) présentent un optimal de croissance à des concentrations de Na supérieures à 2 M, valeurs de pH supérieure à 8,5 et température supérieure ou égale à 50 °C (Tableau VI). Les alcalothermophiles halophiles du genre *Natronaerobius*, *Natronovirga* et *Halonatronum* sont obligatoirement anaérobies chimioorganotrophes, vivant par fermentation des sucres, comme *H. saccharophilum* (Zhilina *et al.*, 2004) et *Natronaerobius thermophilus* (Mesbah *et al.*, 2007).

Outre les lacs salins, d'autres écosystèmes où les deux paramètres hautes températures et salinités sont rencontrés tels que les réservoirs pétroliers, sont une source en espèces thermohalophiles. Néanmoins, ces espèces sont faiblement halophiles avec des optima de croissance à des salinités qui ne dépasse pas 3 % (w/v) NaCl (Miranda-Tello *et al.*, 2007; Chamkha *et al.*, 2008) contrairement aux espèces isolées des lacs salins. Il en va de même pour les espèces isolées de sources thermales salines *Thermonema rossianum* (Tenreiro *et al.*, 1997) et *Oceanicella actignis* (Albuquerque *et al.*, 2012). De nouveaux taxons thermohalophiles ont été isolés par Addou *et al.*, (2012, 2013, 2015) il s'agit de *Melghirimyces algeriensis*, *Melghirimyces thermohalophilus* et *Melghiribacillus thermohalophilus* qui croissent à une

température optimale de 50°- 60°C et tolèrent des concentrations en sel ayant jusqu'à 20% (w/v) de NaCl.

Les polyextrémophiles comprennent les thermophiles, les psychrophiles, les acidophiles, les alcalophiles (pH élevé), les piezophiles (haute pression, anciennement appelés barophiles), les halophiles, les osmophiles (concentration élevée de solutés organiques), les oligotrophes (faible concentration des solutés et/ou des nutriments), et les xérophiles (environnement très sec). Ils comprennent également les micro-organismes capables de croître en présence des concentrations importantes en métaux ou de doses élevées en radioactivité. A titre d'exemple, les deux polyextrémophiles : *Acinetobacter sp.* et *Exiguobacterium sp.* S17 peuvent vivre dans des concentrations élevées en arsenic (Zannier *et al.*, 2019) alors que *Deinococcus radiodurans* est capable de survivre dans un environnement très fortement irradié et de réparer des dommages causés à l'ADN irradié par un mécanisme unique de réparation appelé Extended Synthesis-Dependant Strand Annealing (ESDSA) qui se base sur une synthèse active d'ADN et sur la recombinaison homologue (Cox *et al.*, 2010).

La vie à hautes températures associées aux fortes salinités nécessite sans doute des mécanismes d'adaptations particuliers. Peu d'études ont porté sur ces mécanismes, mais on suppose qu'ils combinent des mécanismes d'adaptation adoptés par les thermophiles et les halophiles décrits précédemment. Toutefois, il est difficile de comprendre comment les microorganismes exposés à une forte concentration ionique, une forte température, une faible teneur en oxygène et en nutriments, de fortes radiations UV et parfois des pH élevés, s'adaptent à ces multiples facteurs extrêmes réunis caractérisant les environnements qui les abritent. L'accumulation des osmolytes joue un rôle essentiel dans l'adaptation à ces milieux (Mesbah et Wiegler, 2005). Dans ces conditions, les osmolytes exercent un rôle similaire à celui des chaperonnes moléculaires, garantissant ainsi la stabilité des protéines natives et le repliement des protéines dénaturées (Diamant *et al.*, 2001). Des études ont montré que lorsque des souches d'*E. coli* adaptées à de fortes concentrations en sel sont soumises au stress thermique l'agrégation des protéines habituellement observée est réduite, et ce grâce à l'accumulation d'osmolytes à différentes concentrations qui assurent la stabilité des protéines et la régulation de l'action des chaperonnes (Diamant *et al.*, 2001). Un autre exemple a été rapporté sur la synthèse biologique de nanoparticules fluorescentes de CdS (Quantum Dots, QDs) par des bactéries halophiles polyextrémophiles isolées d'Atacama Salt Flat (Chili), d'Uyuni Salt Flat (Bolivie) et de la mer Morte. Un autre exemple concerne une souche de *Halobacillus sp.* DS2 qui présente simultanément une résistance élevée au NaCl (3 à 22 %), au pH acide (1 à 4) et au cadmium (CMI du CdCl₂ : 1 375 mM) (Bruna *et al.*, 2019).

1.5. Stratégies de criblage des souches extrêmophiles produisant des molécules bioactives d'intérêt

L'exploration des sols et autres habitats de l'extrême est un programme de recherche établi pour obtenir de nouvelles souches et probablement de nouveaux métabolites bioactifs (Hacene *et al.*, 1993 ; Thakur *et al.*, 2007). L'Algérie est assez riche en de tels environnements : sebkhas, chotts, eaux thermales.... Ils constituent des écosystèmes diversifiés en microorganismes producteurs de molécules actives (Boutaiba *et al.*, 2006 ; Hassani *et al.*, 2013 ; Meknaci *et al.*, 2014 ; Selama *et al.*, 2014 ; Bouanane *et al.*, 2016 ; Boumehira *et al.*, 2016 ; Hadj Rabia *et al.*, 2016 ; Quadri *et al.*, 2016).

Pour lutter contre les microorganismes pathogènes résistants, trois stratégies ont été préconisées pour trouver de nouveaux antibiotiques antibactériens : la recherche de molécules dérivées d'antibiotiques connus, comme la clarithromycine et la télithromycine (Clardy *et al.* 2006); la recherche de nouvelles cibles au sein de la bactérie (Coates et Hu 2007); une recherche intensifiée de nouvelles molécules de sources naturelles (Von Nussbaum *et al.* 2019). Jusqu'à récemment, la majorité des composés antimicrobiens actuellement utilisés pour le traitement de diverses maladies infectieuses étaient isolés de micro-organismes (Tawiah *et al.*, 2012). Les bactéries constituent un groupe important de microorganismes, en particulier le genre *Streptomyces*, mieux connu pour sa capacité à produire des antibiotiques (Maiti *et al.*, 2019).

En comparaison avec les autres groupes d'organismes extrémophiles, les microorganismes halophiles et halotolérants ont été peu explorés (Oren, 2010).

Les propriétés singulières de certains microorganismes ont très vite attiré l'attention des opérateurs des biotechnologies pour exploiter ce nouveau gisement de ressources naturelles en biomolécules, notamment les biopolymères, les enzymes et les métabolites secondaires comme les antibiotiques.

Les deux processus biotechnologiques largement réussis impliquant des microorganismes halophiles sont : La production du β -carotène par l'algue verte *Dunaliella* et les solutés compatibles (bétaine, éctoïne ...) par des bactéries et des *Archaea* halophiles. Ainsi les activités antioxydantes du β -carotène le rend populaire pour l'usage en aliments sanitaires (Ye *et al.*, 2008), et les solutés organiques ou osmoprotecteurs permettent de protéger les constituants cellulaires et la stabilisation des enzymes, de l'ADN et des membranes (Oren, 2010).

Un des solutés compatibles les plus communs dans le domaine des bactéries est l'éctoïne (1, 4, 5, 6, tetrahydro-2- methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid), qui a été découverte pour la première fois chez une bactérie photosynthétique et halo-alcalophile *Ectothiorhodospira halochloris* (Oren, 2010). Celle-ci protège la peau des altérations causées par les rayonnements ultra-violets d'où son incorporation dans les préparations de crèmes à vocation hydratante (Van den Burg, 2003). Elle est reconnue pour augmenter les défenses immunitaires des cellules de Langerhans (Buenger et Driller, 2004) et pour empêcher l'agrégation et la neurotoxicité du β -amyloïde d'Alzheimer (Kanapathipillai *et al.*, 2005).

Les halophiles constituent également une source importante de composés bioactifs (Ventosa *et al.*, 1998). Des substances anti tumorales et antimicrobiennes ont été isolées à partir des bactéries légèrement et extrêmement halophiles. Les halocines, substances antimicrobiennes de nature protéique, sont isolées à partir des *Archaea* halophiles extrêmes, elles ont été décrites pour la première fois par Rodriguez-valera et al. (1982) ; ces molécules détruisent les membranes cellulaires microbiennes ou inhibent la transcription, la traduction et l'activité nucléique (Price et Shand, 2000).

Certaines Bactéries halophiles et halotolérantes, comme *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, ont la capacité de dégrader des composés aromatiques comme le phénol et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Tiquia *et al.*, 2007). Quant à *Halomonas halodurans*, elle est capable de dégrader le phénol et de cliver d'autres composés complexes tels que le benzoate (Margesin et Schinner, 2001). Des espèces archéennes appartenant aux genres *Halobacterium*, *Haloarcula* et *Haloferax* dégradent les n-alcanes et de nombreux

pesticides et insecticides. Ces capacités les rendent aptes à jouer un rôle dans la décontamination des environnements salins contaminés par ces composés toxiques.

L'une des bactéries polyextrémophiles les plus étonnantes est *Chroococciopsis* connue pour sa capacité à survivre dans des conditions environnementales variées et extrêmes caractérisés par des températures élevées et basses, des rayonnements ionisants et une salinité élevée,

en présence de métaux lourds et une faible disponibilité en l'eau (Satyanarayana *et al.*, 2013). De ces faits, cette organisme attire l'attention des astrobiologistes et de nombreux travaux lui sont consacrés (Billi *et al.*, 2012 ;2013 ; Baqué *et al.*,2013 et Smith *et al.*,2014).

Les bactéries halotolérantes jouent un rôle essentiel dans divers procédés de fermentation qui se réalisent en présence de sel. En pratiquant la fermentation, ces microorganismes produisent divers composés qui donnent les caractéristiques organoleptiques des produits résultants. Des espèces halotolérantes ont été retrouvées dans la saumure de cornichons dont la concentration de sel était en augmentation progressive (de 5% à 15,9% (p / v) NaCl), mais aussi dans la fermentation de la choucroute qui a lieu en présence de 2,25% à 2,5% (p / v) de sel. (Margesin et Schinner ,2001)

Les actinobactéries halophiles sont une source encore peu explorée et potentiellement intéressante pour la découverte de nouveaux métabolites secondaires bioactifs (Hadj Rabia *et al.*, 2016). La dégradation de composés organiques aliphatiques et aromatiques, la détoxification de polluants, la production de nouvelles enzymes et d'autres métabolites tels que les antibiotiques, les solutés compatibles et les polymères sont d'autres applications industrielles potentielles des actinobactéries halophiles et halotolérantes. Les nouveaux métabolites secondaires bioactifs produits par ce groupe, isolées principalement des habitats marins, ont révélé la grande capacité de ce groupe physiologique dans la production de nouveaux composés bioactifs (Hamedi *et al.*, 2013).

La mise en œuvre des extrémophiles et des molécules qu'ils produisent a contribué au développement de produits innovants et à l'ouverture d'une nouvelle ère de la biotechnologie (Horikoshi et Bull, 2011). Ces métabolites appelés « extremolytes » ont reçu des applications très variées. Les osmolytes sont utilisés dans l'industrie pharmaceutique, médical, cosmétique, alimentaire et dans le domaine de la bioremédiation (Lentzen et Schwarz, 2006; Kurz, 2008) et de la biologie moléculaire. La production de l'éthanol par fermentation de la cellulose ou de l'amidon a pu être réalisée avec succès à haute température en utilisant les bactéries thermophiles *Thermoanaerobacter ethanolicus* en culture pure ou en consortium (Ljungdahl et Wiegel, 1981). La production d'acides organiques, spécialement l'acide lactique est une autre application intéressante des extrémophiles. Elle a été rapportée pour des bactéries thermophiles anaérobies fermentaires (Combet-Blanc *et al.*, 2000; Fardeau *et al.*, 2004).

1.5.1. Antibiotiques et classification

Les grands progrès réalisés dans le domaine de la chimiothérapie anti-infectieuse, depuis la découverte de la pénicilline et des sulfamides jusqu'à celui des céphalosporines et des nouvelles quinolones, permet actuellement de lutter, d'une façon efficace, contre la plupart des agents infectieux. Par ailleurs, de nombreux antibiotiques sont connus mais leur utilisation irraisonnée a entraîné l'émergence de bactéries multirésistantes contre lesquelles, tout le monde s'accorde pour avancer il n'y aura pas, dans les années à venir, de traitement efficace. Aussi, pour espérer isoler de nouvelles biomolécules actives et efficaces, et répondre à cette perspective et menace

effroyable pour l'humanité, les criblages classiques donnent de moins en moins de résultats. Ceux-ci doivent être de plus en plus orientés aussi bien dans les échantillonnages, dans le choix des souches productrices que dans le choix des cibles celles-ci peuvent être des bactéries résistantes aux antibiotiques comme celles qui figurent dans la liste de l'OMS (Bactéries du groupe ESKAPE) (Avery *et al.*, 2019).

Contrairement à d'autres groupes de substances naturelles (alcaloïdes, stéroïdes, enzymes, terpènes, etc.) qui représentent une gamme étroite de squelettes structurels, les antibiotiques ont des structures exprimant les caractéristiques de l'ensemble de la chimie organique avec certains groupes, squelettes et configurations particuliers qui n'ont pas été trouvés, ou très rarement trouvés, dans d'autres substances d'origine naturelle, et qui ne peuvent pas être synthétisés par des méthodes simples. En effet, les antibiotiques sont à l'origine des métabolites d'organismes vivants et sont donc biosynthétisés à partir de substances organiques simples (sucres, acides aminés, bases de purine ou de pyrimidine, acides gras,...), il est évident que ces critères fondamentales constituent la première approche du principe de base de la classification chimique. Cependant, d'autres classifications sont disponibles et se basent sur d'autres critères, comme : les organismes producteurs, les mécanismes d'action, le spectre d'action, la cible d'action, etc... Cependant, la seule méthode à pouvoir classer les 22 000 antibiotiques connus actuellement est la classification basée sur la structure chimique (Berdy *et al.*, 1987). Ces auteurs ont proposé un système de classification ouvert à tous les antibiotiques qui divise ces derniers en 9 grandes familles chimiques. Aussi, pour faciliter l'identification des composés et permettre l'élimination des substances déjà connues, on peut se référer à des banques de données (Handbook of Antibiotics, Part I, II, III et IV) qui contiennent à la fois une classification numérique des antibiotiques informatisable, des caractéristiques physico-chimiques, les organismes producteurs,... Chaque antibiotique possède un numéro de code, le 1^{er} chiffre indique la famille (exemple : 1. carbohydrates), le 2^{ème}, la sous-famille (exemple ; 1.2. aminoglycosides), le 3^{ème}, le groupe (exemple ; 1. 2.1. Dérivés streptomine) et le 4^{ème}, le type (exemple ; 1.2.1.1 : type streptomycine). Le tableau récapitule l'ensemble de cette classification avec des exemples.

Tableau VII : La classification des antibiotiques selon la structure chimique (Berdey, 1974)

Familles	Sous-familles	Groupes	Types
1- Les antibiotiques carbohydratés	1-1 Les saccharides purs	1-1-1 Mono et disaccharides	1-1-1-1 Les glucides simples
			1-1-1-2 Les aminosaccharides
			1-1-1-3 Dérivés des glucides simples
		1-1-2 Polysaccharides	1-1-2-1 Les Polysaccharides de type glycane
			1-1-2-2 Polysaccharide-protéine complexes
			1-1-2-3 Les lipopolysaccharides
			1-1-2-4 Autres polysaccharides
		1-2 Les aminoglycosides	1-2-1 Dérivés streptamine
	1-2-1-2 Type Bluensomycine		
	1-2-1-3 Type spectinomycine (N,Ndimethylstreptamine)		
	1-2-1-4 Type hybrimycine (streptamine et épistreptamine)		
	1-2-2 Dérivés deoxystreptamine		1-2-2-1 Dérivés streptamine disubstitués
			1-2-2-2 Dérivés deoxystreptamine disubstitués
			1-2-2-3 Type hygromycine B
	1-2-3 Autres dérivés de l'aminocyclitole (cyclohexanole)		1-2-3-1 Type validamycine
1-2-3-2 Type kasugamycine			
1-2-3-3 Type myomycine			
1-3 les autres (N- et C-) glycosides	1-3-1 N-Glycosides (groupe de strepto-thricine)	1-3-1-1 Type streptothricine (sans lysine)	
		1-3-1-2 « Pseudostreptothricine » (sans lysine B)	

			1-3-1-3 Autres types de streptothricine (dextrarotatoire)
		1-3-2 C-glycosides (oligosaccharides avec des chromophores aromatiques)	1-3-2-1 Type de Ristocetine
			1-3-2-2 Type de vancomycine
	1-3-2-3 Type de chromomycine		
	1-4 Divers dérivés du sucre	1-4-1 Les esters de sucre, amides	1-4-1-1 Type de verninomycine (esters de l'acide evernique)
			1-4-1-2 Type de lincomycine (dérivés de lincoseamine)
		1-4-2 Autres produits dérivés du sucre (lipides de sucre)	1-4-2-1 Type de moenomycine
			1-4-2-2 Glycolipides
			1-4-2-3 Autres dérivés des glucides
		2- les antibiotiques lactone macrocyclique	2-1 Les antibiotiques macrolides
2-1-1-2 albocycline			
2-1-1-3 Picromycine, erythromycine			
2-1-2 Les macrolides à taille moyenne	2-1-2-1 Leucomycine, spiramycine		
	2-1-2-2 Angolamycine, Carbomycine (A), cirramycine		
	2-1-2-3 Carbomycine B, Tylosine		
	2-1-2-4 Sans chromophore (maridomycine)		
	2-1-2-5 Macrolides moyens neutres (neutramycine, Aldgamycine E)		
2-1-3 Autres types de macrolides	2-1-3-1 Bundline		
	2-1-3-2 Borrelidine		

2-2 Les antibiotiques polyènes	2-2-1 Triènes (probablement macrolides)	2-2-1-1 Trienine	
		2-2-1-2 Autres triènes	
	2-2-2 Tetraènes	2-2-2-1 Pimaricine	
		2-2-2-2 Ritnocidine	
		2-2-2-3 Nystatine	
	2-2-3 Pentaènes	2-2-3-1 Aldopentaene	
		2-2-3-2 Eurocidine (pentaènes amphotériques avec de glucide)	
		2-2-3-3 Capacidine	
		2-2-3-4 Gangtokomycine	
	2-2-4 Hexaènes	2-2-4-1 Macrocyclique hexaènes	
		2-2-4-2 Fradicidine	
	2-2-5 Heptaènes	2-2-5-1 Les heptaenes aromatiques (Candicidine, aureofungine, perimycine)	
		2-2-5-2 Les heptaenes nonaromatiques	
	2-2-6 Octaènes	2-2-6-1 Ochramycine	
	2-2-7 Oxopolyènes	2-2-7-1 Flavofungine (oxopentaenes)	
		2-2-7-2 Dermostatine	
	2-2-8 Mixedpolyènes	2-2-8-1 Tetraesine	
	2-3 Autres antibiotiques lactones macrocycliques	2-3-1 Large macrolactones (macrolide)	2-3-1-1 Oligomycine
			2-3-1-2 Venturicidine
2-3-1-3 Axenomycine			
2-3-1-4 Primycine			

		2-3-2 Les lactones simples	2-3-2-1 Lactones à huit chaînes
			2-3-2-2 Lactones à neuf chaînes
		2-3-3 Dilactones	2-3-3-1 Antimycine
			2-3-3-2 Boromycine
			2-3-3-3 Pyrenophorine
		2-3-4 Polylactones	2-3-4-1 Cyclopolylactones (nonactine)
			2-3-4-2 Fluorine
		2-3-5 Macrolactones condensées	2-3-5-1 Chlorothricine
			2-3-5-2 Cytochalasine
			2-3-5-3 Brefeldine
			2-3-5-4 Zygosporine
		2-4 Les antibiotiques macrolactames	2-4-1 Ansamycine
	2-4-1-2 Tolypomycine		
	2-4-1-3 Geldanamycine		
	2-4-2 Maytansine		
3- Les quinones et les antibiotiques similaires	3-1 Les composés polycycliques condensés linéairement	3-1-1 Tétracyclines	3-1-1-1 Tétracyclines et tétracomposés de type cycline
			3-1-1-2 Pillaromycine
			3-1-1-3 Quinocycline
		3-1-2 Anthracycline	3-1-2-1 Anthracycline glycosides
			3-1-2-2 Anthracyclinones
		3-1-3 Dérivés anthraquinones	3-1-3-1 Antibiotique anthraquinones simples

		3-1-3-2 Dérivés dianthraquinones
		3-1-3-3 Benz(a)anthraquinones
		3-1-3-4 Anthraquinones condensés avec des hétérocyles
		3-1-3-5 Pluramycine
		3-1-3-6 Phenanthrenequinones
3-2 Les dérivés naphthoquinone	3-2-1 Dérivés naphthoquinone simples	3-2-1-1 o-Naphthoquinones
		3-2-1-2 p-Naphthoquinones
	3-2-2 Napthoquinones condensés	3-2-2-1 Naphthoquinones condensés avec des chaines alicyclic
		3-2-2-2 Naphthoquinones condensés avec des hétérocycles contenant l'oxygène
		3-2-2-3 Naphthoquinones condensés avec des hétérocycles
	3-2-3 Dérivés naphthoquinones	3-2-3-1 Luteomycine
		3-2-3-2 Xanthomycine
3-3 Les dérivés benzoquinones	3-3-1 Antibiotiques benzoquinones	3-3-1-1 Dérivés p-benzoquinone simples
		3-3-1-2 Benzoquinones avec d'autres constituants
		3-3-1-3 Biquinones
	3-3-2 Benzoquinone condensés avec autre constituants	3-3-2-1 Mitomycine
		3-3-2-2 Streptonigrine
		3-3-2-3 Benzoquinones condensés avec des hétérocycles contenant l'oxygène
3-4 Divers composés quinonelike	3-4-1 Semiquinones	3-4-1-1 Quinones methides simples
		3-4-1-2 Autres quinones methides

			3-4-1-3 Quinones methides polycondensés
		3-4-2 Autres substances quinone-like	3-4-2-1 Epoxydone
			3-4-2-2 Dérivés benzoquinones contenant le brome
4- Les acides aminés, les antibiotiques peptidiques	4-1 Les dérivés acides aminés	4-1-1 Les acides aminés simples	4-1-1-1 Dérivés diazo-, nitroso- acides aminés
			4-1-1-2 Les acides aminés aliphatiques, alicycliques et hétérocycliques
			4-1-1-3 Les acides aminés analogues
		4-1-2 Les antibiotiques dérivés biogénétiquement des acides aminés	4-1-2-1 Les antibiotiques β - Lactame
			4-1-2-2 Pyrrothine
			4-1-2-3 Acide actithiazique
		4-1-3 Dérivés diketopiperazine	4-1-3-1 Antibiotiques diketopiperasine
			4-1-3-2 Antibiotiques diketodithiopiperazine
			4-1-3-3 Acide aspergillique
	4-2 Les homopeptides	4-2-1 Oligopeptides	4-2-1-1 Acide aminopyrrolecarboxylique (peptides)
			4-2-1-2 Oligopeptides linéaires
			4-2-1-3 Antibiotiques oligopeptides cycliques
		4-2-2 Homopeptides linéaires	4-2-2-1 Gramicidine A
			4-2-2-1 Edein
			4-2-2-2 Peptides linéaires contenant le sulfur
4-2-2-3 Bacillomycine			
4-2-3 Homopeptides cycliques		4-2-3-1 Tyrocidine	

			4-2-3-2 Bacitracine	
			4-2-3-3 Viomycine	
			4-2-3-4 Ilamycine	
			4-2-3-5 Autre cyclopeptides	
	4-3 les peptides hétéromères	4-3-1 Cyclopeptides avec des acides gras		4-3-1-1 Glutamycine
				4-3-1-2 Polymyxine
		4-3-2 Peptides avec sulfure contenant des hétérocycles		4-3-2-1 Peptides thiazolyl
				4-3-2-2 Bottromycine
				4-3-2-3 Autres peptides avec sulfure contenant des hétérocycles
		4-3-3 Chelate-forming peptides		4-3-3-1 Sideromycines (peptides avec N-hétérocycles)
				4-3-3-2 Bleomycine (glycopeptides)
				4-3-3-3 Autres antibiotiques formant-chelate
		4-4 Les peptolides	4-4-1 Chromopeptolides	
	4-4-1-2 Echinomycine			
4-4-1-3 Autres chromopeptolides				
4-4-2 Peptolides avec des acides gras			4-4-2-1 Enduracidine	
			4-4-2-2 Stendomycine	
			4-4-2-3 Esperine	
4-4-3 Peptolides contenant des hétérocycles			4-4-3-1 Antibiotiques contenant l'acide 3-Hydroxypyridinecarboxylique	
			4-4-3-2 Monamycine	
				4-4-4-1 Telomycine

		4-4-4 Peptolides avec autres constituants	4-4-4-2 Grisellimycine
		4-4-5 Depsipeptides	4-4-5-1 Valinomycine-enniatine
			4-4-5-2 Serratamolide
	4-4-5-3 Ostreogrycine A		
	4-5 Peptides à poids moléculaire élevé	4-5-1 Polypeptides	4-5-1-1 Polypeptides acides
			4-5-1-2 Polypeptides basiques
			4-5-1-3 Polypeptides amphotériques
		4-5-2 Protéines	4-5-2-1 Protéines anticancéreuses
			4-5-2-2 Autres protéines
		4-5-3 Protéides	4-5-3-1 Chromoprotéides
			4-5-3-2 Glucoprotéides
			4-5-3-3 Nucléoprotéides (particules virales)
			4-5-3-4 Enzymes et des facteurs enzyme-like
			4-5-3-5 Bactériocines
			4-5-3-6 Substance Interferon-like
5- Les antibiotiques hétérocycliques contenant de l'azote		5-1 Hétérocycles non condensés (simples)	5-1-1 cycles à cinq chaînons
	5-1-1-2 Rodigosine (tripyrrol)		
	5-1-1-3 Antibiotique pyrrolidone		
	5-1-1-4 Antibiotiques pyrrolidine		
	5-1-1-5 Five-membered ring avec 2 hétéro-atomes		
	5-1-2 cycles à six chaînons		5-1-2-1 Dérivés simples de pyridine

			5-1-2-2 Mocimycine
			5-1-2-3 Dérivés piperidine
			5-1-2-4 Hétérocycles condensés avec un cycle alicyclique
			5-1-2-5 Six-membered rings avec 2 hétéro-atomes
		5-1-3 Pyrimidine et les glycosides similaires	5-1-3-1 Cytosine N-glycosides
			5-1-3-2 Uracil N-glycosides
			5-1-3-3 Variétés de C-glycosides (cycle à 5-6 membres)
5-2 Hétérocycles condensés (fusionnés)	5-2-1 Hétérocycles condensés avec un ou des cycles aromatiques	5-2-1-1 Dérivés d'Indole	
		5-2-1-2 Dérivés Quinoline-quinoxazoline phenazine	
		5-2-1-3 Dérivés phenazines	
		5-2-1-4 Dérivés Phenoxazine	
		5-2-1-5 Albofungine	
		5-2-1-6 Différents hétérocycles condensés	
	5-2-2 Hétérocycles condensés	5-2-2-1 Anthramycine (cycle benzénique)	
		5-2-2-2 Dérivés purine, azapurine	
		5-2-2-3 Fervenuline (pyrimidotives triazine)	
	5-2-3 Purine et purinelike glycosides	5-2-3-1 Purine type N-glycosides	
		5-2-3-2 C-glycosides, type formycine	
	5-3 les alcaloïdes à activité antibiotique (anti tumorale)		

6- Les antibiotiques hétérocycliques contenant de l'oxygène	6-1 Dérivés du furane	6-1-1 Simples furannes	6-1-1-1 Monofurannes (tetrahydrofurannes)	
			6-1-1-2 Difuranne (lignan)	
		6-1-2 Furannes condensés	6-1-2-1 Aflatoxine	
			6-1-2-2 Autres furannes condensés	
		6-1-3 Dérivés benzofurannes	6-1-3-1 Dérivés dibenzofuranne	
			6-1-3-2 Acide usnique	
		6-2 Dérivés du pyrane	6-2-1 Dérivés pyraniens simples	6-2-1-1 Pyranes simples
				6-2-1-2 Pyranes condensées
			6-2-2 α-Pyranones	6-2-2-1 Asperline
	6-2-2-2 Autres α-pyranones simples			
	6-2-2-3 α-Pyranones condensés avec anneau alicyclique			
	6-2-2-4 α-Pyranones avec chaîne latérale aromatique aliphatique			
	6-2-3 γ-Pyranones		6-2-3-1 Aureothine	
			6-2-3-2 Citreoviridine	
			6-2-3-3 Autres γ-pyranones simples	
	6-3 Dérivés du benzo[r]pyrane (flavone)		6-3-1 Dérivés flavone simples	6-3-1-1 Flavone
6-3-1-2 Flavonol				
6-3-1-3 Flavanone				
6-3-1-4 Anthocyanides				
6-3-2 Isoflavones		6-3-2-1 Simple isoflavones		

			6-3-2-2 Dérivés pterocarpane (phytoalexine)	
			6-3-2-3 Rotenone	
		6-3-3 Neoflavones	6-3-3-1 Dalbergion	
	6-4 Les petites lactones	6-4-1 Lactones simples (4-5 lactones membrés)		6-4-1-1 Lactones à quatre chaînes
				6-4-1-2 Lactones simple à cinq chaînes
				6-4-1-3 Acide lichesterique
				6-4-1-4 Acides tétramiques
				6-4-1-5 Dérivés simples de dilactone
				6-4-1-6 Type acide vulpique
		6-4-2 Petits lactone condensés		6-4-2-1 Petits lactones condensés avec hétéro- ou alicycles
				6-4-2-2 Dérivés du coumaron
				6-4-2-3 Coumarine (benzo[a]pyrone) dérivés
				6-4-2-4 Coumarins condensés avec autre anneau
	6-4-2-5 Isocoumarine (3,4-benzo[a]-dérivés pyrones)		6-4-2-5 Isocoumarine (3,4-benzo[a]-dérivés pyrones)	
6-5 Les antibiotiques polyéthers		6-5-1 Furan-pyranpolyéthers	6-5-1-1 Type nigériane	
			6-5-1-2 Antibiotiques polyéther non saturés	
			6-5-1-3 Antibiotiques aromatiques polyéther	
	6-5-1-4 Autres polyéthers similaires			
7- Les antibiotiques alicycliques	7-1 Dérivés cycloalcanes	7-1-1 Dérivés cyclopentanes	7-1-1-1 Cyclopentanes simples	
			7-1-1-2 Dérivés cyclopentenone	
			7-1-1-3 Dérivés cyclopentane compliqué	

		7-1-2 Dérivés cyclohexane	7-1-2-1 Fumagilline	
			7-1-2-2 Dérivés cyclohexenone	
			7-1-2-3 Dérivés cyclohexene-cyclohexadiene	
		7-1-3 Antibiotiques cycloheximide-clutarimide	7-1-3-1 Actidione	
			7-1-3-2 Type actiphénol (aromatique glutarimides)	
			7-1-3-3 Type streptimidone (glutarimides aliphatiques)	
			7-1-3-4 Autres glutarimides moins connus	
	7-2 Les Petits terpènes	7-2-1 Simple terpènes	7-2-1-1 Monoterpènes	
			7-2-1-2 Sesquiterpènes	
			7-2-1-3 Diterpènes	
			7-2-1-4 Sesterterpènes	
			7-2-1-5 Terpène glycosides	
		7-2-2 Terpène lactones	7-2-2-1 Sesquiterpène lactones	
			7-2-2-2 Diterpène lactones	
			7-2-2-3 Divers dérivés complexes du terpène lactone	
7-3 Les antibiotiques oligoterpènes			7-3-1 Antibiotiques avec stéroïde squelette	7-3-1-1 stéroïdes
				7-3-1-2 Alcaloïdes stéroïdes
	7-3-1-3 Cardenolides, bufadienolides, avec anolides, stérol glycosides			
	7-3-1-4 Analogues stéroïdes--viridine			
	7-3-1-5 Asastéroïdes			
	7-3-2 Triterpènes	7-3-2-1 Triterpènes simples		

			7-3-2-2 Glycosides de triterpène
			7-3-2-3 Saponines
		7-3-3 Terpénoïdes	7-3-3-1 Scirpène
			7-3-3-2 Scirpène lactones
			7-3-3-3 Autres toxines scirpènes
8- Les antibiotiques aromatiques	8-1 Composés du benzénique	8-1-1 Dérivés benzéniques Monocycliques sans autres constituants	8-1-1-1 Phénols simples
			8-1-1-2 Dérivés aldéhyde phtalique
			8-1-1-3 Acides carboxylique simples
			8-1-1-4 Autres dérivés benzène
		8-1-2 Dérivés de Benzène monocyclique avec chaîne latérale aliphatique	8-1-2-1 Benzène lié aux peptides (Chloramphénicol)
			8-1-2-2 Benzènes avec terpène (type chaîne-ascoclore)
			8-1-2-3 Benzènes avec une chaîne aliphatique
			8-1-2-4 Benzènes avec une chaîne polyène
			8-1-2-5 Benzènes avec une chaîne polyène
		8-1-3 Polycycliques isolés dérivés du benzène	8-1-3-1 Xanthocilline
	8-1-3-2 Dérivés de la stilbène		
	8-1-3-3 Dérivés diphényliques		
	8-1-3-4 Autres composés polycycliques isolés		
	8-2 Composés aromatiques condensés	8-2-1 Composés Spirou	8-2-1-1 Griseofulvine
8-2-1-2 Geodine			
8-2-2 Dérivés naphthalènes		8-2-2-1 Carzinophylline	

			8-2-2-2 Autres	
		8-2-3 Dérivés anthracène-phénanthrène	8-2-3-1 Dérivés de l'anthracène	
			8-2-3-2 Dérivés du phénanthrène	
	8-3 Composés aromatiques non benzoïdiens	8-3-1 Tropolones		8-3-1-1 Acide puberulique
				8-3-1-2 Autres
	8-3-2 Azulène		8-3-2-1 Lactarovioline	
		8-4-1 Ethers aromatique	8-4-1-1 Dérivés de l'éther diphenylique	
	8-4-1-2 Éthers aromatiques-aliphatiques			
	8-4 Divers dérivés des composés aromatiques	8-4-2 Glycosides aromatiques, antibiotiques glycosidiques	8-4-2-1 Hygromycine de type A (glycosides de benzène)	
			8-4-2-2 Chartreusine (glycosides de naphthalène)	
			8-4-2-3 Glycosides de coumarine (Novobiocine, Coumermycine)	
		8-4-3 Esters aromatiques	8-4-3-1 Depsidones	
			8-4-3-2 Depsides	
8-4-3-3 Phénol esters				
8-4-3-4 Autres esters aromatiques				
9- Les antibiotiques aliphatiques	9-1 Dérivés alcalins	9-1-1 Dérivés alcalins simples	9-1-1-1 Dérivés hydrocarbures, les alcools	
			9-1-1-2 Amines aliphatique	
			9-1-1-3 Elaiomycine (azoxy-dérivés)	
			9-1-1-4 Lipoxarnycine	
		9-1-2 Polyines, Allènes	9-1-2-1 Polyine alcools (alcanes)	
			9-1-2-2 Acides polyine	

			9-1-2-3 Polyènes
	9-2 Dérivés de l'acide carboxylique aliphatique	9-2-1 Petits acides carboxylique	9-2-1-1 Entéromycine (acrylique dérivés acides)
			9-2-1-2 Dérivés acide acétylène-dicarboxylique
			9-2-1-3 Dérivés acides carboxyliques simples
		9-2-2 Dérivés d'acides gras	9-2-2-1 Acides gras saturés simples
			9-2-2-2 acides gras insaturés
			9-2-2-3 acide gras oxo-oxy
			9-2-2-4 Esters d'acides gras (glycerides)
			9-2-2-5 Amides d'acides gras
			9-2-2-6 Acides aminés à longue chaîne
		9-3 Les composés aliphatiques contenant S ou P	9-3-1 Composés aliphatiques simples contenant le sulfure
	9-3-2 Composés aliphatiques simples contenant le phosphore		
0- Antibiotiques divers (avec squelette inconnu)	(Peut être distribué selon les propriétés physiques, chimiques et microbiologiques)		

1.5.2. Enzymes

Les enzymes ou les biocatalyseurs, présents dans tous les systèmes vivants, sont indispensables au bon fonctionnement des processus vitaux de toutes les cellules. L'utilisation des biocatalyseurs en industrie remonte à 1915 par Röhm, qui a introduit la première enzyme microbienne dans la formulation des détergents. L'élucidation de leur nature protéique en 1926, et leur production à grande échelle a commencé dans les années 1960 (Iyer et Ananthanarayan, 2008). En regard de leurs attributs dont la spécificité, la sélectivité et l'efficacité, les enzymes occupent actuellement une place prépondérante en biotechnologie.

Les organismes thermohalophiles sont des sources potentielles d'enzymes tolérantes au sel et thermostables. Les enzymes strictement halophiles sont inactivées et dénaturées à des concentrations inférieures à 1M de NaCl (Adams et Kelly, 1995). Leur thermostabilité combinée leur confère un énorme potentiel commercial dans les procédés industriels effectués à haute température et à forte concentration de sel. Alors qu'un certain nombre d'enzymes alcalothermostables ont été isolées ces dernières années (Gorlach *et al.*, 2010, Ghati *et al.*, 2015, Ekka *et al.*, 2018), beaucoup moins de recherches ont été consacrées aux enzymes des halophiles (Boutaiba *et al.*, 2006). La plupart des processus industriels s'effectuent sous des conditions physico-chimiques spécifiques qui ne peuvent être définitivement ajustées aux points optimaux nécessaires à l'activité des enzymes disponibles, d'où la nécessité de disposer d'enzymes présentant des activités optimales à différentes gammes de concentration en sel, de pH et de températures, dénaturantes pour les autres protéines.

De telles enzymes (protéases, lipases, amylases, β galactosidases...) sont produites par de nombreux microorganismes halophiles et halotolérants (Zolfaghar *et al.*, 2019). Ces enzymes ont une gamme étendue d'applications comme les amylases utilisées dans l'industrie de la saccharification d'amidon, de textiles, des aliments et en boulangerie (Gupta *et al.*, 2003, Helmerhorst *et al.*, 2019 et Pokrovsky *et al.*, 2019). Les protéases responsables de l'hydrolyse des protéines en libérant des peptides plus petits, sont généralement utilisées comme additifs dans les détergents de blanchisserie, dans la transformation des produits alimentaires, dans les industries pharmaceutiques et de tannage de cuir aussi bien que dans la gestion des déchets (Amoozegar *et al.*, 2007; Karbalaeei-Heidari *et al.*, 2009).

Des archées halophiles extrêmes productrices de protéases comme *Halogeometricum borinquense* (Vidyasagar *et al.*, 2006), *Natrialba magadii* (D'Alessandro *et al.*, 2006) et *Halobacterium salinarum* (Promchai *et al.*, 2018) ont été isolées. De telles enzymes ont été également isolées et caractérisées à partir de plusieurs espèces bactériennes halophiles et halotolérantes (Shivanand et Jayaraman, 2009 et Karbalaeei-Heidari *et al.*, 2009).

Les enzymes chitinolytiques impliquées dans les processus de dégradation de la chitine sont nombreuses. Ce sont des glycosides hydrolases. Elles sont employées pour une large action sur plusieurs substrats et dérivés chitineux (Antranikian, 2008 ; Gupta *et al.*, 2018).

Le rôle des chitinases varie en fonction des organismes qui les produisent. Elles peuvent participer aux processus de nutrition, de croissance ou bien de défense. Les chitinases sont également impliquées dans certains mécanismes de pathogénicité.

Les activités chitinolytiques attirent beaucoup l'attention des chercheurs en raison de leurs potentielles applications dans différents domaines (Adrangi *et al.*, 2010). Elles peuvent être utilisées dans la production de N-acetyl chitoooligosaccharides (Yang *et al.*, 2016) et GlcNAc

(Fu *et al.*,2014) dans l'industrie alimentaire ou pharmaceutique (Dahiya *et al.*,2006), la bioconversion de la chitine en éthanol dans l'industrie d'énergie (Inokuma *et al.*,2013) et d'engrais (Sakai *et al.*,1998) , la production de protéines cellulaires simples dans l'industrie d'alimentation (Singh *et al.*,2011) et la production des antifongiques dans l'agriculture (Gasmi *et al.*,2019).

La présence d'enzymes chitinolytiques a été observée chez les archées et les bactéries (Gao *et al.*, 2003; Andronopoulou et Vorgias, 2004; Tanaka *et al.*, 2004). Les gènes codant ces enzymes ont été isolés, clonés et caractérisés. Plusieurs espèces microbiennes sont à l'origine de la synthèse de chitinases: *Thermococcus chitinophagus* (Andronopoulou et Vorgias, 2004), *Bacillus licheniformis* (Wang *et al.*, 2010), *Bacillus licheniformis* LHH100 (Laribi-Habchi *et al.*,2015), *Bacillus mannanilyticus* IB-OR17 B1(Aktuganov *et al.*,2018), *Hydrogenophilus hirschii* Ko-DZ44 (Bouacem *et al.*,2018) et *Bacillus thuringiensis* (Subbanna *et al.*,2019).

Les applications des enzymes halophiles concernent la bioremédiation, la production des polyesters et des polysaccharides (Bonete et Martinez-Espinosa, 2011), l'industrie alimentaire (production de produits fermentés avec de grandes concentrations en sel) (Thongthai *et al.*, 1992), les industries du cuir (Vidyasagar *et al.*, 2006), des détergents et du textile (Oren, 2010).

Le déroulement des procédés industriels à hautes températures présente également un avantage précieux qui est de réduire les risques de contamination bactérienne. Des avancées considérables ont été accomplies grâce à l'application des molécules thermophiles dans des domaines aussi importants que la santé, la recherche scientifique, l'industrie pharmaceutique, alimentaire ou celle des détergents et d'autres applications biotechnologiques générant des produits hautement utiles, et dans le domaine de la biologie moléculaire (Bergquist *et al.*, 1992; Lawyer *et al.*, 1989; Colombo *et al.*, 1992).

1.6. Les bactéries extrêmophiles étudiées

1.6.1. *Melghiribacillus thermohalophilus*

Melghiribacillus thermohalophilus est une nouvelle espèce dans un nouveau genre dans la famille *Bacillaceae*, aérobie stricte à coloration Gram positif. Elle a été isolée à partir de chott Melghir situé au sud-est de Biskra. Elle a été retenue dans le cadre d'un criblage de souches à morphologie filamenteuse thermo-halophiles mais qui s'est révélée finalement être un nouveau genre et nouvelle espèce de la famille des *Bacillaceae* (Addou *et al.*, 2015). Initialement ce nouveau taxon devait composer une nouvelle famille dans le phylum des *Actinobacteria* en raison de ses fortes similitudes morphologiques avec les membres des actinobactéries, mais les études moléculaires l'ont incluse dans la famille *Bacillaceae*.

La souche *Melghiribacillus thermohalophilus* Nari2A se développe dans une gamme de pH qui s'étend entre 5 et 9 avec un pH optimal de 7-8. Sa croissance est observée entre 35°C et 62°C. La température optimale de croissance est de 55°C ce qui fait qu'elle s'intègre dans la classe des bactéries thermophiles modérées. La souche Nari2A a la capacité de croître dans une large gamme de salinité comprise entre 0,5 % et 17 % (w/v). La croissance est inhibée en l'absence de sel. La concentration en NaCl optimale pour la croissance se situe entre 7 et 10 % (w/v) elle est donc halophile stricte modérée selon la classification de Kushner (1978).

La souche Nari2A est remarquable par sa morphologie. Elle se présente sous forme de longs filaments fins, contrairement aux espèces de la famille *Bacillaceae*, qui sont de forme bacillaire,

excepté le genre phylogénétiquement éloigné *Gracilibacillus* (Waino *et al.*, 1999) dont les cellules peuvent se présenter sous forme de filaments.

Il convient de noter que la présence de l'anteiso-C15:0 en très faible proportion dans la membrane de la souche Nari2A constitue un trait distinctif important, car l'acide gras prédominant chez les membres de la famille *Bacillaceae* est l'anteiso-C15:0.

La souche Nari2A se singularise par sa capacité à vivre dans des conditions qui réunissent fortes température et salinité. Les bacilli thermohalophiles sont rares, les plus connus appartiennent à l'espèce *Bacillus licheniformis* isolée de divers habitats. En effet, la capacité à cumuler les deux caractères thermophile et halophile est rarement rapportée chez les genres de la famille *Bacillaceae*. Les membres aérobies thermophiles de cette famille ayant des optima de croissance dans la gamme comprise entre 45 et 70°C sont classés dans la famille des *Bacillaceae*, *Alicyclobacillus*, *Brevibacillus*, *Aneurinibacillus*, *Sulfobacillus*, *Thermobacillus*, *Geobacillus* et *Thermolongibacillus* (Sneath, 1986; Wisotzkey *et al.*, 1992; Dufresne *et al.*, 1996; Heyndrickx *et al.*, 1997; Touzel *et al.*, 2000; Coorevits *et al.*, 2011; Cihan *et al.*, 2013). Le caractère halophile n'a pas été rapporté pour ces genres, excepté pour les espèces du genre *Bacillus*.

La gamme de NaCl tolérée (0,5-17 % de (w/v)) par la souche Nari2A est similaire à celles de *Thalassobacillus devorans* et *Pontibacillus chungwhensis* (Lim *et al.*, 2005a), mais différente de celles des espèces halophiles modérées phylogénétiquement proches *Virgibacillus kekensis*, *Sediminibacillus halophilus* et les espèces des genres de parenté éloignée *Bacillus* (Ventosa *et al.*, 1989; Fritze, 1996), *Halobacillus* (Spring *et al.*, 1996), *Gracilibacillus* (Wainø *et al.*, 1999), *Filobacillus* (Schlesner *et al.*, 2001), *Lentibacillus* (Yoon *et al.*, 2002) et *Tenuibacillus* (Ren et Zhou, 2005).

1.6.2. La famille des *Thermoactinomycetaceae*

La famille *Thermoactinomycetaceae* a été proposée par Matsuo *et al.* (2006) pour inclure 6 genres différents : *Thermoactinomyces* sensu stricto (Yoon *et al.*, 2005), *Laceyella*, *Thermoflavimicrobium*, *Seinonella*, *Planifilum* (Hatayama *et al.*, 2005) et *Mechercharimyces* (Matsuo *et al.*, 2006). D'autres genres ont été décrits plus tard dans cette famille comme les genres *Shimazuella* (Park *et al.*, 2007), *Desmospora* (Yassin *et al.*, 2009) *Kroppenstedtia* (Von Jan *et al.*, 2011), *Marininema* (Li *et al.*, 2012), *Lihuaxuella* (Yu *et al.*, 2012) et *Hazenella* (Buss *et al.*, 2013). La description de la famille a fait l'objet d'une première émendation par Yassin *et al.*, (2009), puis une seconde fois par Von Jan *et al.*, (2011) qui ont inclus les membres (*Kroppenstedtia*) qui contiennent l'isomère de l'acide LL-diaminopimélique dans la paroi cellulaire; alors que la famille *Thermoactinomycetaceae* ne renfermait que les membres possédant l'isomère méso-DAP dans leur paroi. Les membres de cette famille sont aérobies, Gram-positif et chimio-organotrophes. Ils forment un mycélium de substrat bien développé, ramifié et cloisonné ; et un mycélium aérien abondant de couleur blanche ou jaune. Ils sont pour la plupart thermophiles ou thermotolérants cependant les espèces mésophiles *Seinonella peptonophila* (Nonomura et Ohara, 1971; Yoon *et al.*, 2005), *Mechercharimyces mesophilus*, *M. asporophorigenens* (Matsuo *et al.*, 2006) et *Shimazuella kribbensis* (Park *et al.*, 2007) font exception.

1.6.2.1. L'espèce *Melghirimyces algeriensis*

Melghirimyces algeriensis (*Melghirimyces algeriensis* gen. nov., sp. nov. a été proposé, en référence au chott Melghir, le site d'isolement de la souche) est une bactérie thermohalophile désignée NariEX et isolée du sol de chott Melghir. L'identification moléculaire de cette dernière a indiqué qu'elle occupait une position phylogénétique nouvelle au sein de la famille *Thermoactinomycetaceae*. Cette famille initialement placée au sein du phylum *Actinobacteria* en raison de la morphologie mycélienne des espèces qu'elle regroupe, a été transférée par la suite au phylum *Firmicutes*, sur la base de caractères phénotypiques et moléculaires évidents. Les membres de la famille *Thermoactinomycetaceae* sont thermophiles excepté quelques espèces. Bien qu'elles soient ubiquitaires, elles n'ont jamais été isolées d'un environnement hypersalin. La souche thermophile Nari EX, isolée de chott Melghir, ressemble aux thermoactinomycètes par un certain nombre de caractères, mais se distingue par sa capacité à se développer à de fortes concentrations en sel, ce qui en fait le premier représentant halophile de la famille. Ainsi, c'est la première souche bactérienne qui forme des colonies envahissantes la surface de la gélose à la manière d'un champignon filamenteux (Addou *et al.*, 2012)

La souche Nari EX croît à des températures comprises entre 37° C et 60°C. La température optimale de croissance se situe entre 50° C et 55°C. Elle est placée dans la catégorie des bactéries thermophiles modérées. Elle se développe dans une gamme de pH comprise entre 5 et 9,5 ; avec un optimum de croissance qui se situe entre 6 et 8. La souche NariEX tolère une large gamme de concentrations en NaCl. Elle est capable de se développer en l'absence de chlorure de sodium, et en tolère des concentrations qui atteignent les 20 % (w/v). La concentration optimale de croissance est de 10 % (w/v). Les bactéries capables de se développer en l'absence ou en présence de sel sont dites halotolérantes, selon la classification Kushner (1978). La Nari EX est considérée comme halotolérante extrême (Ventosa *et al.*, 1998).

Le métabolisme des sucres testés ne produit pas d'acides, ce qui confirme le métabolisme oxydatif chez la souche NariEX, et qu'elle est aérobie stricte. Cette dernière est révélatrice d'une diversité métabolique importante, en raison de sa capacité à utiliser un grand nombre de substrats organiques simples comme seules sources de carbone, et d'hydrolyser des substrats complexes. Cette grande diversité métabolique peut expliquer la capacité de la souche à coloniser le sol d'une sebkha pauvre en nutriments.

La souche NariEX possède des caractères compatibles avec son affiliation à la famille *Thermoactinomycetaceae* telle qu'elle a été décrite par Matsuo *et al.*, (2006). Elle est aérobie, Gram positif et thermophile. Sa morphologie ressemble à celle des actinobactéries par la formation d'un mycélium aérien et de substrat développés de couleur jaune pâle. Le mycélium aérien est droit à flexueux et porte une endospore à son extrémité. Cette micromorphologie est similaire à celle de *Desmospora activa* et *Kroppenstedtia eburnea*. A cela s'ajoute son faible contenu génomique en GC % (47,3). Toutefois, d'importantes dissemblances distinguent la souche NariEX des espèces apparentées. NariEX est remarquable parmi les membres de la famille *Thermoactinomycetaceae* par son aptitude à tolérer de fortes concentrations en sel, ce qui fait qu'elle constitue le premier représentant halophile de la famille.

La souche NariEX est différente de ses plus proches parents phylogénétiques *Kroppenstedtia eburnea* et *Desmospora activa* par le profil des ménaquinones. En effet NariEX, contient en plus du MK7 comme ménaquinone dominante, les ménaquinones MK6 et MK8, alors que *K. eburnea* et *D. activa* possèdent exclusivement le MK7. NariEX est la seule souche qui possède

le ménaquinone MK6, ce qui la différencie des autres représentants de la famille *Thermoactinomycetaceae*.

1.6.2.2. L'espèce *Melghirimyces thermohalophilus*

Melghirimyces thermohalophilus a été isolée du sol de chott Melghir. Elle représente la deuxième nouvelle espèce du nouveau genre *Melghirimyces* au sein de la famille *Thermoactinomycetaceae*.

La souche Nari11A se développe dans une gamme de pH comprise entre 5 et 10. Le pH optimal de croissance se situe entre 6 et 8. La température optimale favorisant le développement de Nari11A se situe entre 50 et 55°C sur une gamme comprise entre 43-60°C. Ce caractère permet de classer la souche parmi les microorganismes thermophiles modérés. La souche Nari 11A croît en présence de concentrations en NaCl comprises entre 5 et 20% (w/v). La croissance est totalement inhibée en l'absence de sel. L'optimum de croissance est observé entre 10 % et 12% (w/v). La souche Nari11A est une bactérie halophile stricte, qui requiert le sel pour la croissance, contrairement aux espèces halotolérantes.

La souche n'utilise aucun substrat comme seule source de carbone. Par ailleurs, la souche hydrolyse les substrats complexes protéiques ou riches en peptides. Elle dégrade la caséine, la gélatine, l'extrait de levure, l'extrait de viande et la peptone. La souche étudiée n'utilise pas les bases puriques et leurs dérivés adénine, hypoxanthine et xanthine comme source d'azote. La souche est catalase négative.

La souche Nari 11A se singularise par son caractère halophile strict, étant incapable de croître en l'absence du NaCl, contrairement à *M. algeriensis* qui présente un caractère d'halotolérance. Les autres membres décrits de la famille *Thermoactinomycetaceae* quant à eux font partie de la catégorie des microorganismes non-halophiles.

Bien que les membres de la famille *Thermoactinomycetaceae* soient isolés de divers habitats comme les sédiments marins (Matsuo *et al.*, 2006); les sources thermales (Zhang *et al.*, 2007), le compost (Song *et al.*, 2001), les sols volcaniques (Zhang *et al.*, 2010), la souche Nari 11A est la première de cette famille à être isolé d'un environnement hypersalin.

Le caractère halophile des deux espèces décrites dans le genre reflète l'adaptation à leur habitat hypersalin. Car *M. algeriensis* et *M. thermohalophilus* constituent les premiers représentants halophiles de la famille. Cela conforte l'hypothèse qui stipule que les espèces halophiles sont en général phylogénétiquement apparentées à des taxons halophiles et non halophiles dans le même ordre ou phylum (Mesbah et Wiegel, 2005).

Chapitre 2 :
Matériel et Méthodes

2.1. Culture des souches étudiées

Trois nouvelles souches bactériennes extrêmophiles ont fait l'objet du présent travail. Il s'agit de *Melghirimyces algeriensis* Nari EX, *Melghirimyces thermohalophilus* Nari 11A et *Melghiribacillus thermohalophilus* Nari 2A. Elles ont été isolées et caractérisées dans le cadre d'une recherche ciblant les actinobactéries thermohalophiles (Addou, 2013). Il y a lieu de préciser qu'aucun travail sur les métabolites issus de ces nouveaux taxons n'a été effectué auparavant. Aussi, nous nous sommes proposé d'étudier leur métabolome en vue de mettre en évidence des molécules potentiellement nouvelles et utiles.

Les deux premières souches ont été apparentées aux actinobactéries alors que la troisième est une bactérie filamenteuse atypique sur le plan morphologique mais a été incluse comme nouveau genre dans la famille *Bacillaceae* du fait de sa proximité génétique. Ces souches ont été revivifiées sur le milieu ISP 2 liquide dans la composition est la suivante : glucose (4 g/l), extrait de levure (4 g/l), extrait de Malt (10 g/l), CaCo₃ (2 g/l), H₂O (1L), auquel nous avons ajouté du NaCl à raison de 10%. Des Erlenmeyers de 100 ml remplies de 20 ml, inoculés et incubés à 55°C pendant 15 jours.

2.2. Criblage des trois souches retenues pour la production de molécules bioactives

2.2.1. Tests d'antagonisme

Ce criblage consiste à tester les trois souches pour la recherche de molécules bioactives. La production des substances inhibitrices extracellulaires est mise en évidence par des tests d'antagonisme utilisant la technique des cylindres d'agar (Tortorano *et al.*, 1979). Son principe se base sur la diffusion de l'agent antimicrobien susceptible d'être produit par les 3 souches dans un milieu gélosé, préalablement inoculé avec des germes-cible suivants :

- Des bactéries : *E. coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. aureus* résistant à la méthicilline (MRSA) ATCC 43300, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 15307, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

- Des mycètes : *Aspergillus niger* CIP 1431, *Fusarium oxysporium* CIP 62572 et *Saccharomyces cerevisiae*.

- Des Archaea ; des souches isolées et identifiées par Quadri *et al* (2016) ont aussi été employées comme germes-cible. Il s'agit de *Halostagnicola kamekurae* ADR6A, *Natrinema pallidum* ADR3, *Halorubrum saccharovororum* AMR1, *Haloarcula californiae* AMR3, *Haloferax mediterranei* SAG3.

La technique des tests d'antagonismes est réalisée de la manière suivante : Les germes-cible sont obtenues après isolement de trois colonies pures et leur transfert dans 5 ml d'eau physiologique, contenant 9 g/l de NaCl pour les bactéries et 200 g/l de NaCl pour les Archaea. Elles sont ensuiteensemencées, chacune, selon leur position taxonomique, dans un milieu correspondant : Muller Hinton pour les bactéries, Sabouraud pour les mycètes et DM pour les Archaea, (leur composition est donnée dans l'annexe1). Des disques d'agar de 5 mm de diamètre contenant les trois souches retenues sont déposés à la surface des boîtes, préalablementensemencées avec le germe-cible. L'incubation se fait à 37°C pendant 24h pour les bactéries,

40°C pendant 7 jours pour les *Archaea* et 25°C pendant 7 jours pour les mycètes. Des disques de milieu ne contenant pas les trois souches ont été utilisés comme contrôle pour vérifier que l'activité antagoniste n'est pas due à la forte concentration en sel. Toute zone d'inhibition de croissance autour des disques, même de faible diamètre, est considérée comme résultat positif.

2.2.2. Etude des produits bioactifs élaborés par les souches actives

2.2.2.1. Etude de la cinétique de croissance et de production

La souche *Melghiribacillus thermohalophilus* Nari2A a produit une substance inhibitrice très active vis-à-vis de la souche-cible *Halorubrum saccharovorum* (AMR1). Une étude plus approfondie lui a donc été consacrée.

En premier lieu, nous avons suivi la cinétique de croissance et de production de la molécule active et déterminé sa localisation intra ou extra-cellulaire. Une série de tests a été réalisée pour mesurer la croissance de la souche productrice (DO =600 nm) et le diamètre de la zone d'inhibition en fonction du temps.

Une étape pré-culture est employée en incubant pendant 2 jours la souche Nari 2A dans un milieu ISP2 liquide. 24 Erlenmeyers contenant chacun 100 ml du même milieu sont inoculés avec 2 ml de la pré-culture et incubés à 55°C dans un incubateur-agitateur (100 rpm) pendant 56 heures.

Un Erlenmeyer est retiré toutes les 4 h et conservé à 4°C pour arrêter la croissance bactérienne.

Après 4 jours, l'ensemble des 24 erlenmeyers est retiré de la chambre froide et la densité optique est mesurée par spectrophotométrie (JENWAY 6405 UV/VIS. Spectrophotometer). Les cultures débarrassées des cellules par centrifugation, ont subi une extraction avec de l'acétate d'éthyle (v/v).

Les extraits obtenus sont testés par la technique des disques de papier. Cette technique consiste à imbiber des disques de papier de 6 mm avec 200 µl d'extrait que l'on dépose sur le milieu DM solide préalablement ensemencé avec la souche-cible. Les diamètres des zones d'inhibitions sont ensuite mesurés.

2.2.2.2. Extraction du composé antimicrobien produit par la souche Nari 2A

Après avoir déterminé la phase maximale de production de l'activité inhibitrice, 30 L de culture sont produits et centrifugés à 10 000 rpm, pendant 20 min, pour séparer les cellules du milieu. Le surnageant et le culot ont été récupérés séparément. Pour extraire le composé antimicrobien, nous avons utilisé la méthode d'extraction par solvants organiques décrite par Hacène *et al.* (1994). Aux cellules (2g de culot), on ajoute 2 ml de méthanol. Le surnageant a été traité avec du n-butanol (2: 1) (v/v) et de l'acétate d'éthyle (1 :1) (v/v). L'extraction a été réalisée sous agitation pendant 24 h à température ambiante. L'extrait organique obtenu a été filtré sur papier Wattman, puis évaporé en utilisant un évaporateur rotatif. Le culot cellulaire a été récupéré dans 10 ml de méthanol puis séché à 45 °C. Les résidus secs obtenus à partir du surnageant et du culot sont finalement dissouts dans 2 ml de méthanol. L'activité antimicrobienne y a été évaluée en employant des disques de papier (6 mm de diamètre) et comparé à un témoin méthanol. Le protocole d'extraction est donné dans la figure 5. L'extrait brut obtenu est utilisé pour les différentes étapes de purification.

Le protocole d'extraction est indiqué dans la figure 5

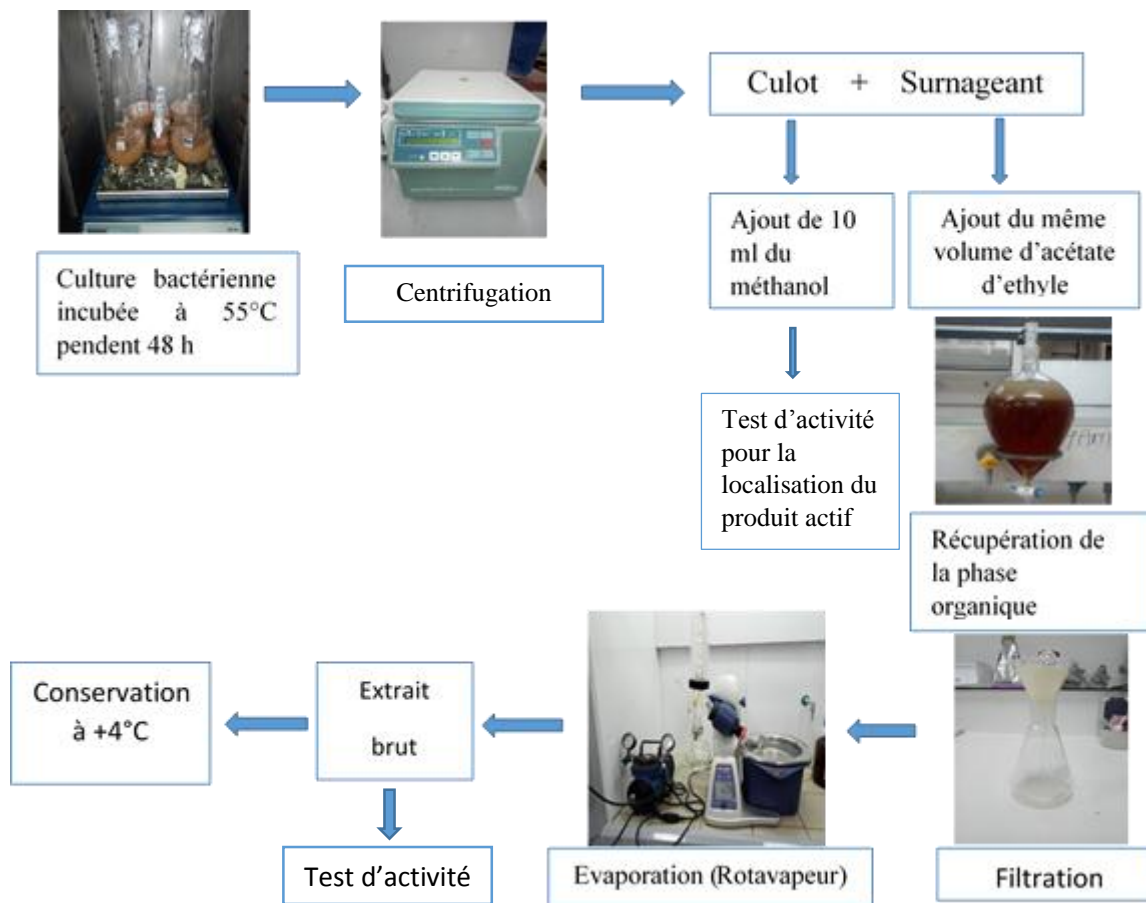


Figure 5: Procédure d'extraction du produit actif élaboré par Nari 2A.

2.2.2.3. Analyse et Séparation du produit actif par Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

L'extrait actif brut est concentré puis soumis à plusieurs étapes de séparation et de purification par chromatographie sur couche mince (CCM). Des plaques CCM en verre (20 x 20 cm) contenant du gel de silice (Merck 60 F254) ont été utilisées. La technique repose principalement sur des phénomènes d'adsorptions. La phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progressent le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre. Le système de solvants utilisé est le dichlorométhane (100 ml) pour la première chromatographie et un mix de solvants pour la seconde (100 ml de dichlorométhane + 5 ml de méthanol). L'atmosphère des cuves de chromatographie est mise à saturer pendant 2 h avant l'introduction des plaques. Après le dépôt de l'extrait actif sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature chimique et de celle du solvant. Les tâches peuvent être visibles à l'œil nu ou sous UV (λ 365nm ou 254nm).

Les plaques CCM ont été d'abord activées à 100 °C. 150 μ l de l'extrait éthylique de la souche Nari 2A sont déposés progressivement sous forme de 18 spots, à l'aide d'une micropipette et

sont séchés sous courant d'air froid. Les dépôts ont été réalisés à 3 cm du bord inférieur de la plaque et à partir de 1cm des bords latéraux.

Les plaques sont ensuite introduites verticalement dans la cuve de CCM contenant le système éluant. La migration est arrêtée lorsque le front du système éluant a atteint 1cm du bord supérieur de la plaque. Après le séchage, les taches qui apparaissent sur le chromatogramme sont observées à l'œil nu et sous une lampe à UV (365nm ou de 254nm).

2.2.2.4. Révélation microbiologique par bioautographie

La bio-autographie est un procédé de révélation microbiologique indispensable pour localiser l'activité antimicrobienne directement sur un chromatogramme. C'est une technique qui est combiné à la CCM. Elle permet de déterminer la couleur et le Rf (rapport frontal) des taches actives. Après évaporation du solvant de migration, la plaque est déposée dans une grande boîte en verre confectionnée par nous-mêmes. Le dispositif est ensuite stérilisé sous UV pendant une nuit. Ensuite, 50 mL de milieu DM préalablement ensemencé avec la souche cible est réparti uniformément sur la plaque de gel de silice. Après solidification du milieu, les boîtes sont incubées à 40°C. La lecture se fait après 7 jours.

Les zones d'inhibition des tâches actives sont alors observées et le rapport frontal (Rf) de la molécule active est calculé selon la formule suivante :

$Rf = \text{Distance de migration entre le dépôt et la tache} / \text{Distance de migration entre le dépôt et le front de l'éluant}$.

- **Test de confirmation**

Pour confirmer le test précédent, chaque fraction a été récupérée séparément dans 1ml du méthanol, filtrée afin d'éliminer la silice puis déposées sur des disques de papier Whatman N°3 stériles et séchées sous un courant d'air froid. Les disques sont ensuite déposés sur la gélose préalablement ensemencée avec le microorganisme-cible (AMR1). Des disques témoins, imprégnés de solvants purs et séchés dans les mêmes conditions, sont également testés. Les boîtes sont incubées à 40°C. La mesure des diamètres d'inhibition est effectuée après 7 jours d'incubation.

Les zones claires du chromatogramme où la souche cible n'a pu se développer indiquent la présence de composé inhibiteur. Une fois la fraction active localisée, une Chromatographie préparative sur couche mince (CCM) a été réalisée.

Pour récupérer et concentrer les molécules bioactives de l'extrait actif, 2 ml de ce dernier sont déposés sous forme de trait sur des plaques de CCM. Après migration et séchage, les fractions obtenues sont repérées, grattées, remises en solution dans le même solvant, filtrées, évaporées à sec puis déposées sur des disques de papier de 6 mm pour effectuer le test d'antibiographie. L'extrait actif purifié par CCM est appelé ATA.

2.2.2.5. Etude de la stabilité de l'extrait actif (ATA)

a) Effet du pH

L'extrait actif (ATA) a été ajusté aux valeurs de pH suivants : 4, 5, 7, 8, 9 et 10 avec des solutions stériles de HCl ou de NaOH 1N. Après 6h de contact à 4°C, l'activité anti-archéenne est recherchée par antibiographie dans les différents échantillons et comparée à celle d'un témoin (ATA) non traité de pH = 6.

b) Effet de la température

La thermosensibilité de la molécule bioactive a été étudiée en traitant l'extrait (ATA) à différentes températures : 4°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C et 100°C pendant 1h et à 120°C pendant 20 min (cycle d'autoclavage). L'activité anti-archéenne est mise en évidence par antibiographie puis comparée à celle d'un témoin (extrait actif non traité incubé à 55°C).

2.2.2.6. Essai de détermination de la nature chimique de l'extrait actif (ATA)

Le composé (ATA) a été traité avec la protéinase K (Promega) (1 mg/ml) (V/V) et du charbon actif. Après une heure, l'activité résiduelle est testée par antibiographie et comparée avec celles d'un témoin non traité.

2.2.3. Caractérisation chimique du produit actif

La molécule active obtenue après plusieurs CCM a été utilisée pour élucider sa structure chimique, en employant plusieurs techniques spectroscopiques. L'élucidation structurale des molécules organiques ayant des activités biologiques tels que les antibiotiques, se base sur l'emploi de techniques chromatographiques (CCM, HPLC, LC-MS...), et des techniques spectroscopiques (UV-visible, Infrarouge ou Résonance Paramagnétique Electronique...). Ces méthodes sont complémentaires et souvent l'élucidation de la structure chimique de la molécule recherchée est obtenue par la combinaison de leurs résultats respectifs. Les spectres UV qui fournissent moins de renseignements sur la structure moléculaire des composés comparés aux spectres RMN et IR, sont utilisés soit pour une confirmation soit pour une identification grâce à des règles empiriques et à la comparaison avec des spectres de références.

2.2.3.1. Spectre UV de l'extrait actif

Une analyse de spectroscopie UV-visible est effectuée sur l'extrait brut. Ce dernier est dissout dans du méthanol, une cuve de solvant qui servira de référence a été préparée pour l'obtention d'un spectre d'absorption de la molécule dans un domaine compris entre 200 nm et 800 nm.

2.2.3.2. Etude par Infra-rouge de produit actif

L'examen spectrophotométrique est réalisé à une absorption entre 700 à 4000 cm⁻¹ à l'aide d'un spectrophotomètre de type Agilent Technologies Cary 600FTIR Spectrometer. L'échantillon se présente sous forme de poudre (l'extrait actif après évaporation jusqu'à l'obtention d'un produit sec). Il a été étalé à l'aide d'une spatule sur la surface centrale du diamant. Les mesures ont été réalisées automatiquement toutes les deux minutes.

2.2.3.3. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est une technique instrumentale basée sur les mêmes principes que ceux de la chromatographie classique sur colonne.

Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne et grâce à un détecteur approprié, les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme.

Les analyses par Chromatographie Liquide Haute Performance de l'extrait brut (ATA) ont été réalisées en utilisant un appareil de type Young Line 9100 (HPLC) avec un détecteur UV-visible (190-1100).

La colonne analytique utilisée concerne : Agilent Eclipse XDB C18 5 μm (4,6x150 mm) avec une porosité de 100Å°.

Des gradients sont réalisés à partir de l'eau +1% d'acide acétique et de méthanol (MeOH) pour HPLC. Le gradient initial est 5% de méthanol dans l'eau et le gradient final est de 95% de MeOH dans l'eau suivi par une phase de rééquilibrage pendant 5 min. Le débit de l'éluant est de 1 ml/min. La détection se fait à 254 et 280 nm. Ces conditions de purification ont été déterminées après plusieurs expériences préliminaires. L'extrait (ATA) purifié par CCM est dissout dans 1 ml de méthanol, ultrafiltré à l'aide d'un filtre 0,45 μM , puis injecté à raison de 20 μL par injection. Les molécules ou les sous-fractions sont observées sur le chromatogramme et le temps de rétention de la molécule active est déterminé.

2.2.3.4. Spectrométrie de Masse

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse physico-chimique permettant de détecter, d'identifier et de quantifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse. Son principe réside dans la séparation en phase liquide de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). De plus, cette analyse peut permettre dans certains cas la caractérisation de la structure chimique des molécules en les fragmentant. Tous les procédés de spectrométrie de masse reposent en effet sur les déplacements de particules chargées dans des champs électromagnétiques. Cela nécessite donc, pour que l'analyse d'une substance organique soit réalisable en spectrométrie de masse, une étape préalable d'ionisation de l'échantillon.

10 μl de l'extrait ATA obtenue après purification par CCM a été analysée par électro-pulvérisation par chromatographie liquide spectrométrie de masse induite par ionisation/collision (LC-ESI/CID-MS) dans les mêmes conditions que celles de la HPLC. La LC-ESI/CID-MS est un outil utile pour identifier les molécules bioactives et peut analyser de petites quantités d'échantillons. L'analyse a été effectuée avec un spectromètre de masse : Agilent 6420 Triple quad LC/MS et un chromatographe HPLC : Agilent 1260 infinity. La source d'ionisation est l'Electrospray (ESI), L'aiguille fonctionnant à une tension capillaire de 4000 V. Pour cette expérience, l'Azote (N_2) a été utilisé comme gaz de séchage à 300°C, le débit du gaz de séchage est de 7 L/min. La colonne Poroshell 120 EC-C18 (Agilent, long 50 mm * 3.0 mm * 2.7 μmMS). La phase mobile était constituée de 40% d'acétonitrile et 60 de H_2O (0.1% acide formique) avec un débit égale à 0.3 ml/min. L'acquisition de données était en mode négatif.

2.2.3.5. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une méthode spectroscopique polyvalente utile aussi bien en analyse quantitative que structurale. Elle est généralement utilisée en complément des autres méthodes de spectroscopie classiques et de la spectrométrie de masse pour localiser les atomes, préciser la formule développée et la stéréochimie du composé étudié.

Elle est fondée sur la mesure de l'absorption de la radiation de radiofréquence (RF) par un noyau atomique dans un champ magnétique fort. L'absorption de la radiation pousse le spin nucléaire à se réaligner ou à retourner dans la direction de la plus haute énergie. Après avoir absorbé l'énergie, les noyaux atomiques réémettent une radiation RF et retournent à leur état initial de moindre niveau d'énergie.

Les expériences de résonance magnétique nucléaire ont été réalisées avec un spectromètre Bruker (Fremont, USA) Avance 400 MHz en utilisant comme solvant le chloroforme déterré CDCl_3 . Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm (partie par million) et calibrés par rapport au TMS (Tétraméthylsilane). Les constantes de couplage (J) sont exprimées en Hertz (Hz). La multiplicité des signaux est donnée par les abréviations suivantes : s (singulet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet) et m (multiplet).

Le spectre RMN est constitué d'un diagramme représentant des signaux de résonance émis par certains noyaux atomiques de l'échantillon. Pour obtenir ces signaux, l'échantillon (extrait actif et la fraction active) est soumis à l'action conjointe de deux champs magnétiques dont l'un est intense et fixe, tandis que l'autre est environ 10.000 fois plus faible et variable.

L'exploitation des spectres et les attributions des signaux ont été réalisées en utilisant le logiciel CMC/NMR.



Figure 6 : L'appareillage de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) utilisée (Laboratoire du CRAPC).

- **RMN unidimensionnelle (RMN 1D)**

L'analyse s'effectue par le biais d'une excitation non spécifique en utilisant une impulsion de radiofréquence. Cette dernière est restituée par l'échantillon (réponse/relaxation). Cette onde électromagnétique est enregistrée et analysée par transformation de Fourier. Le spectre RMN est un graphe de l'intensité en fonction du déplacement chimique. Vu la différence de taille et par conséquent la densité de charge des noyaux, la fréquence effective du champ magnétique est 4 fois plus importante pour le proton ^1H que le noyau ^{13}C soit 400 MHz pour ^1H et 75 MHz pour ^{13}C .

- **RMN bidimensionnelle (RMN 2D)**

La RMN 2D permet en fait de montrer les corrélations complexes existant entre le spin A et le spin X. Ces spectres sont particulièrement utiles pour étudier les molécules complexes (plusieurs atomes couplés entre eux, couplage à longue portée...). L'acquisition d'un spectre RMN 2D se fait à partir d'une séquence d'impulsion constituée de trois intervalles de temps distincts et identique à celles utilisées dans les expériences 1D. On distingue le temps de préparation (prépare le spin à étudier), le temps d'évolution t_1 (évolution du spin vers sa position d'équilibre) et le temps de détection t_2 (enregistre l'évolution de l'aimantation). Les expériences diffèrent par les noyaux étudiés et les couplages qui sont mis en jeu. On distingue :

- Corrélation quantique unique hétéronucléaire (HSQC) : elle met en évidence les couplages scalaires $1J\text{ C-H}$
- Corrélation hétéronucléaire Liaison Multiple (HMBC) : elle met en évidence les couplages scalaires $2J\text{ C-H}$ et $3J\text{ C-H}$
- Spectroscopie de Corrélation (COSY) : elle met en évidence les protons qui sont couplés de façon scalaire.
- Spectroscopie à effet nucléaire Overhauser (NOESY) : elle met en évidence les signaux de deux noyaux en interaction dipolaire.

2.3. Détermination des activités hydrolytiques

2.3.1. Tests d'activités enzymatiques

En plus des activités antimicrobiennes, nous avons cherché à connaître le potentiel de production d'enzymes des trois souches retenues dans cette étude. Pour cela, nous avons entrepris un criblage des enzymes hydrolytiques extracellulaires sur milieu minéral. Ce milieu contient 100g/l de NaCl et 2g/l de CaCo₃. Pour obtenir un milieu solide, 20 g.l⁻¹ de Bacto-agar ont été ajoutés. Pour l'ensemble des tests, la souche Nari 2A est incubée pendant 48h à 55°C, alors que les deux autres souches du genre *Melghirimyces* sont cultivées pendant 7 jours à 55°C.

A- Recherche de l'amylase

La présence de l'activité amylolytique est déterminée qualitativement selon la méthode décrite par Amoozegar *et al.* (2003), en utilisant le milieu minimum (annexe 1) additionné de 1% (p/v) d'amidon soluble. Après l'ensemencement par spot et l'incubation des souches, la production d'amylase a été déterminée par le développement d'une zone (halo) incolore entourant la colonie lorsque la solution de lugol (1% d'iode dans 2% iodure de potassium) a été ajoutée à la surface du milieu.

B- Recherche de la caséinase

L'hydrolyse de la caséine a été étudiée sur un milieu gélosé contenant 50% de lait écrémé, la présence de cette activité est détectée par un halo clair autour de spot indiquant l'hydrolyse de la caséine. Un résultat négatif ne montre aucune zone d'hydrolyse autour de la culture (De Vos *et al.*, 2009).

C- Recherche de la lécithinase

Le milieu à base de jaune d'œuf est un milieu complexe qui contient de la lécithine, des triglycérides et des lipoprotéines. On utilise pour ce test, le milieu minimum additionné de 20 ml d'une émulsion de jaune d'œuf. La présence d'une lécithinase se traduit par un halo opaque blanc jaunâtre à bordures nettes autour de la colonie.

D- Détermination de l'activité cellulolytique

La présence de cellulase est examinée sur milieu minimum contenant 0,5% (p/v) de Carboxy Méthyl Cellulose. Après l'incubation, les boîtes sont pulvérisées avec une solution de rouge Congo à 0,1% (p/v) et incubées pendant 15 à 30 minutes. L'apparition de zones claires autour des colonies indique la présence de cellulase (Farkas *et al.*, 1985).

E- Détermination de l'activité lipolytique

La recherche d'estérase est effectuée par le test d'hydrolyse du Tween 20, 80 et de l'huile d'olive. Cette activité est recherchée sur milieu minimum contenant 1% (v/v) de Tween 80 ou de Tween 20 ou l'huile d'olive et de 0,1g/l de CaCl₂. L'ensemencement des souches est effectué par spots. Après incubation, elle se manifeste par l'apparition d'une auréole opaque autour de la culture, le développement d'un précipité des cristaux autour des colonies témoigne de la présence d'une estérase.

F- Détermination de la dégradation des hydrocarbures

Le milieu de culture adopté dans ce test est le milieu minimum qui ne contient aucune source de carbone. La technique consiste à ensemencer la souche test en spot puis à pulvériser immédiatement l'hydrocarbure (gasoil filtré) sur la boîte Pétri. Un résultat positif se traduit par l'apparition des colonies (croissance comparée avec celle d'un témoin sans gaz oil) après l'incubation à 55°C (Rodrigo *et al.*, 2005).

G- Recherche de la chitinase

La chitine colloïdale préalablement préparée par la méthode de Roberts et Selitrennikoff (Roberts *et al.*, 1988) a été rajoutée au milieu minimum qui est ensuite ensemencé et incubé. Le résultat positif se traduit par l'apparition des colonies entourées d'une zone claire.

2.3.2. Sélection de la souche à activité chitinase

Suite au criblage de l'activité hydrolytique des trois souches, la souche Nari 2A s'est révélée particulièrement intéressante par son activité chitinolytique. Cette activité a retenu également l'attention de chercheurs du centre de biotechnologie de Sfax (CBS, Tunisie) qui nous ont grandement aidés dans son étude approfondie. Aussi, l'étude et la caractérisation de cette activité chitinase y a été réalisées sous la direction du Dr Jaouadi et l'aide du Dr Mechri. Cette partie du travail a abouti à la mise au point d'une publication (Mohamed *et al.*, 2019) qui est jointe à cette thèse. Nous en rappelons les plus importantes parties effectuées.

2.3.3. Étude de la chitinase purifié

- **Cinétique de croissance et de production de la ChiA-Mt45**

Afin de suivre la cinétique de croissance de la souche Nari 2A et de production de l'enzyme ChiA-Mt45, nous avons réalisé une série de tests qui consistent à mesurer la croissance de la souche productrice (poids sec) et la production à l'aide d'un spectromètre, toutes les 4 heures.

2.3.4. Essai d'activité chitinase

2.3.4.1. Production de la chitinase

La souche Nari2A isolée était cultivée dans des Erlenmeyers (de 1000 ml) contenant le milieu ISP2 liquide à 55 °C pendant 96 h sous agitation (200 trs/min). La croissance bactérienne a été estimée en mesurant la densité optique à 600 nm et a été convertie en poids sec cellulaire (g/l). Dans cette condition optimale, l'activité maximale de la chitinase était 9000 U/ml.

2.3.4.2. Procédure de purification de l'enzyme

500 ml d'une culture de 48 h de la souche Nari 2A a été centrifugée pendant 30 minutes à 9000g pour extraire la biomasse cellulaire. Le surnageant contenant la chitinase extracellulaire (enzyme brute) a subi d'abord un traitement thermique de 90 °C pendant 20 min. Après le refroidissement rapide, les protéines dénaturées insolubles ont été éliminées par centrifugation (30 minutes à 9000g). Les protéines restantes dans le surnageant ont été purifiées par chromatographie liquide de performance rapide (FPLC). Le système utilise une ONU S-1 la colonne (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, les USA) équilibré à 50 mM 4 - (2-hydroxyethyl) - acide 1-piperazineethanesulfonic (HEPES) tampon contenant 2 mM CaCl₂ à pH 6.1 (tampon B). La colonne (7 mm × 35 mm) a été rincée avec 500 ml du même réducteur. Le matériel adsorbé était élué avec un gradient du NaCl linéaire (0-500 mM dans le tampon B) à un taux de 60 ml/h. Après un lavage avec le même tampon B, Les fractions de protéine non

adsorbées ont été éluées. Les fractions révélant l'activité chitinase ont été unies et purifiées par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) le système utilise le tampon à pH 6.1 complété avec 2 mM CaCl₂ (tampon C). Les protéines ont été séparées par l'éluion isocratique à un débit de 45 mL/h avec le tampon C et détectées en utilisant un détecteur Spectrophotométrique UV-VIS (Knauer, Berlin, l'Allemagne) à 280 nm. Les fractions unies, avec le temps de rétention de 10.909 minutes et contenant l'activité chitinase, ont été concentrées dans des micro-concentrateurs centrifuges (Amicon Inc., Beverly, MA, les USA) avec des membranes de suspension 10-kDa. Elle été stockées à -20 °C dans du glycérol de 20 % (v/v) la solution pour des analyses plus approfondies.

2.3.4.3. Quantification des protéines, électrophorèse et spectrométrie de masse

Les teneurs totales en protéines ont été déterminées selon la méthode de Bradford (1976). 12% de sodium dodécyl sulfate-polyacrylamide du gel électrophorèse (SDS-PAGE) a été utilisé (Laemmli *et al.*, 1970). La masse moléculaire de la protéase purifiée a été déterminée par PAGE sous des conditions dénaturantes et non dénaturantes.

Les bandes de protéine ont été visualisées avec le Bleu de Coomassie (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, les USA). L'analyse Zymography a été contrôlée en utilisant la chitine azurée comme substrat (Laribi-Habchi *et al.*, 2012). Le produit final a été codifié et appelé ChiA-Mt45.

2.3.4.4. Dégradation Edman

Les bandes de ChiA-Mt45 purifiées ont été séparées sur des gels SDS et transférées à une membrane ProBlott (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) et l'analyse d'ordre NH₂-terminale a été exécutée par la dégradation d'Edman automatisé. Celle-ci utilise un Modèle de Biosystème Appliqué 473A le séquenceur en phase gazeuse (le Perkin-Elmer, la Division Biosystème Appliquée), dans le mode d'impulsion liquide. Les résidus d'acides aminés ont été détectés comme des signaux individuels.

2.3.4.5. Caractérisation biochimique de la chitinase purifiée ChiA-Mt45

- **Influence d'ions métalliques, inhibiteurs spécifiques et agents de réduction**

L'effet des réactifs chimiques sur l'activité de ChiA-Mt45 a été étudié en utilisant différentes concentrations des réactifs suivants ; acide p-Chloromercuribenzoïque (p-CMB), acide Dithionitrobenzoïque (DTNB), dithiothreitol (DTT), 2-mercaptoethanol (2 - ME), acide 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic (TNBS), phenylmethylsulfonyl fluorure (PMSF), 1-ethyl-3-carbodiimide (3-diméthylaminopropyl) (EDC), diethylpyrocarbonate (DEP), N-bromosuccinimide (NBS) et N-acetylimidazole (NAI), a été analysé aux différentes concentrations pour leurs effets sur l'activité d'enzyme. L'activité Chitinase mesurée en absence de ces inhibiteurs ou réduction de l'agent est employée comme contrôle (100 %). L'effet d'ions métalliques divalents différents (Ca⁺², Mg⁺², Mn⁺², Co⁺², Cu⁺², Zn⁺², Ba⁺², Fe⁺², Ag⁺², Al⁺², Cd⁺², Hg⁺² et Ni⁺²), aux 2 concentrations (2 et 10 mm), sur l'activité chitinase ont été examinés en les ajoutant au mélange de réaction. L'enzyme non-traitée et dialysée a été considérée comme 100 % pour l'essai d'ion métallique.

- **Effet du pH**

L'effet du pH sur l'activité de la chitinase a été évalué sur la gamme de pH de 2 à 10 dans des conditions d'essai standard. Les systèmes suivants du tampon, complétés avec 2 mM CaCl₂, ont été utilisés à 50 mM: Glycocolle-HCl pour pH 2-3, citrate pour pH 3-5, 2 - (N-morpholino) acide ethanesulfonique (MES) pour pH 5-6, HEPES pour pH 6-8, Tris-HCl pour pH 8-9 et glycocolle-NaOH pour pH 9-10. La stabilité de la chitinase purifiée au pH a été testée par la préincubation dans des tampons à pH différents (pH 2, pH 3, pH 4, pH 5, pH 6) à la température d'essai standard pendant 24 h.

- **Effet de la température**

Pour étudier l'effet de température sur la stabilité de l'activité chitinase, un essai standard a été exécuté aux températures allant de 40 à 100 °C avec des intervalles de 5 °C. L'enzyme a été évaluée en incubant la chitinase (ChiA-Mt45) à 70, 80, 90 et 100 °C sans aucun substrat pendant 24 h en présence et absence de 2 mM CaCl₂. Ensuite l'activité d'enzyme résiduelle a été mesurée en utilisant l'essai standard. L'enzyme non-chauffée a été utilisée comme témoin (100 %).

- **Effet du NaCl sur l'activité de la chitinase ChiA-Mt45**

L'effet du NaCl sur l'activité de la chitinase a été étudié en mesurant l'activité de Chia-Mt45 purifiée à différentes salinités allant de 0 à 10 M NaCl pendant 24 heures à 50 °C. Les activités résiduelles ont été déterminées lors de l'essai standard. L'enzyme non préincubée a été considérée comme témoin (100 %).

Chapitre 3 :
Résultats et discussion

Bien que le nombre de molécules bioactives obtenu à partir des microorganismes ne cesse d'augmenter, une faible proportion de ces molécules aboutit à des applications effectives. La principale cause est liée à leur toxicité non sélective ou à l'étendue de leur spectre d'activité. Notre recherche s'est donc orienté en grande partie sur des activités synthétisées par de nouvelles souches extrêmophiles. Ces souches ont été retenues en raison de leur polyextrémophilie. Les polyextrémophiles cumulent des capacités de résistances multiples, résultats d'un métabolisme unique et original pouvant être valorisé sur le plan biotechnologique. L'isolement et la caractérisation des molécules bioactives est délicate, fastidieuse et coûteuse. En effet, la détermination complète de la structure chimique d'une molécule biologiquement active nécessite la combinaison de plusieurs techniques biochimiques, physico-chimiques et spectroscopiques.

3.1. Revivification des souches bactériennes retenues

Les trois souches Nari EX, Nari 11A et Nari 2A ont été isolées dans le cadre d'un programme de recherche de nouvelles souches microbiennes thermohalophiles à partir de sebkhas algériennes (Addou, 2013).

Elles ont été cultivées sur le milieu ISP2 additionné de 10% (w/v) de NaCl et incubées à 55°C.

La souche *Melghirimyces algeriensis* Nari EX se présente sous forme de grandes colonies qui adhèrent fortement à la gélose. Elles sont circulaires à bord régulier ou ondulé, plates, formant des plis radiaux de 2 à 3 cm de diamètre. L'observation sous microscope révèle un mycélium aérien composé de filaments longs, flexueux, légèrement ramifiés portant une seule endospore à leur extrémité (figure 7b).

La souche *Melghirimyces thermohalophilus* Nari 11A forme des colonies circulaires, plates, à contour irrégulier, avec des plis radiaux, de couleur marron foncé au centre qui s'éclaircit aux contours, le diamètre est de 1 à 3 cm. Le mycélium est long, droit à flexueux légèrement ramifié, et porte une spore unique à l'extrémité des hyphes (figure 7c).

La souche *Melghiribacillus thermohalophilus* Nari 2A forme des colonies de couleur beige foncé à marron de 2 à 4 mm de diamètre, opaque et légèrement brillantes, circulaires à contour régulier après 24 h à 48 h d'incubation. Elle forme de longs filaments fins de $2-100 \times 0.1-0.2 \mu\text{m}$, avec des endospores sphériques à ovales (figure 7a). Cette souche appartient à un nouveau genre faisant partie des *Bacillales* mais diffère des membres de cette famille par sa présentation filamenteuse qui a conduit à son isolement (figure 7a).

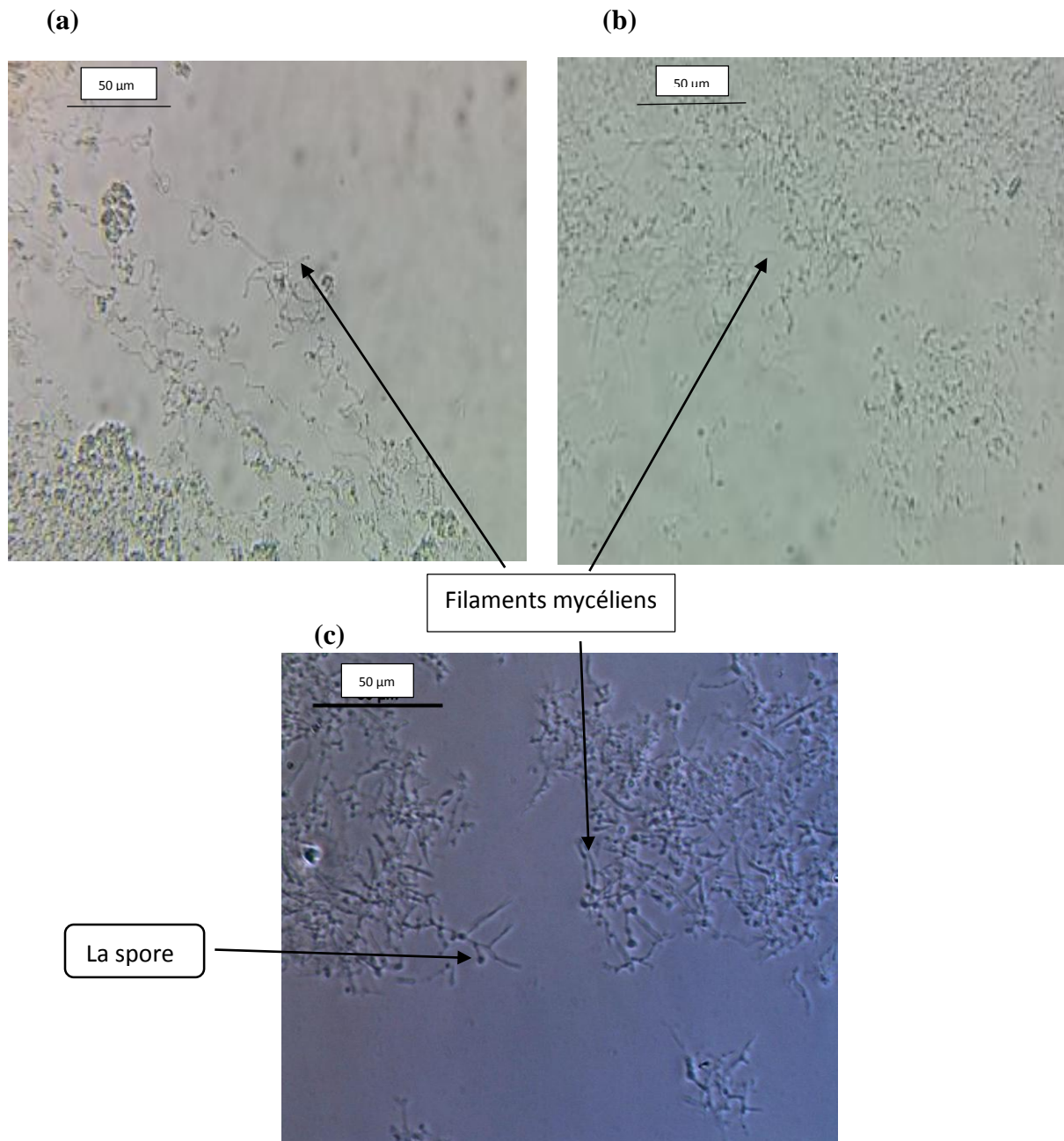


Figure 7: Aspect microscopique des trois souches *Melghiribacillus thermohalophilus* Nari 2A (a), *Melghirimyces algeriensis* Nari EX (b) et *Melghirimyces thermohalophilus* Nari 11A (c).

3.2. Etude du métabolome des trois souches étudiées

3.2.1. Tests d'antagonismes

Les trois souches ont été testées vis-à-vis d'un grand nombre de germes-cibles. Parmi ceux-ci, nous avons choisi des germes multi-résistants aux β -lactamines, aux sulfamides, à la tétracycline, à la vancomycine et au cotrimoxazole, avec objectif dédié à la recherche d'antibiotiques à structures particulières pouvant détourner ces mécanismes de résistance.

En effet, la recherche d'antibiotiques actifs contre des germes multirésistants constitue une des meilleures stratégies pour la découverte de nouveaux antibiotiques.

Les résultats de tous les tests effectués sont indiqués dans le tableau VIII. Il en ressort qu'aucune activité antibactérienne, antifongique ou antilevurienne n'a été détectée. Cependant, la souche Nari EX présente une activité vis-à-vis de *Haloarcula californiae* (AMR3) alors que la souche Nari 2A inhibe *Halorubrum saccharovororum* (AMR1).

Ces deux derniers microorganismes sont des *Archaea* isolés et caractérisés par Quadri (2016). Le profil de résistance de ces deux souches archéennes aux antibiotiques a été étudié vis-à-vis de 13 antibiotiques différents appartenant à différentes familles : Ciprofloxacine (CIP 5), Gentamicine (GEN), Penicilline (P), Vancomycine (VA), Chloramphenicol (C), Bacitracine (Bac), Novobiocine (NV), Kanamycine (K), Tétracycline (TET), Céfotaxime (CTX), Acide Nalidixique (NA), Amoxicilline (AMX), Spectinomycine (SPT). Les résultats montrent que seule la novobiocine inhibe ces deux souches d'*Archaea* (tableau IX).

Au premier abord, cette activité anti-*Archaea* semble originale car ce type d'activité n'a jamais été signalé auparavant dans la littérature. D'autre part, les deux *Archaea* sensibles à l'action des souches bactériennes testées, sont résistantes à de nombreux antibiotiques à l'exception de la novobiocine, un antibiotique aminocoumarine connue pour être produit par *Streptomyces spheroides*.

Les *Archaea* possèdent des aspects qui les rapprochent davantage des eucaryotes que des procaryotes. Il s'agit principalement des mécanismes et des protéines impliqués dans les processus liés à l'ADN tels que la réplication, la transcription, la traduction et les mécanismes de réparation (Forterre *et al.*, 2002). Des études transcriptionnelles suggèrent que les *Archaea* possèdent une mosaïque fascinante de machinerie de transcription basale eucaryotes-like (y compris l'ARN polymérase, élément promoteur, et la transcription basale facteurs TBP et TFB), et de bactéries comme les mécanismes de régulation (Yang *et al.*, 2003). Ils emploient des mécanismes génétiques similaires, mais plus simple que ceux trouvés chez les *Eucarya* (Huang, 2012). En dépit de leur ressemblance avec les bactéries, les *Archaea* s'en distinguent par de nombreux aspects importants, tels que la paroi cellulaire et la composition de la membrane. En raison de l'absence de la muréine, les *Archaea* halophiles sont naturellement résistantes aux antibiotiques actifs sur les bactéries comme la pénicilline, l'ampicilline, la cyclosérine, la kanamycine, la néomycine, la polymyxine, et la streptomycine (Bonelo *et al.*, 1984). L'activité biosynthétisée par les deux souches Nari EX et Nari2A ne peut pas donc être attribuée à un antibiotique agissant sur la paroi cellulaire. La plupart des *Archaea* halophiles sont sensibles à la novobiocine et à la bacitracine. La novobiocine est un inhibiteur de l'ADN gyrase et agit sur la même-cible aussi bien chez les *Archaea* que les bactéries sensibles (Oren, 2006). Ils sont inhibés aussi par plusieurs antitumoraux qui interagissent avec la tubuline, l'actomyosine, et l'ADN topoisomérase II des *Eucarya*. Cette sensibilité aux drogues antitumorales rend les souches archéennes, des souches-cibles de choix dans le cadre de recherche sur ces molécules (Sioud *et al.*, 1987 ; Oren, 2002c).

Cette particularité novatrice (activité anti-archaea) nous a incités à approfondir l'étude de cete activité présentée par la souche Nari 2A. La seconde souche *Melghirimyces algeriensis* Nari EX présentant une activité de même type, est étudiée dans le cadre d'un autre travail.

Tableau VIII : Résultats des tests d'antagonisme

Groupe Microbien	Germes-cibles	<i>Melghirimyces algeriensis</i> Nari EX	<i>Melghiribacillus thermohalophilus</i> Nari 2A	<i>Melghirimyces Thermohalophilus</i> Nari 11A
Bactéries	<i>Escherichia coli</i>	(-)	(-)	(-)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(-)	(-)	(-)
	<i>Staphylococcus aureus</i> (SASM)	(-)	(-)	(-)
	<i>Staphylococcus aureus</i> (SARM)	(-)	(-)	(-)
	<i>Micrococcus luteus</i>	(-)	(-)	(-)
	<i>Bacillus cereus</i>	(-)	(-)	(-)
	<i>Bacillus subtilis</i>	(-)	(-)	(-)
Levure	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(-)	(-)	(-)
Champignons filamenteux	<i>Fusarium oxysporium</i>	(-)	(-)	(-)
	<i>Aspergillus niger</i>	(-)	(-)	(-)
Archaea	<i>Natrinema pallidum</i> (ADR 3)	(-)	(-)	(-)
	<i>Halostagnicola kamekurae</i> (ADR6)	(-)	(-)	(-)
	<i>Haloferax mediterranei</i> (SA3G)	(-)	(-)	(-)
	<i>Halorubrum saccharovororum</i> (AMR1)	(-)	(+)	(-)
	<i>Haloarcula californiae</i> (AMR3)	(+)	(-)	(-)

(+) Présence d'une zone d'inhibition

(-) Absence d'une zone d'inhibition

Tableau IX : Résultats du test d'antibiogramme des deux souches d'Archaea.

Famille de l'antibiotique	L'Antibiotique	<i>Halorubrum saccharovororum</i> (AMR1)	<i>Haloarcula californiae</i> (AMR3)
Phénicol	Chloramphenicol (C)	R	R
Aminoglycosides	Gentamicine (GEN)	R	R
bêta-lactamines	Penicilline (P)	R	R
	Novobiocine (NV)	S	S
	Cefotaxine (CTX)	R	R
	Amoxicilline (AMX)	R	R
Polypeptides	Bacitracine (Bac)	R	R
Glycopeptides	Vancomycine (VA)	R	R
Aminosides	Kanamycine (K)	R	R
	Spectinomycine (SPT)	R	R
Cyclines	Tétracycline (TET)	R	R
Fluoroquinolones	Ciprofloxacine (CIP 5)	R	R
	Acide Nalidixique (NA)	R	R

R : résistante

S : sensible

3.2.2. Caractérisation du produit bioactif élaboré par la souche *Melghiribacillus thermohalophilus* Nari 2A

Nous avons ciblé et approfondi l'étude de l'activité anti-Archaea exprimée par la souche Nari 2A. Cette activité a été déterminée en utilisant la souche *Halorubrum saccharovorum* AMR1 comme souche-cible et le degré d'inhibition a été mesuré par le diamètre de la zone d'inhibition.

3.2.2.1. Essais de caractérisation du composé anti-archaea

3.2.2.1.1. Etude des cinétiques de croissance et de production de la molécule active

La croissance de la souche Nari 2A a été suivie par mesure de la densité optique ($\lambda = 600$ nm). Quant à la production de l'activité antimicrobienne, elle a été mise en évidence en mesurant les diamètres d'inhibitions correspondants à chaque prélèvement. Ces derniers sont réalisés toutes 4 heures pendant 4 jours. Les résultats obtenus ont permis de tracer les cinétiques de croissance et de production dans la figure 8.

La croissance de la souche Nari 2A évolue très lentement pendant une courte phase d'une dizaine d'heures. Elle est suivie par une phase rapide et exponentielle d'une durée de 32 h. Après la 42^{ème} heure, on observe un ralentissement puis une stabilisation de la croissance de quelques heures. Au-delà de la 48^{ème} heure, on observe une décroissance très lente et régulière, due à une lyse cellulaire générée par des enzymes produites par la souche.

Durant cette croissance, le pH varie peu et oscille entre 6.8 et 7.4.

S'agissant de la cinétique de production de l'activité anti-archaea, on relève une différence fondamentale avec la cinétique de croissance, notamment dans sa première partie. En effet, cette activité n'est pas présente lorsque la croissance est presque maximale. En revanche, elle est maximale après 52 heures, une fois que la croissance ait entamé sa chute.

La plus grande production se situe entre 48h et 56h de croissance et diminue très légèrement par la suite.

Ce type de cinétique correspondant à un déphasage entre la croissance et la production de l'activité antimicrobienne est similaire des métabolites secondaires, principalement des antibiotiques.

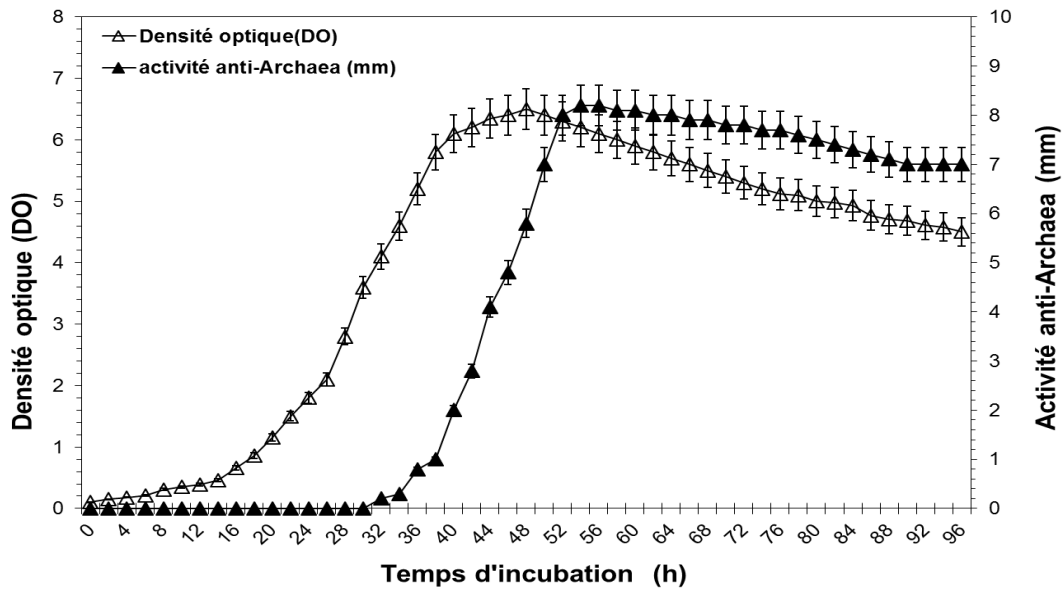


Figure 8 : Cinétiques de l'évolution de la croissance, et de production de l'activité antiarchéenne de la souche *Melghiribacillus thermohalophilus* Nari 2A.

3.2.2.1.2. Extraction du composé antimicrobien produit par la souche Nari 2A

La souche Nari 2A a été retenue en raison de son spectre d'action ciblant les *Archaea* seulement. L'extrait méthanolique cellulaire n'a montré aucune activité. Par contre, les extraits du surnageant sont actifs, notamment lorsque l'extraction est effectuée avec de l'acétate d'éthyle (figure 9). L'activité anti-archéenne extraite avec un solvant plus polaire (le n-butanol) et un autre moyennement polaire (acétate d'éthyle), suggère la biosynthèse de plusieurs molécules de polarité différente (soluble chacune dans un solvant différent) ou bien d'une molécule soluble dans différents solvants. Cette dernière hypothèse semble plus plausible car, les antibiotiques dont la structure est généralement complexe comprennent des caractères polaires et apolaires entraînant une affinité pour des solvants très divers (Hacène *et al.*, 1994)

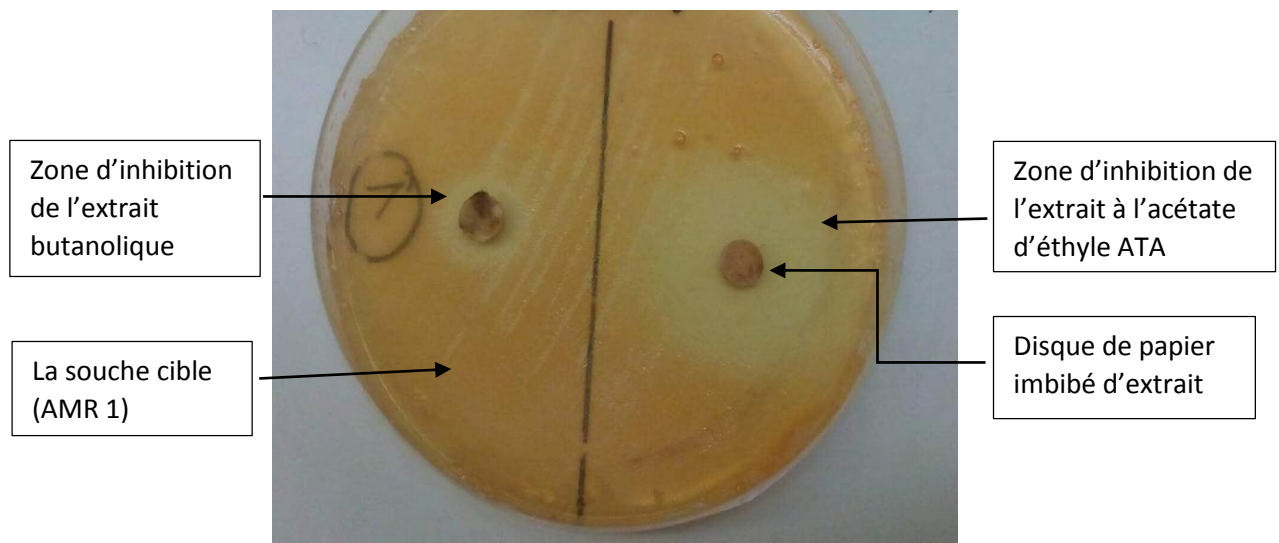


Figure 9 : Résultat de l'antibiographie des deux extraits de la souche *Melghiribacillus thermohalophilus* Nari 2A

3.2.2.1.3 Etude chromatographique sur couche mince de l'extrait actif

L'extrait actif (EA) a été analysé par CCM en utilisant deux systèmes de solvants : (n-butanol-acide acétique -eau) (3 :1 :1) et mix de (dichlorométhane + méthanol). Les chromatogrammes obtenus révèlent plusieurs tâches (figure 10).

(a)

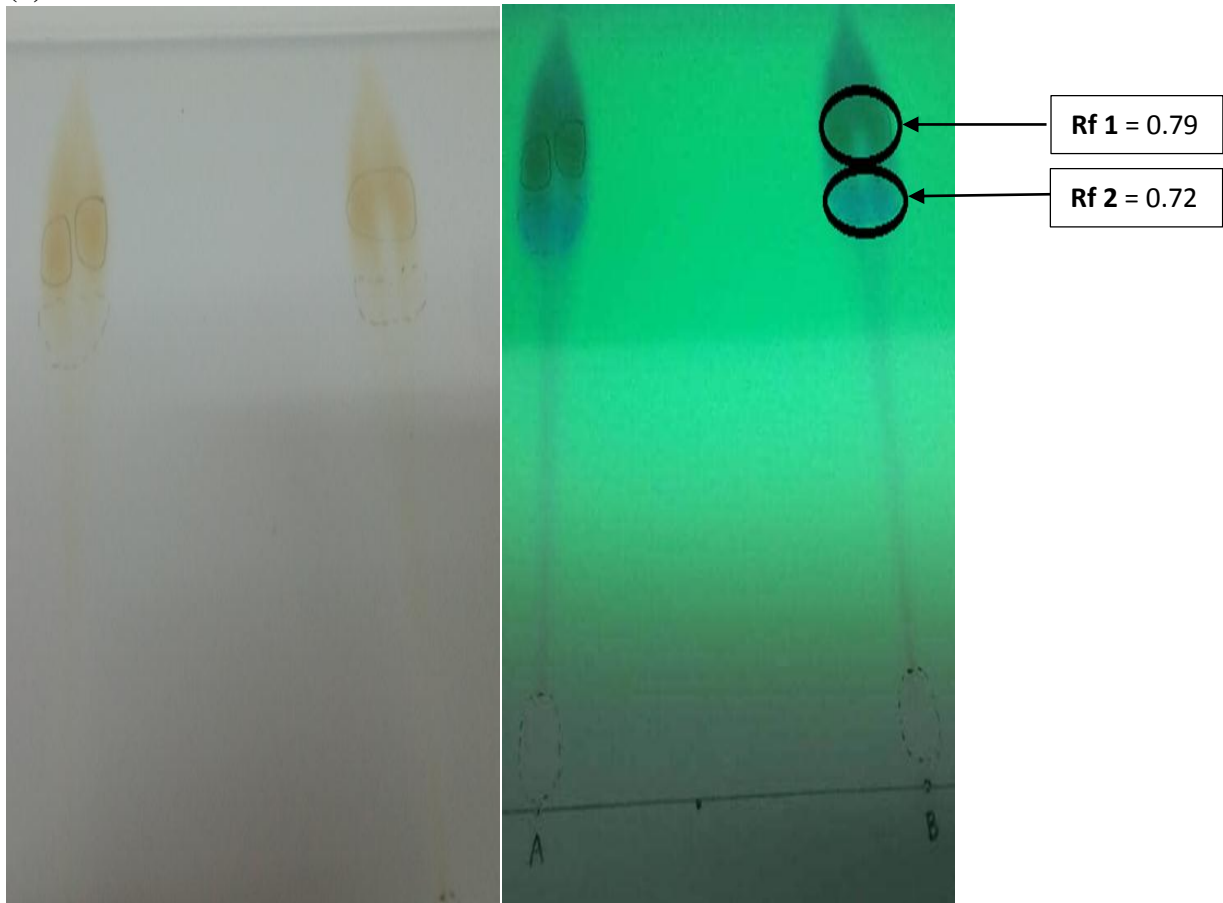


Figure 10a : Chromatogramme observé à l'œil nu et sous UV à 254 et 365 nm en utilisant le mix des solvants (butanol- acide acétique -eau)

(b)

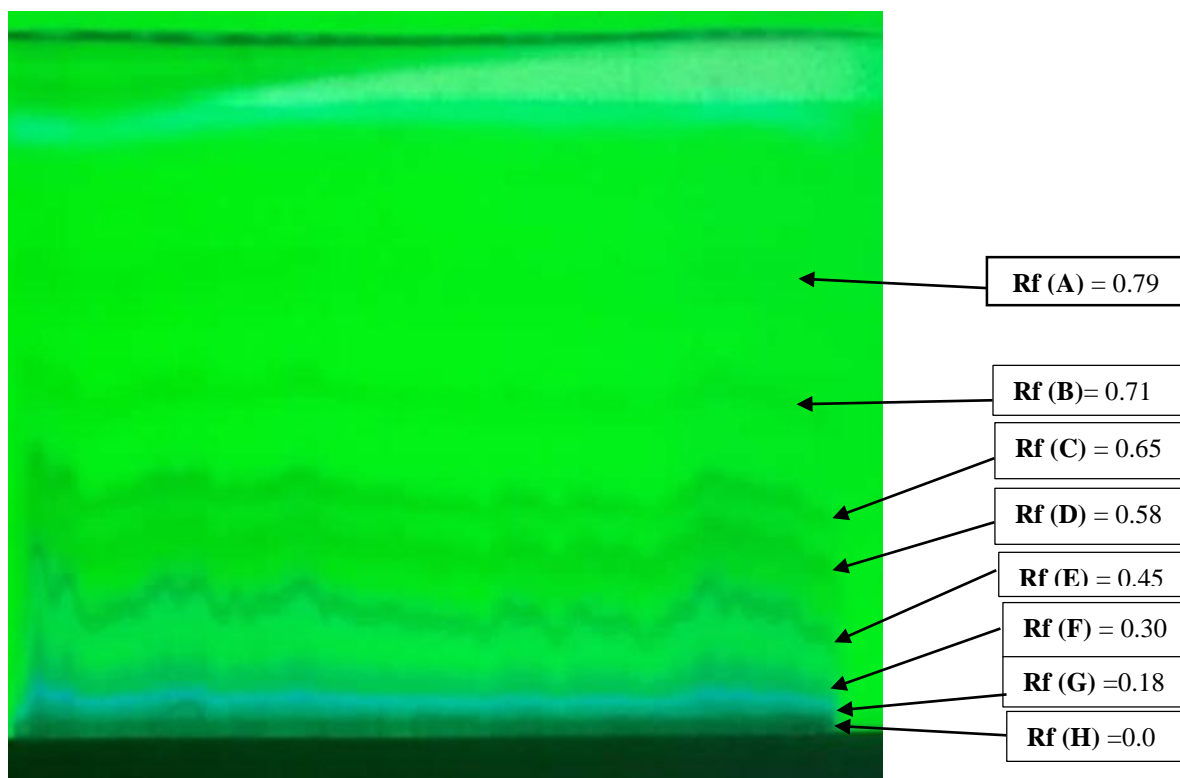


Figure 10b : Chromatogramme sous UV à 254 et 365 nm en utilisant le mix des solvants (dichlorométhane + méthanol).

Ces différentes fractions correspondent à des métabolites extraits par les deux solvants et ne correspondent pas toutes à l'activité anti-Archaea. Pour cela, nous avons effectué une révélation microbiologique par bioautographie

3.2.2.1.4. Révélation microbiologique par bioautographie

La révélation microbiologique des 2 chromatogrammes par bioautographie révèle la présence d'une forte activité inhibitrice correspondant à un $Rf = 0.79$ (figure 11a) et $Rf = 0.65$ (figure 11b) respectivement. Les taches sont visibles à l'œil nu et sous-UV.

Le test d'activité antimicrobienne de la deuxième plaque CCM montre que, malgré la présence de huit fractions (A, B, C, D, E, F, G et H) qui ont été testées séparément, seule la troisième fraction $Rf (C) = 0,65$ est active. Les autres fractions ne le sont pas. La souche produit donc vraisemblablement un seul métabolite actif et sera appelé par la suite extrait ATA.

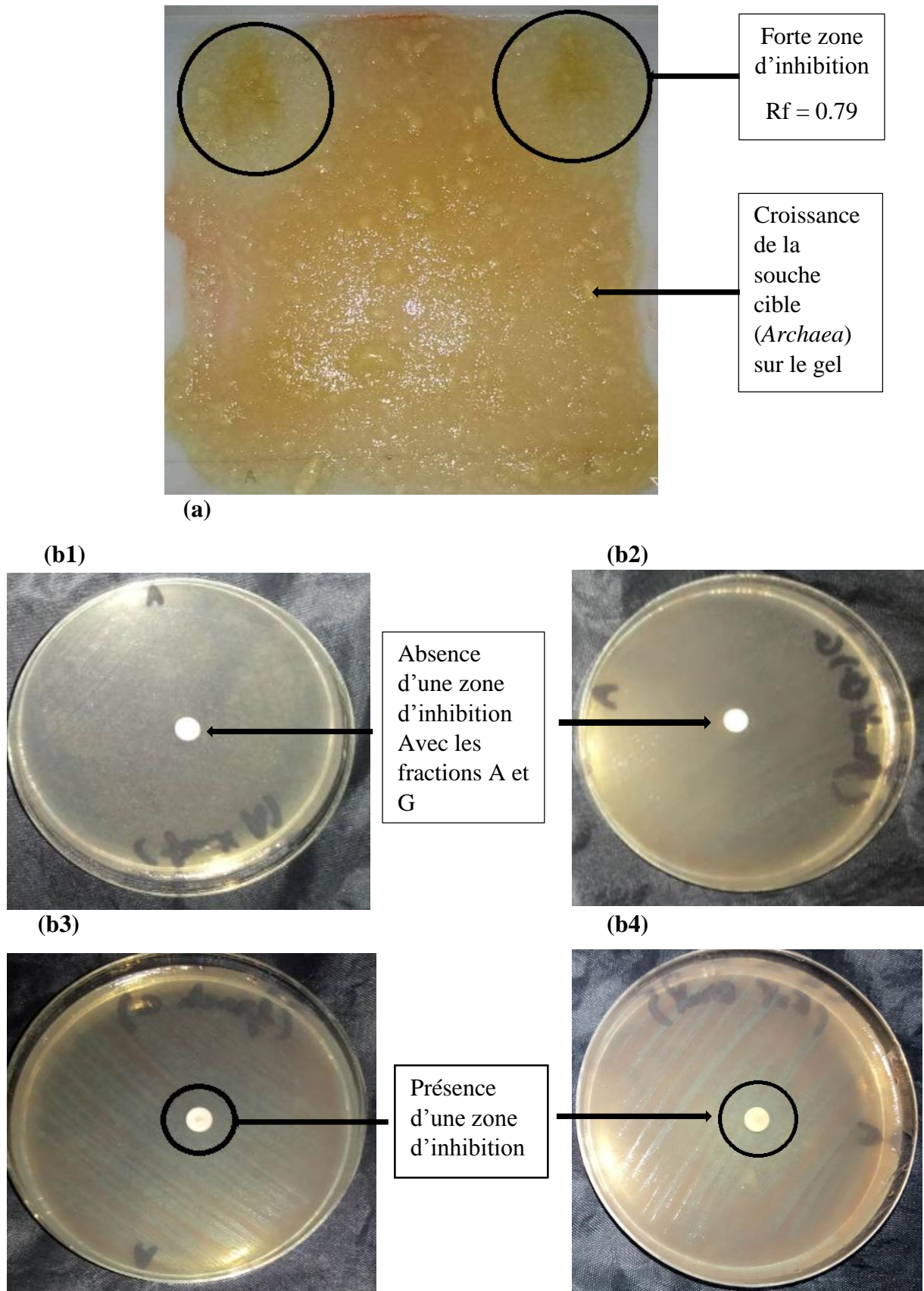


Figure 11 : Bioautographie (a) la première plaque CCM (b1) antibiographie de la fraction A (b2) antibiographie de la fraction G (b3) antibiographie de la fraction C (b4) antibiographie de l'extrait brut.

3.2.2.1.5. Etude de la stabilité de l'extrait ATA

- **Effet du pH**

L'effet du pH sur l'extrait ATA a été étudié en ajustant les valeurs de pH de 4 jusqu'à 10. L'extrait est actif entre pH 4 et 10 mais l'activité maximale se situe entre 4 et 6 (figure 12). L'activité peut être considérée comme acidotolérante. L'activité relative à pH 10 est de 50 %.

- **Effet de la température**

L'activité de l'extrait ATA persiste dans une large gamme de température (de 50 jusqu'à 100 °C) et même au-delà, après un cycle d'autoclavage (120°C pendant 20 min). La température optimale enregistrée pour l'activité inhibitrice d'ATA au pH 5 est de 80 °C (figure 13).

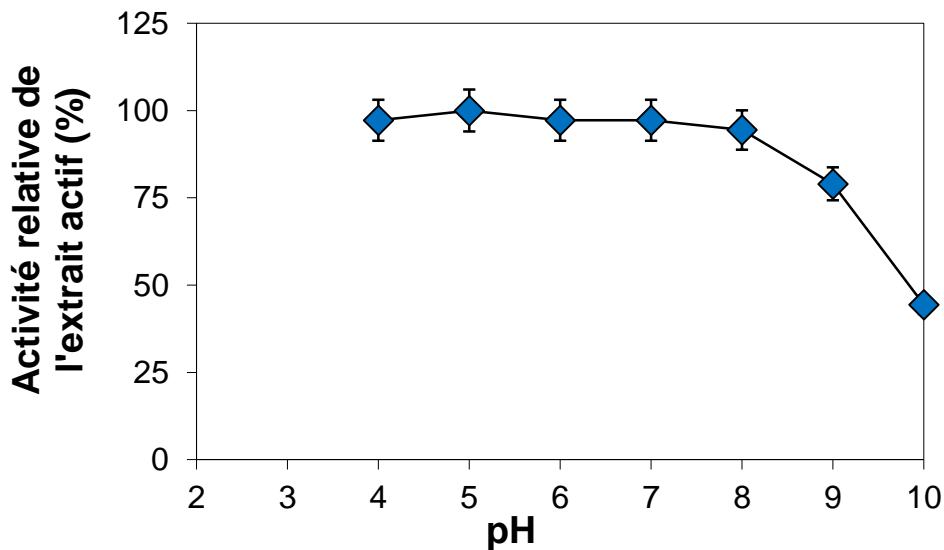


Figure 12 : Effet de pH sur l'activité de l'extrait actif de la souche Nari 2A

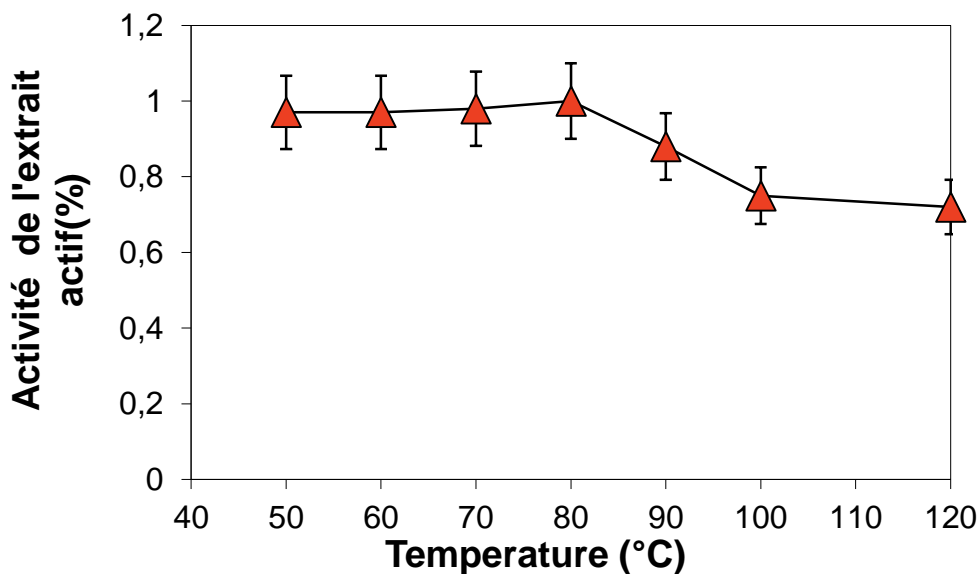
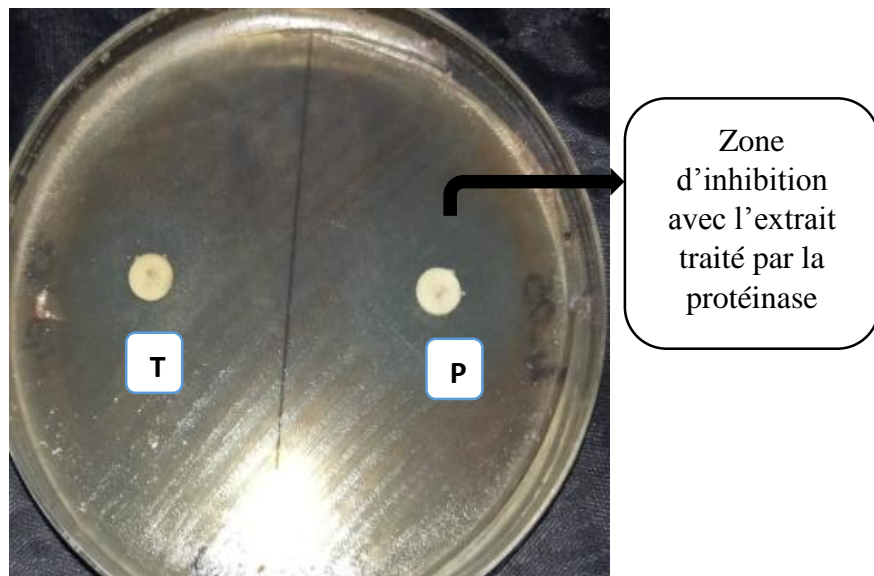


Figure 13 : Thermostabilité de l'extrait ATA de la souche Nari 2A.

3.2.2.1.6. Essai de détermination de la nature chimique de l'extrait actif (ATA)

Le traitement du composé (ATA) avec la protéinase K n'a pas influencé son activité ce qui suggèrerait que la molécule (ou sa partie active) n'est pas de nature protéique (Figure 14 A). En revanche, la décoloration de l'extrait (initialement de couleur marron jaunâtre) (annexe 2) par le charbon actif a éliminé totalement son pouvoir inhibiteur (Figure 14B). On pourrait donc conclure que la molécule active serait de nature non protéique mais pigmentée.

(A)



(B)

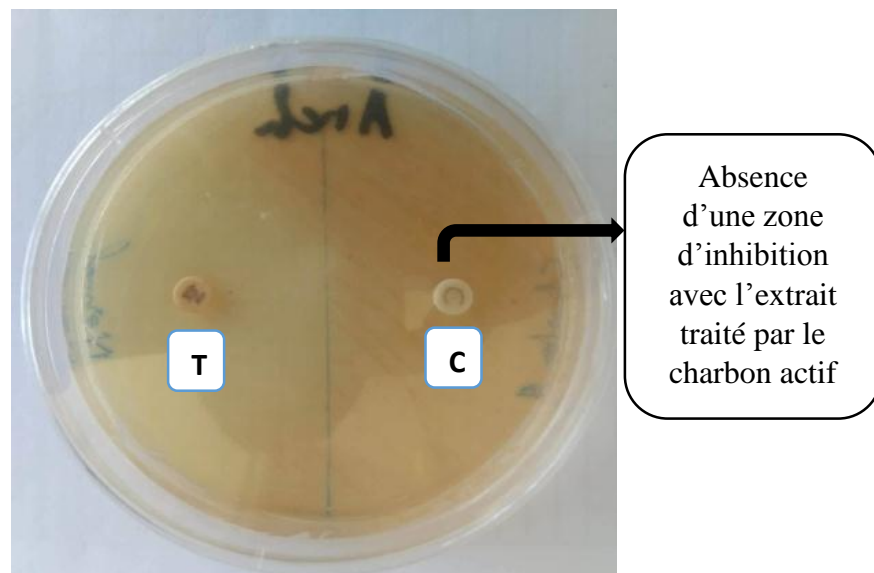


Figure 14 : Résultats de traitement de l'extrait (A) avec de la protéinase K (B) avec le charbon actif.

P : Extrait ATA traité par la protéinase

C : Extrait ATA traité par le charbon actif

T : Témoin, extrait ATA non traité

3.2.2.2. Caractérisation chimique de la molécule bioactive

3.2.2.2.1. Spectre UV de l'extrait actif

Le spectre UV-Visible de l'extrait actif ATA montre un maximum d'absorption à 260 nm avec un épaulement à 380 nm. La longueur d'onde d'absorption maximale (λ_{max}) augmente au fur et à mesure que le nombre de doubles liaisons augmente. Plusieurs travaux ont montré que les molécules antibiotiques synthétisées par des *Streptomyces* possèdent un maximum d'absorption en UV à des longueurs d'onde situées entre 215 et 270 nm (Ilic *et al.*, 2005 ; Saisivam *et al.*, 2008 ; Atta, 2009). (figure 15).

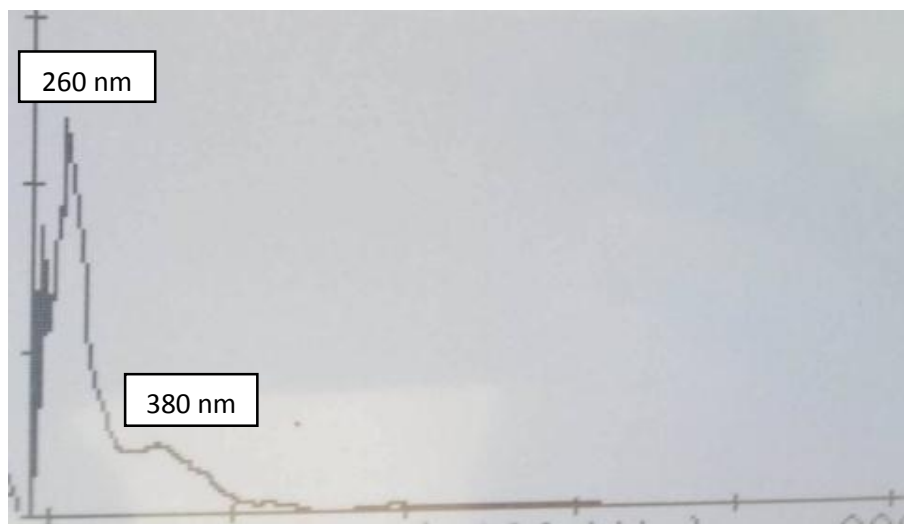


Figure 15 : Spectre UV-Visible de l'extrait actif.

3.2.2.2.2. Etude par Infra-rouge de l'extrait actif (ATA)

Une analyse spectrale de l'extrait actif sous forme déshydraté a été réalisée. Le spectre obtenu est illustré dans la figure 16.

Elle révèle la présence de pics caractéristiques qui ont été comparés avec le tableau de corrélation correspondant à 4 bandes d'absorption : 1450 cm^{-1} , 1650 à 1725 cm^{-1} , de 2850 à 3000 cm^{-1} et de 698 cm^{-1} qui correspondent à des liaisons C=C aromatiques, des liaisons C=O des aldéhydes aromatiques, des liaisons C-H et des liaisons C-H aromatique tri-substitués symétriques, respectivement. Ce qui confirme la présence des molécules constituées d'un cycle aromatique lié à une ou plusieurs chaînes aliphatiques.

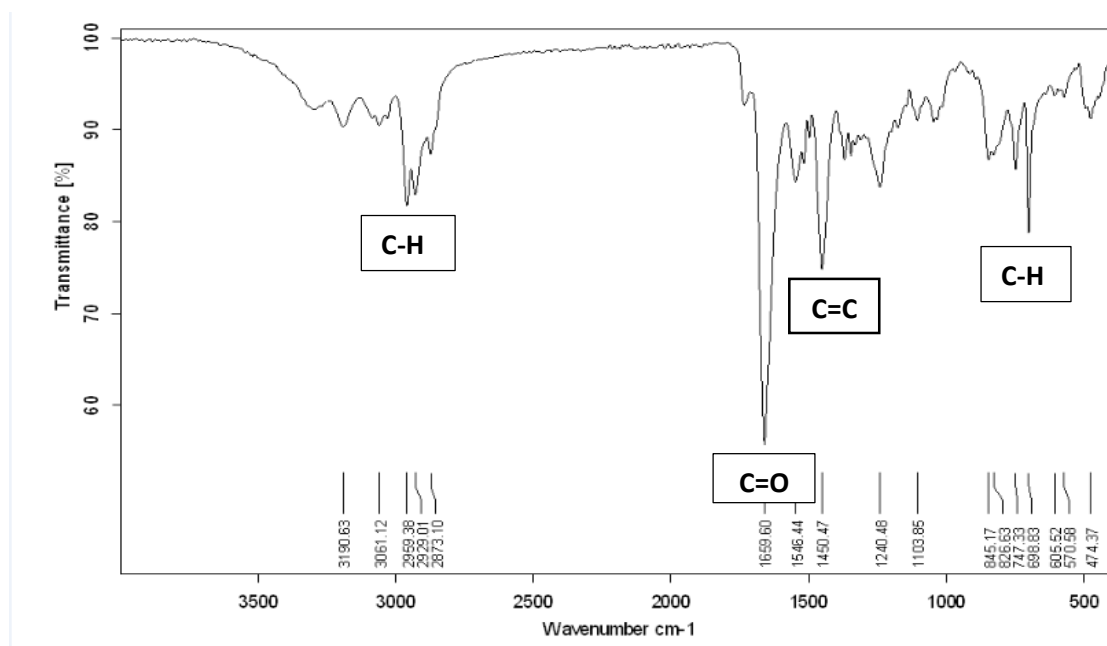


Figure 16 : Spectre infra-rouge de l'extrait actif déshydraté de la souche Nari 2A.

3.2.2.2.3. Analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

L'extrait actif a été analysé par HPLC. Un pic majoritaire et distinct a été obtenu avec un temps de rétention égal à 35.7 min. D'autres pics contenus dans l'extrait apparaissent sur le spectre, correspondant à une vingtaine d'autres produits mineurs, malgré une pré-purification par CCM. De nombreux travaux sur les antibiotiques produits par des microorganismes fait ressortir l'extrême richesse du métabolome microbien lors des études similaires, c'est pourquoi la bioautographie est indispensable pour extraire en majorité l'activité qui ressort bien dans la figure 17.

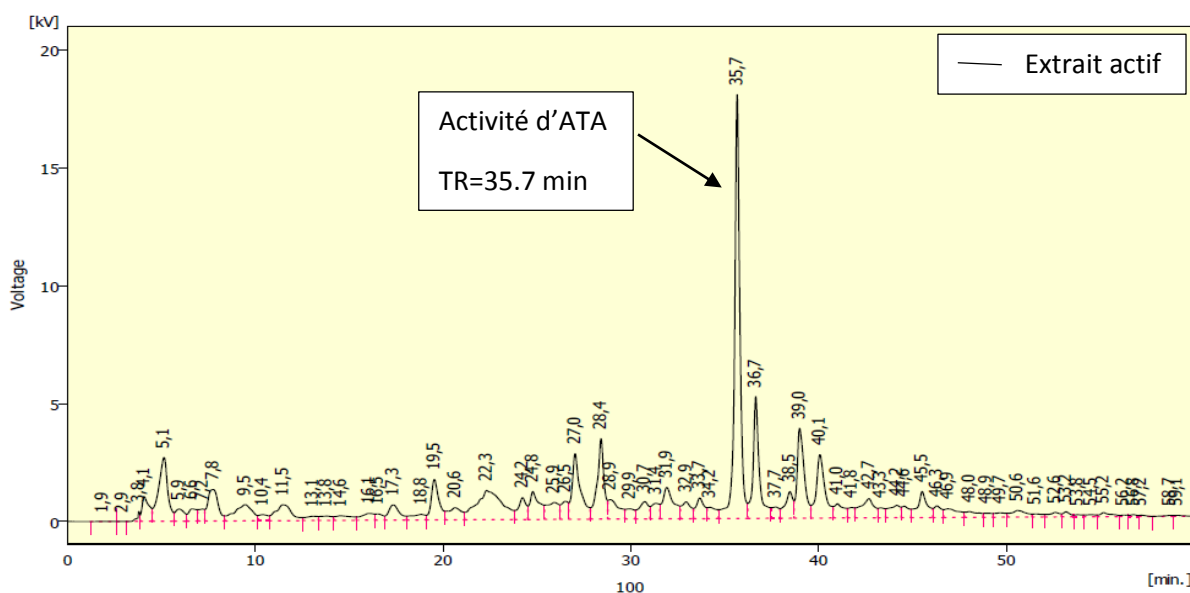


Figure 17 : Chromatogramme de l'HPLC analytique de l'extrait brut de la souche Nari 2A (gradient de H2O - méthanol) le débit est de 1 ml/minute.

3.2.2.2.4 Détermination du poids moléculaire de la molécule active ATA

La molécule ATA a été obtenue comme un composé huileux de couleur jaune. Le spectre de masse (figures 18a, 18b) indique la présence de nombreuses molécules dont la molécule active a montré un pic en spectrométrie de masse à haute résolution à 277, 0000 [M-H] - (calculée pour C₁₆H₂₁O₄, 277,0000) correspondant à une formule chimique de C₁₆H₂₂O₄.

3.2.2.2.4. Celle-ci pourrait correspondre à une molécule de type phtalate, avec un noyau benzénique. Nous avons comparé la molécule ATA avec différents types de phtalates (Tableau X). Il en ressort que celle-ci possède le même poids moléculaire que le phtalate de dibutyle et le phtalate de diisobutyle.

Tableau X : Les poids moléculaire des différents types des phtalates

Nom	Formule	Abréviation	Masse molaire g/mol
Phtalate de diméthyle	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	DMP	194,2
Phtalate de diéthyle	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	DEP	222,2
Phtalate de dipropyle	C ₁₄ H ₁₈ O ₄	DPP	250,3
Phtalate de diisobutyle	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	DiBP	278,4
Phtalate de dibutyle	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	DBP	278,4
Ph de butyle et de benzyle	C ₁₉ H ₂₂ O ₄	BBzP	312,4
Phtalate de dicyclohexyle	C ₂₀ H ₂₆ O ₄	DCHP	330,4
Ph de di-2-éthylhexyle	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	DEHP	390,6
Phtalate de di-n-octyle	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	DOP	390,6
Phtalate de didécyle	C ₂₈ H ₄₆ O ₄	DDcP	446,7
Phtalate de diundécyle	C ₃₀ H ₅₀ O ₄	DUP	474,4
Ph de di-isononyle	C ₂₆ H ₄₂ O ₄	DINP	418,7
Ph de Di-isodécyle	C ₂₈ H ₄₆ O ₄	DIDP	446,68
Phtalate de di-isopropyl	C ₁₄ H ₁₈ O ₄	DIPP	250,3

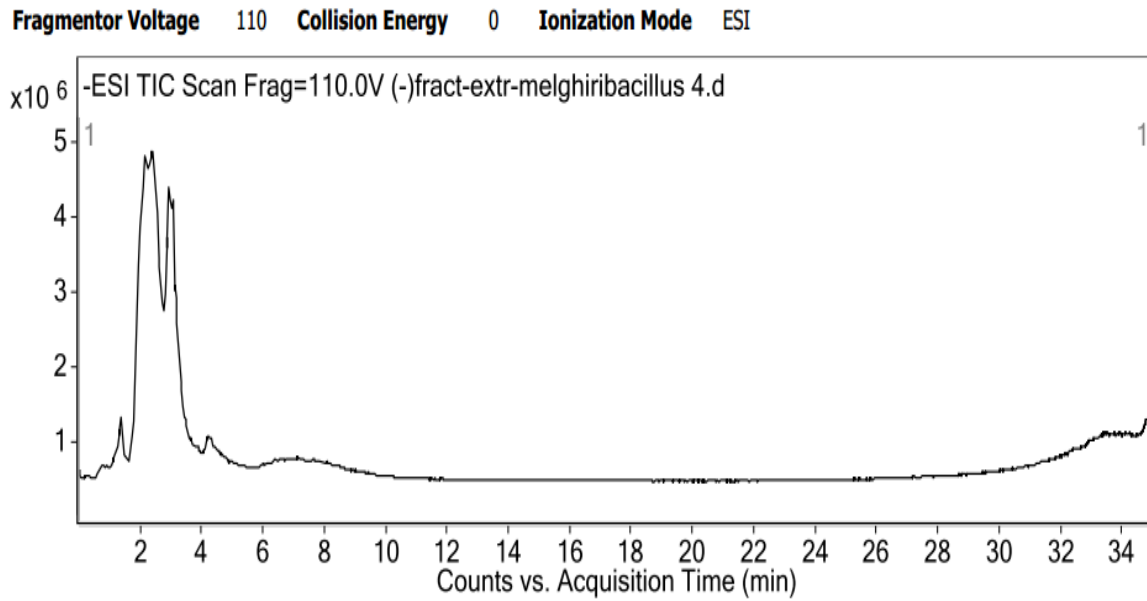


Figure 18a : Spectre de masse de l'extrait actif de la souche Nari 2A.

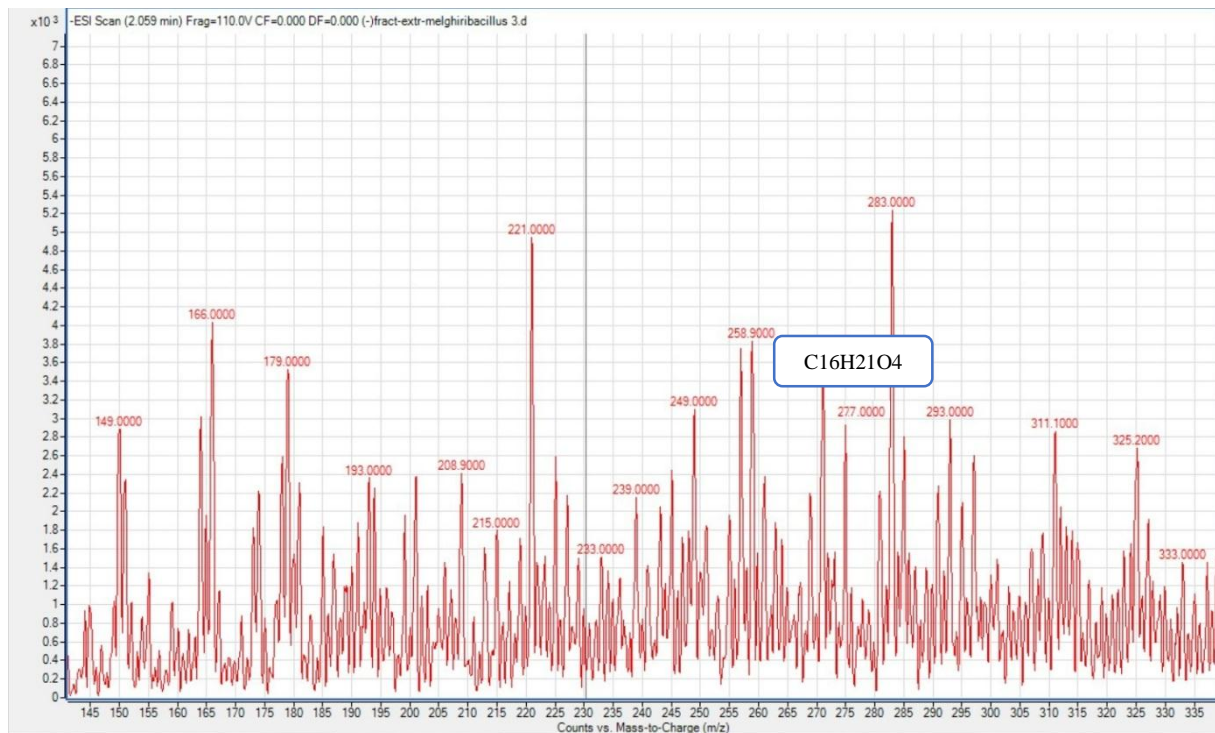


Figure 18b : Détail du spectre de masse de l'extrait ATA.

3.2.2.2.5 Détermination de la structure de l'ATA par RMN :

La souche Nari 2A produit une molécule antimicrobienne contenue dans la fraction C. Elle a été produite sur milieu ISP2 liquide et extraite par de l'acétate d'éthyle. Selon les analyses structurales, elle possède une structure aromatique avec une chaîne aliphatique et des groupements carbonyles. La RMN du proton a permis de déterminer la structure du composé ATA et confirme l'étude précédente. Le composé se caractérise par une structure aromatique composée d'un seul cycle avec 6C et deux chaînes aliphatiques, ce qui nous oriente vers le groupe des dérivés phtalates. Ces composés possèdent en commun un cycle benzénique qui est présent dans tous les types de phtalates. Le composé actif (ATA) pourrait être défini chimiquement comme étant du phtalate de dibutyl (Figure 19).

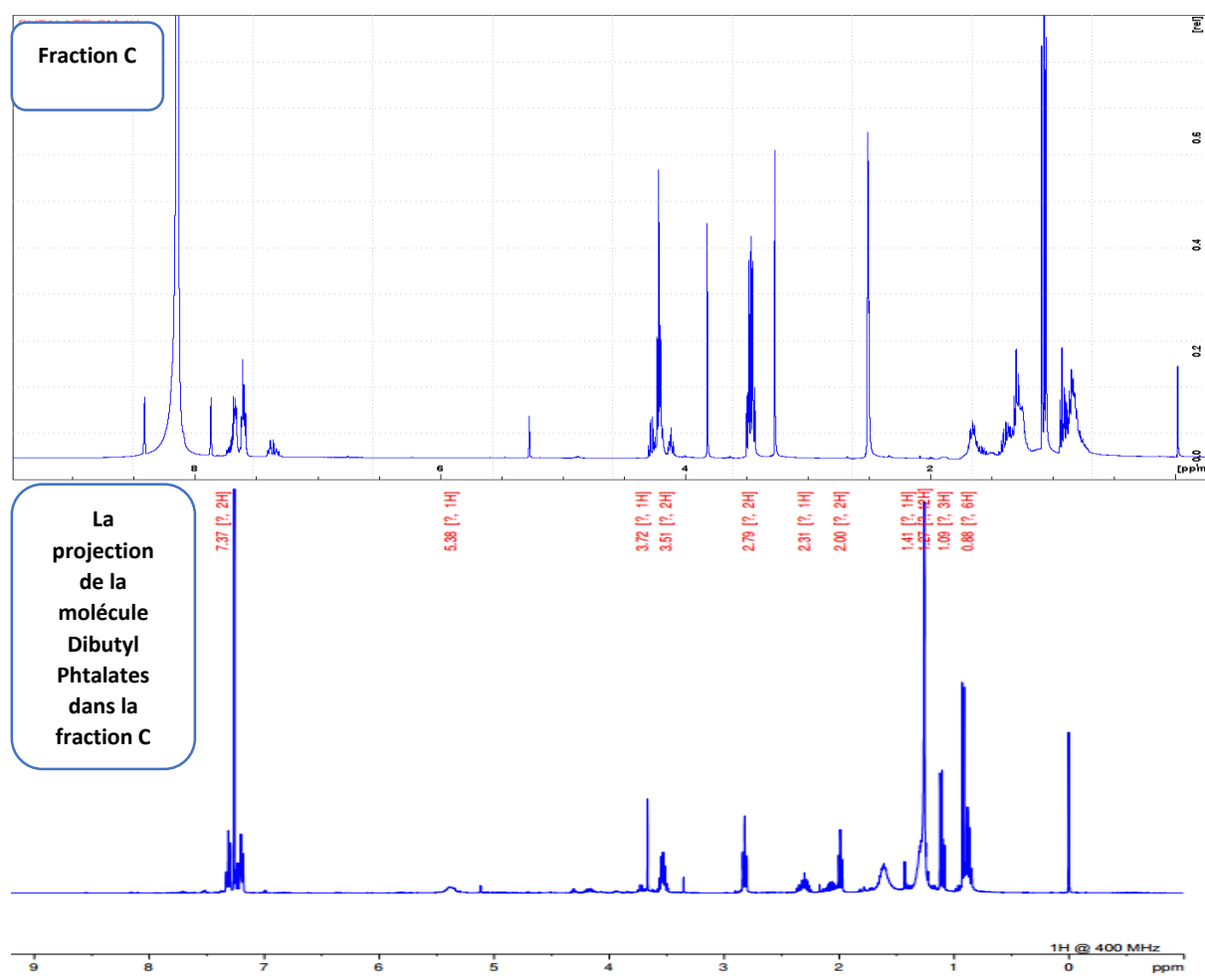


Figure 19 : Spectre des analyses RMN,H de la fraction active C obtenue après purification par CCM de l'extrait ATA.

3.2.2.2.6. Détermination de la structure de la molécule active ATA

En reprenant la classification de Berdy *et al.* 1987 qui classe les antibiotiques selon leur composition chimique (tableau VII), la molécule ATA peut être intégrée dans la huitième famille des antibiotiques aromatiques (**Famille 8**), la sous-famille des composés benzéniques (**Sous-Famille 8-1**), le groupe des dérivés de benzène monocyclique avec chaîne latérale aliphatique et le type de (**Groupe : 8-1-2-3**) benzène avec une chaîne aliphatique. En nous

basant sur les données de la spectrométrie de masse et l'analyse spectroscopique du proton (annexe 3), la structure de la molécule ATA pourrait être apparentée au phtalate de dibutyl (figure 20).

Pour approfondir notre caractérisation, nous avons comparé dans le tableau XI la molécule ATA avec les phtalates biosynthétisés par des organismes vivants. Il y apparaît clairement que de nombreux phtalates produits par les microorganismes sont actifs sur des bactéries Gram-positives ou Gram-négatives mais aucune recherche ne mentionne l'activité contre les Archaea. Pour rappel, la molécule ATA est inactive sur les bactéries et les mycètes mais inhibe une Archaea. De nombreux *Streptomyces*, des *Bacillaceae*, des *Pseudomonas*, des *Penicillium* et même des plantes halophytes produisent en effet le dibutyl phtalate ou le di-2-ethylhexyl phtalate mais le spectre d'action signalé diffère, selon les travaux.

Pour faire avancer l'identification du composé ATA, nous avons re-testé son activité antimicrobienne en la comparant avec celle du phtalate de di-butyl de synthèse. Celui-ci a révélé également être actif sur les Archaea et sur les bactéries testées, alors que d'autres auteurs ont abouti à des résultats différents. D'autre part, d'autres travaux mettent en évidence des activités cytotoxiques ou antioxydantes avec en plus (ou non) des activités antibactériennes, formant une plate-forme primaire pour plusieurs applications phytochimiques et pharmacologiques (Roy *et al.*, 2006 ; Hoang *et al.*, 2008 ; Deng *et al.*, 2011). À l'évidence, il semble donc qu'il y aurait plusieurs types de phtalates de dibutyl avec des actions biologiques différentes. Ce constat est corroboré par des études récentes sur les dérivés de phtalates qui ont révélé des activités antimutagènes, antibactériennes, antivirales, anti-androgènes et analogues aux hormones, anti-inflammatoires, anti-néoplasiques et anticancéreuses (Krishnaveni *et al.*, 2009 et Bhatnagar *et al.*, 2010).

Par ailleurs, les phtalates sont connus pour être produits en grandes quantités par l'industrie chimique à partir des hydrocarbures et utilisés dans différents domaines (pharmacie, cosmétiques, déodorants, encres pour imprimante et insecticides). Beaucoup de ces phtalates sont considérés comme des toxiques et surtout des perturbateurs de la reproduction chez l'homme.

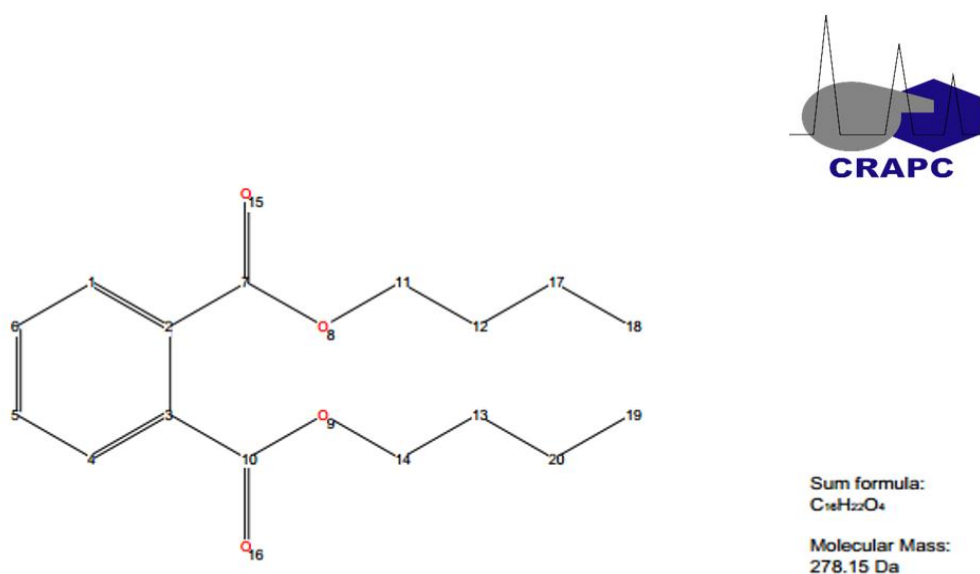


Figure 20 : Structure chimique de la molécule ATA.

Tableau XI : Différents organismes producteurs de phtalates

Phtalates	Organismes Producteurs		Souches sensibles	Auteurs
	Famille	Espèces productrices		
La molécule (ATA)	Bacillaceae	<i>Melghiribacillus thermohalophilus</i> Nari 2A	Archaea	Notre travail
di-butyl phthalate		<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Bactéries Gram-positif Activité anti-fongique	Deng <i>et al.</i> ,2011
Bis (2-ethylhexyl) phthalate		<i>Bacillus pumilus</i> MB 40	provocation d'une apoptose impliquant des caspases	Moushumi <i>et al.</i> ,2012
Dibutyl phthalate	Actinobacteria	<i>Streptomyces albidoflavus</i> 321.2	Bactéries Gram-positif : <i>B. subtilis</i> Bactéries Gram-négatif : <i>E. coli</i> , <i>S. typhi</i> Moisissures filamenteuses : <i>A. niger</i> <i>S. cerevisiae</i>	Roy <i>et al.</i> ,2006
1)2-Methyl butyl propyl phthalate 2)Diethyl phthalate		<i>Streptomyces cheonanensis</i>	Bactéries Gram-négatif ; <i>Proteus vulgaris</i> Levure ; <i>Candida albicans</i> Moisissures; <i>Fusarium solani</i>	Mangamuri <i>et al.</i> ,2016
di-(2-ethylhexyl) phthalate.		<i>Streptomyces sp</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (SARM)	Driche <i>et al.</i> ,2014
di-(2-ethylhexyl) phthalate		<i>Streptomyces sp.</i> TN256	Bactéries Gram-positif Bactéries Gram-négatif Moisissures; <i>Fusarium sp</i>	Smaoui <i>et al.</i> ,2012
Di-(2-ethylhexyl) Phthalate		<i>Streptomyces mirabilis</i> NSQu-25	Bactéries Gram-positif Faible activité anti-Bactéries Gram-négatif Activité cytotoxique	El-Sayed <i>et al.</i> ,2012
1)bis-(2-ethylhexyl) phthalate 2) bis-(5-ethylheptyl) phthalate		<i>Nocardia levis</i>	<i>S. aureus</i> <i>B. cereus</i>	Kavitha <i>et al.</i> ,2009

			<i>S. epidermis</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Fusarium oxysporum</i>	
1) dibutyl phthalate 2) di-(2-ethylhexyl) phthalate	Bactéries Gram-négatif	<i>Pseudomonas sp</i>	Activité cytotoxique	Hoang <i>et al.</i> , 2008
di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)	Moisissures	<i>Penicillium janthinellum</i> 62	Activité cytotoxique, antitumoral anvirale et antioxydante	El-Sayed <i>et al.</i> , 2015
dibutyl phthalate		<i>Penicillium skrjabinii</i>	Bactéries Gram-positif Bactéries Gram-négatif	Aboobaker <i>et al.</i> , 2019
1) 2-ethyldecyl 2-ethylundecyl phthalate 2) 2, 12-diethyl-11- methylhexadecyl 2-ethyl-11-methylhexadecyl phthalate 3) Bis(2-ethylheptyl) phthalate	Autres	<i>Hippocampus Kuda</i> (Hippocampe)	Activité antioxydante Activité cytotoxique	Qian <i>et al.</i> , 2012
1) diisobutyl phthalate 2) dibutyl phthalate 3) di-(2-ethylhexyl) phthalate		<i>Rheinheimera japonica</i> KMM 9513 (Plante médicinale)	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Kalinovskaya <i>et al.</i> , 2017
Dibutyl Phthalate		<i>Ipomoea carnea</i> (plante)	<i>Klebsiella pneumonia</i> (ATCC33495) <i>Proteus mirabilis</i> (ATCC12453) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC10662)	Khatiwora <i>et al.</i> , 2012
1) dioctyl phthalate 2) dibutyl phthalate		<i>Salicornia herbacea</i> (halophyte)	activité antioxydante	Wang <i>et al.</i> , 2013

3.3. Criblage des activités hydrolytiques des 3 souches retenues

3.3.1. Tests d'activités enzymatiques

La présence de plusieurs activités hydrolytiques a été qualitativement recherchée pour permettre la distinction des souches entre-elles et avoir une idée sur leur potentiel de biosynthèse d'enzymes.

Les résultats des tests mettent en évidence des activités variables selon les souches (Tableau XII). Les trois souches sont caséinase positives mais la plus active d'entre elles est la souche *Melghiribacillus thermohalophilus* Nari 2A qui exerce une très forte activité chitinase, lécithinase et caséinase en plus de la présence d'une lipase. Ces enzymes sont des métabolites essentiels pour la croissance mais peuvent être valorisées au profit de la biotechnologie dans divers domaines (Zhao *et al.*, 2010). Le taux de croissance rapide de la souche Nari 2A par rapport aux deux autres, menant à des cycles de fermentation courts a été un des critères important de son choix pour approfondir son étude.

Nous avons donc retenu l'activité chitinolytique de la souche Nari 2A pour une étude fine d'autant plus que c'est la même souche qui produit la molécule bioactive ATA étudiée dans la partie précédente de ce travail.

Tableau XII : Activité enzymatique des 3 souches bactériennes.

Les enzymes	<i>Melghirimyces algeriensis</i> Nari Ex	<i>Melghirimyces thermohalophilus</i> Nari 11A	<i>Melghiribacillus thermohalophilus</i> Nari 2A
Amylase	(-)	(-)	(-)
Cellulase	(-)	(-)	(-)
Esterase	(-)	(-)	(-)
Caseinase	(+)	(+)	(++)
Lipase	(-)	(-)	(+)
Lécithinase	(-)	(-)	(+++)
Chitinase	(-)	(-)	(+++)
Hydrocarbures	(-)	(-)	(-)

(+) Présence d'une zone d'hydrolyse (-) Absence d'une zone d'hydrolyse

3.3.2. Sélection de la souche à activité chitinase

Parmi les souches étudiées, la souche Nari2A a exposé une activité extracellulaire chitinase après 48h d'incubation dans un milieu optimisé et a été retenue pour toutes les études ultérieures.

Les activités chitinolytiques ont reçu beaucoup d'attention ces dernières années en raison de leurs applications biotechnologiques dans des différents domaines (Adrangi *et al.*,2010).

3.3.3. Les mesures cinétiques de la chitinase purifiée

3.3.3.1 Cinétique de croissance bactérienne et production de la chitinase

La cinétique de croissance de la souche et la production de chitinase ont été suivies dans le milieu à base de chitine (figure 21). La croissance débute rapidement et atteint un plateau après 44 heures de culture puis elle ralentit brusquement. Les protéines solubles augmentent avec la croissance et leur cinétique présente une allure similaire, correspondant aux métabolites primaires.

En reprenant la cinétique de production d'antibiotique (figure 8) nous constatons que la souche Nari 2A produit d'abord cette enzyme pendant la croissance puis une fois que celle-ci est achevée, c'est l'antibiotique qui est synthétisé avec une production maximale situant entre 48h et 56h de croissance et diminue très légèrement par la suite.

La production de chitinase par la souche Nari 2A augmente progressivement pour atteindre une valeur maximale de 9000 U/mL aux 48 heures. Nous remarquons que la croissance se confond à la production, ce qui montre que l'enzyme ChiA-Mt45 est bien un métabolite primaire.

L'activité obtenue (9000U/mL) de l'extrait brut après 48 heures peut être considérée comme relativement importante par rapport aux autres activités décrites chez la majorité des souches thermophiles (Essghaier *et al.*,2009, Hamid *et al.*, 2012, Babavalian *et al.*,2013, Senol *et al.*,2014, Laribi-Habchi *et al.*,2015 et Bouacem *et al.*,2018).

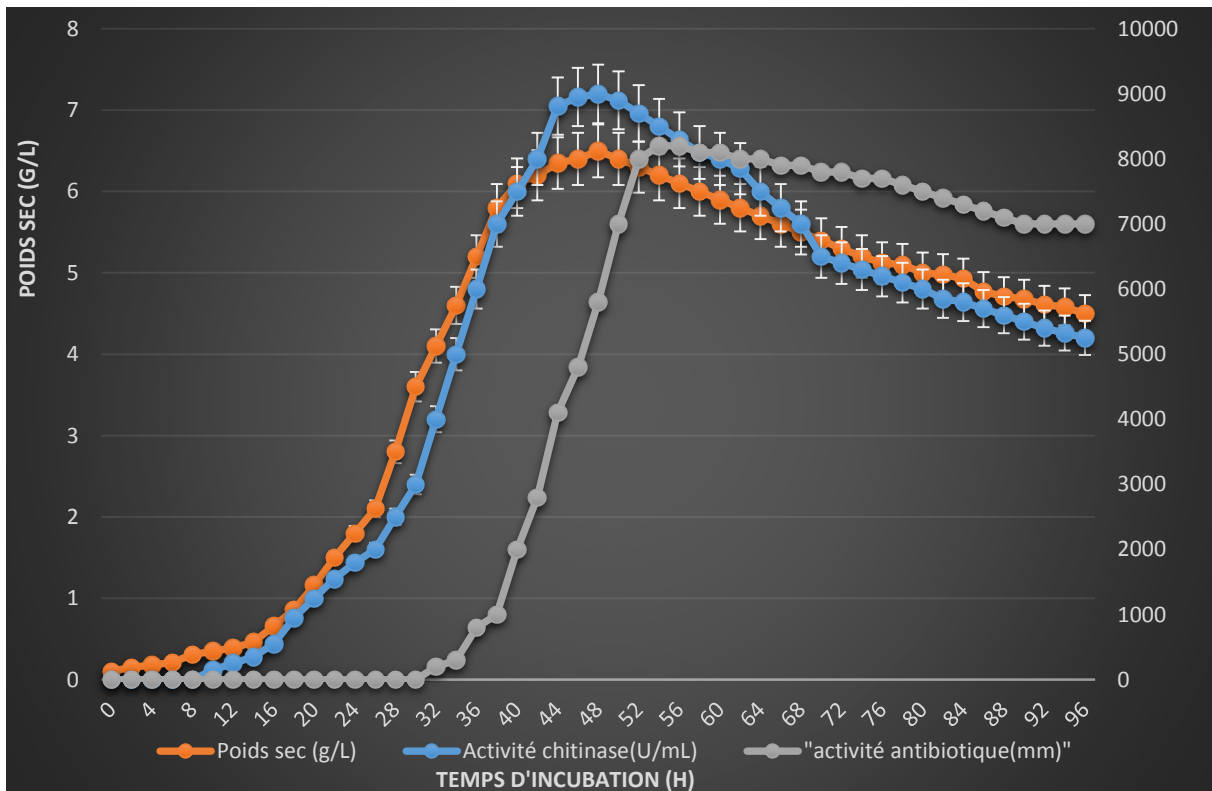


Figure 21 : Cinétique de production de la chitinase comparée à celle de l'antibiotique ATA avec la croissance de la souche *Melghibacillus thermohalophilus* Nari 2A.

3.3.3.2 Procédure de purification de l'enzyme

Le surnageant de culture de la souche Nari 2A présentant une activité spécifique de 70500 U/mg a fait l'objet d'une précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium (40 à 70%) suivie d'une chromatographie UNO S-1 utilisant le système FPLC et une chromatographie sur gel filtration utilisant le système HPLC.

Le profil d'éluion de la fraction active après sortie d'une chromatographie sur une colonne Zorbax PSM 300 de la collecte du pic 3 issue de la FPLC est concentrée sur la membrane amicon à 10 kDa. Le temps de rétention de la ChiA-Mt45 est de 10.909 min (figure 22).

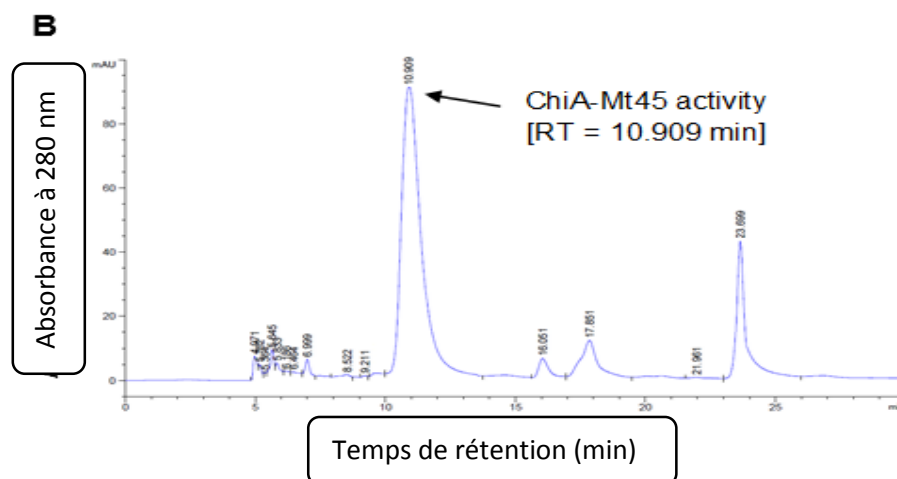


Figure 22 : Chromatographie de la chitinase Chia-Mt45 sur le système HPLC en utilisant un Zorbax PSM 300 HPSEC.

L'enzyme ChiA-Mt45 a été purifiée selon un protocole contenant trois étapes : traitement thermique de l'extrait brut (20 min à 90 °C), FPLC (UNO S-1) et HPLC (ZORBAX PSM 300 HPSEC).

La chitinase de la souche Nari 2A, a été purifiée à homogénéité à partir du surnageant de culture en trois étapes, avec un degré de pureté d'environ 41 fois plus important que l'extrait brut.

Dans des conditions d'essai optimal, en utilisant la chitine colloïdale comme substrat, l'enzyme purifiée avait une activité spécifique de 70500 U/le mg, avec un rendement d'environ 47 %. On constate que l'activité spécifique de ChiA-Mt45 est significativement élevée si on la compare à ceux d'autres chitinases. Ainsi, les chitinases ; La ChiA-Hh59 (produite par *Hydrogenophilus hirschii* la souche Ko-DZ44), la ChiA-65 (chitinase synthétisée par *Bacillus licheniformis* la souche LHH100), la chitinase (élaborée par *Bacillus sp.* La souche Hu1), la chitinase antimycosique (provenant de *Lecanicillium lecanii* la souche 43e) et la chitinase acide (secrétée par *Streptomyces sp*) présentent respectivement des activités spécifiques de 21600 U/ mg, 7869.5 U/ mg, 62.4 U/ mg, 167.5 U/ mg, de 161.35 U/ mg (Bouacem *et al.*,2018, Laribi-Habchi *et al.*,2015, Dai *et al.*, 2011 , Nguyen *et al.*,2015 , Karthik *et al.*,2015).

Le rendement de purification présage des perspectives intéressantes dans de nombreux bioprocessus biotechnologiques et industriels de biocatalyse.

3.3.3.3 Détermination de poids moléculaire et analyse zymographique de ChiA-Mt45

L'homogénéité de la chitinase purifiée a également été vérifiée par SDS-PAGE dans des conditions réductrices et par analyse de coloration protéique. Une bande protéique unique a été obtenue pour l'enzyme purifiée. L'enzyme ChiA-Mt45 purifiée a un poids moléculaire d'environ 45 kDa (figure 23a) et l'activité chitinase est claire (figure 23b).

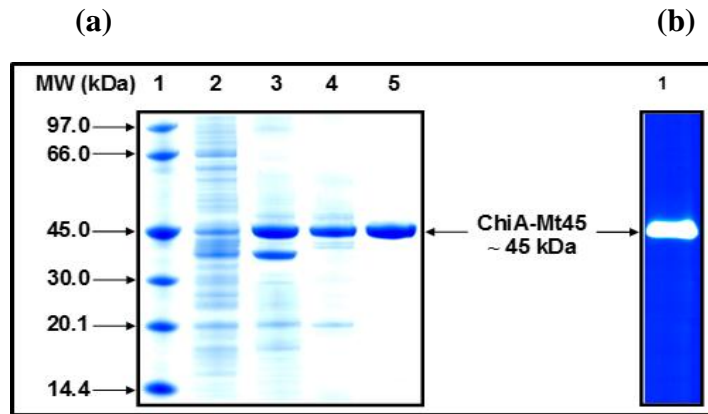


Figure 23 : (a) SDS-PAGE du marqueur protéique purifié de la chitinase Chia-Mt. Voie 1, marqueurs de taille Amersham LMW, Voie 2, extrait cellulaire total. Voie 3, échantillon après traitement thermique (90 °C pendant 20 min). Voie 4, échantillon après FPLC à 115-175 mM 17 NaCl. Voie 5, chitinase purifiée Chia-Mt45 (20 µg) (RT= 10,909 min). (b) La zymographie Chitine azurée par coloration de la chitinase purifiée Chia-Mt45 (20 µg). Le gel a été taché avec le bleu de Coomassie Brilliant R 250.

Toutes ces observations suggèrent fortement que ChiA-Mt45 est une protéine monomérique comparable aux chitinases étudiées par d'autres auteurs (Dai *et al.*,2011 ; Xiayun *et al.*,2012 Laribi-Habchi *et al.*,2015 ; Bouacem *et al.*, 2018).

Tableau XIII : Poids moléculaire de plusieurs chitinases

Chitinases	Microorganisme producteur	Poids moléculaire	Auteurs
ChiA-65	<i>Bacillus licheniformis</i> LHH100	65 kDa	(Laribi-Habchi <i>et al.</i> ,2015)
Chit62	<i>Serratia marcescens</i> B4A	62 kDa	(Babashpour <i>et al.</i> ,2012),
Chit 60	<i>Moritella marina</i> ATCC 15381T	60 kDa	(Stefanidi <i>et al.</i> ,2008),
ChiA-Hh59	<i>Hydrogenophilus hirschii</i> Ko-DZ44	59 kDa	(Bouacem <i>et al.</i> ,2018)
ChiA	<i>Sanguibacter antarcticus</i> KOPRI 21702	55 kDa	(Park <i>et al.</i> ,2009)
ChiA	<i>Pseudomonas sp</i> TXG6-1	51.66 kDa	(Zhong <i>et al.</i> , 2015)
ChiA	<i>Paenibacillus pasadenensis</i> NCIM 5434	35 kDa	(Loni <i>et al.</i> ,2014)
ChiA-Mt45	<i>Melghiribacillus thermohalophilus</i> Nari 2A	45 kDa	(Mohamed <i>et al.</i> ,2019)

La comparaison du poids moléculaire de notre chitinase avec les autres chitinases révèlent que le poids moléculaire de la chitinase est étendu de 20 à 80 kDa (Sakai *et al.*,1998) (TableauXIII).

3.3.3.4 Ordre des acides aminés NH₂-terminaux de ChiA-Mt45

Le séquençage de l'extrémité NH₂-terminale de l'enzyme ChiA-Mt45 fait apparaitre 27 acides aminés dont la séquence est la suivante: **ASSDKSYKIIAYPSWGAYGRDFQVWD**. D'après l'alignement de cette séquence avec celles d'autres chitinases microbiennes présentés dans le tableau, on remarque qu'une haute homologie avec d'autre chitinases bactériennes, atteignant 96 % avec la chitinase ChiA du *Bacillus subtilis* la souche CHU26 et *Bacillus atrophaeus* la souche SRCM01359 (Tableau XVI). L'acide aminé NH₂-terminal de ChiA-Mt45 se distingue de ceux des deux dernières chitinases par un acide aminé : le résidu Ala11 dans ChiA-Mt45 a été substitué par Gly11 dans les autres enzymes. De plus, l'alignement a révélé une homologie avec d'autre chitinases bactériennes, atteignant 93, 89, 85 et 81 % avec les autres chitinases : une Chitinase de la souche *Bacillus pumilus* MCB-7, ChiA du *Bacillus amyloliquefaciens* AVWX-1, ChiA-65 du *Bacillus licheniformis* LHH100 et ChiA du *Bacillus licheniformis* SVD1, respectivement.

Ces résultats suggèrent que l'enzyme ChiA-Mt45 secrétée par *Melghiribacillus thermohalophilus* Nari2A est une nouvelle chitinase qui a été substituée par Gly11 dans les autres enzymes.

Tableau XIV : Alignement de la séquence des acides aminés terminaux NH₂ de la chitinase purifiée Chia-Mt45 de la souche thermohalophilus Melghiribacillus Nari 2A avec d'autres séquences des chitinases de *Bacillus*.

Enzyme	Origine	NH ₂ -terminal amino-acide	Identité (%)
ChiA-Mt45	<i>Melghiribacillus thermohalophilus</i> Nari 2A	ASSDKSYKIIAYPSWGAYGRDFQVWD	
ChiA (AAC23715)	<i>Bacillus subtilis</i> CHU26	ASSDKSYKII G YPSWGAYGRDFQVWD	96
Chitinase A (ARW07707)	<i>Bacillus atrophaeus</i> SRCM101359	ASSDKSYKII G YPSWGAYGRDFQVWD	96
Chitinase A (ALX35002)	<i>Bacillus pumilus</i> MCB-7	ASSDKSYKII G YPSWGAYGRD Y QVWD	93
ChiA (ABO15008)	<i>Bacillus Amyloliquefaciens</i> AVWX-1	ASSDK SSK M I GYYPSWGAYGRDFQVWD	89
ChiA-65 (AHN92007)	<i>Bacillus licheniformis</i> LHH100	AD S G K N Y KI I GYYPSWGAYGRDFQVWD	85
ChiA (BAL45516)	<i>Bacillus licheniformis</i> SVD1	AD S G K N Y KI I GYYPSWGAYGR N FQVWD	81

3.3.3.5 Caractérisation biochimique de la ChiA-Mt45 purifiée

a- Modification chimique et effet des ions métalliques sur l'activité de ChiA-Mt45

Lorsque l'enzyme Chia-Mt45 a été incubée avec divers réactifs spécifiques pour la modification des acides aminés, son activité s'est révélée inhibée en présence d'acide 4-Chloromercuribenzoïque (p-CMB) et de N-ethylmaleimide (NEM). En revanche, les chitinases provenant d'autres souches connues, *Bacillus licheniformis* LHH100 (Laribi-Habchi *et al.*, 2015), *Hydrogenophilus hirschii* KB-DZ44 (Bouacem *et al.*, 2018) et *Streptomyces sp.* M-20 (Kim *et al.*, 2003) ont été complètement inhibées par le p-CMB. Une perte d'activité partielle de la ChiA-Mt45 a été observée lors de l'incubation avec le dithiothréitol (DTT) et le 2-Mercaptoéthanol (2-ME) (Tableau). Ceci indique la présence de groupes sulfhydryle sur le site actif de l'enzyme, comme confirmé par l'inhibition observée en présence d'ion mercurique. L'EDC (1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide) n'a aucun effet sur l'activité de l'enzyme, suggérant que le résidu acide glutamique dans le site actif n'est pas accessible à EDC. Ce comportement est semblable à celui observé avec les chitinases ChiA-65 de la souche *Bacillus licheniformis* LHH100 (Laribi-Habchi *et al.*, 2015) et ChiA-Hh59 de *Hydrogenophilus hirschii* KO-DZ44 (Bouacem *et al.*, 2018).

L'activité de la ChiA-Mt45 a été fortement augmentée par l'addition de 2 mM de Ca⁺², Mg⁺² et Mn⁺². L'activité relative enregistrée est de 280, 175 et 127 %, respectivement. L'activité accrue en présence de Ca⁺² suppose que ce cation joue un rôle important dans la régulation de la conformation enzymatique active et augmente ainsi l'activité chitinolytique.

Le principal inhibiteur de l'activité de la chitinase est le Hg⁺². Il réagit avec les groupes SH présents dans les résidus de cystéine dans la chaîne protéique et perturbe la structure tertiaire (Nawani *et al.*, 2002). Il inhibe fortement les chitinases de différents genres (Karthik *et al.*, 2015).

b- Effet du pH sur l'activité et la stabilité

L'effet du pH sur l'activité catalytique de ChiA-Mt45 a été étudié. L'enzyme est active dans une gamme de pH s'étalant entre 2 et 10 mais avec l'activité maximale à pH 3.5 (figure 24A). Elle peut être considérée comme acidotolérante. Les activités relatives à pH 2 et 7 sont de 55 et 61 %, respectivement. L'effet du pH sur notre enzyme est comparable aux chitinases élaborées par *Sulfolobus tokodaii* 7 (Staufenberger *et al.*, 2012) et *Paenibacillus thermoaerophilus* TC22-2b (Ueda *et al.*, 2015) qui présentent respectivement une activité maximale aux pH 2.5 et 4. Ainsi, la chitinase ChiA-65 du *Bacillus licheniformis* a un pH optimal égale à 4 (Laribi-Habchi *et al.*, 2015). Par ailleurs, *Streptomyces violaceusniger* MTCC 3959 (Nagpure *et al.*, 2013) et *Hydrogenophilus hirschii* KO-DZ44 (Bouacem *et al.*, 2018) ont un pH optimum égal à 5.

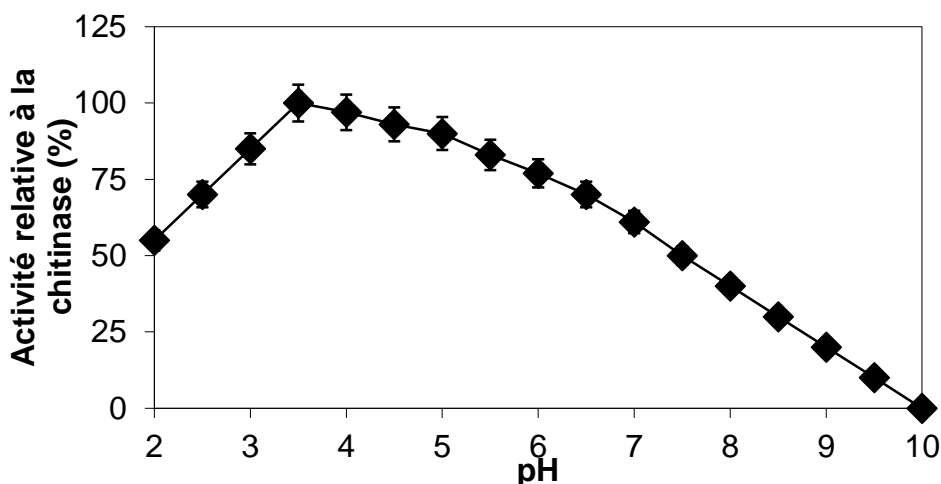


Figure 24A : Effet du pH sur l'activité de la chitinase purifiée Chia-Mt45 de la souche *Melghiribacillus thermohalophilus* Nari2A.

c- Effet de la température sur l'activité et la stabilité de ChiA-Mt45

L'activité de ChiA-Mt45 est présente dans une large gamme de température (40-100 °C). La température optimale enregistrée pour l'activité de chitinase au pH 3.5 est de 80 °C en absence de CaCl₂ et 90 °C en présence de 2 mM Ca²⁺, en utilisant la chitine colloïdale comme substrat (figure 24B). La thermostabilité de ChiA-Mt45 se révèle plus intéressante que celle de la plupart des autres chitinasés bactériennes connues avec des températures optimales dans la gamme de 28-60 °C (Loni *et al.*,2014, Stefanidi *et al.*,2008 et Fu *et al.*,2016) et 75-80°C à l'exception de la chitinase du *Bacillus thuringiensis sub sp. kurstaki* HBK-51 qui a montré l'activité maximale à 110 °C (Kuzu *et al.*,2012).

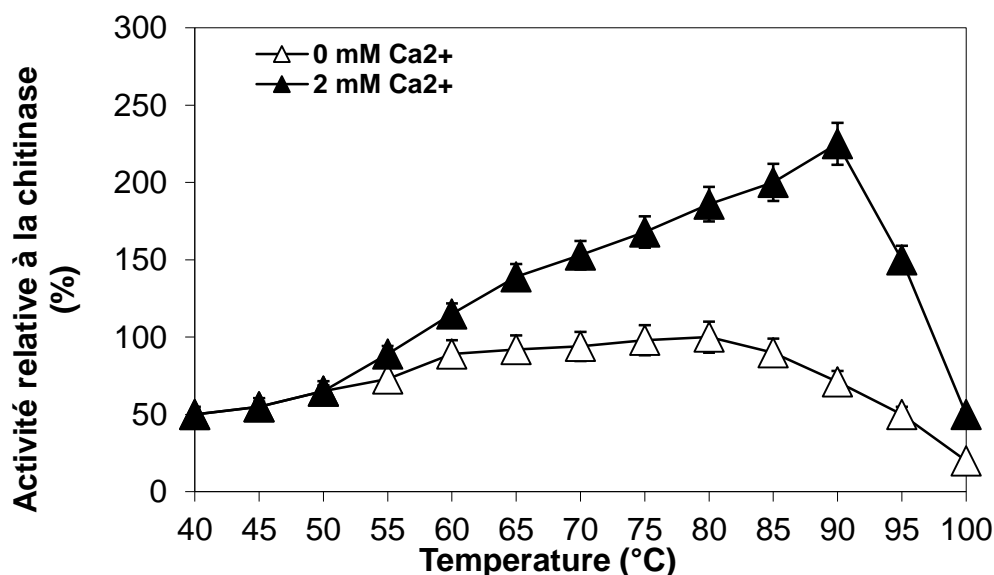


Figure 24B : Effet de la température sur l'activité de la chitinase ChiA-Mt45 de la souche *Melghiribacillus thermohalophilus* Nari2A.

Par la thermostabilité, la chitinase Chia-Mt45 est intéressante dans les processus qui s'effectuent habituellement à haute température (Carroad *et al.*,1978 ; Kudan *et al.*,2009) et pour son application potentielle dans le recyclage des déchets de la chitine.

d- Effet du NaCl sur la stabilité de Chia-Mt45

L'effet de la salinité sur la stabilité de la chitinase de la souche Nari2A a été étudié en utilisant des concentrations croissantes de NaCl de 0 à 10 M (Figure 24C). Plus de 30 % des activités résiduelles ont été obtenues dans l'intervalle de 0,5 à 10 M de NaCl avec une activité optimale à 4 M NaCl. L'activité de l'enzyme a diminué progressivement et a conservé 30% de son activité relative à 10 M de NaCl. L'enzyme est donc halotolérante

De nombreux travaux de recherche ont montré que la stabilité structurale et l'activité enzymatique ont été perdues à des faibles concentrations de sels ou en absence de sels. Contrairement à la Chia-Mt45 qui est parfaitement active et stable en présence et en absence de sel.

Les enzymes des bactéries halophiles nécessitent une forte concentration de sel (4 à 5 M) pour présenter la meilleure solubilité, stabilité et activité catalytique. L'enzyme Chia-Mt45 peut être un candidat idéal pour plusieurs applications biotechnologiques en fonction de la salinité élevée ou basse.

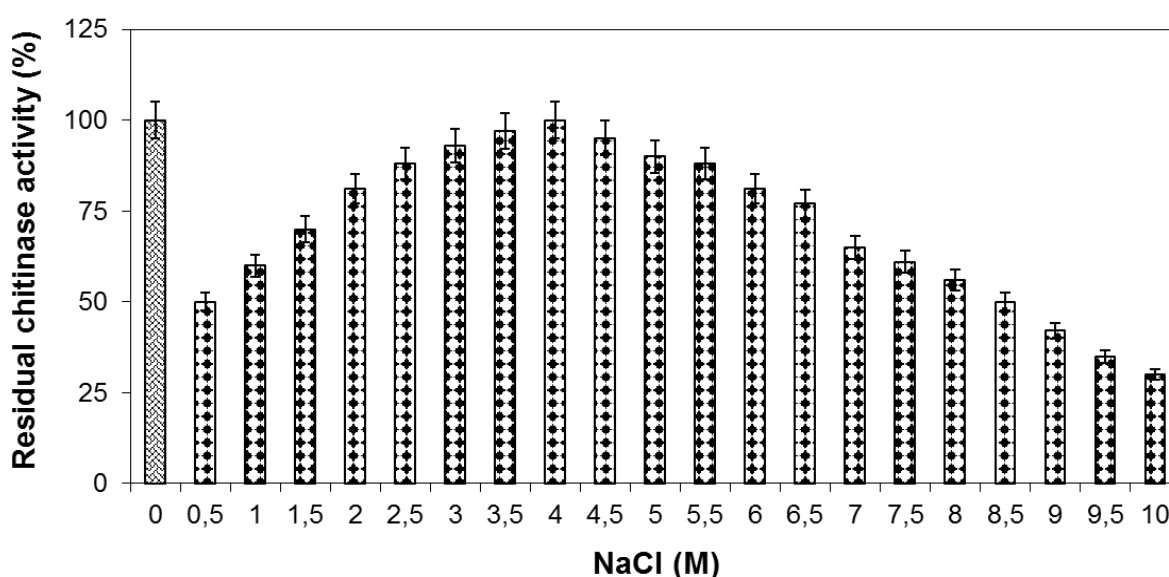


Figure 24C : Effet du NaCl sur l'activité la chitinase ChiA-Mt45

Il y a lieu de souligner que parallèlement à ce travail consacré à la souche Nari 2A (Mohamed *et al.* 2019), Mechri *et al.*,2019 ont étudié une autre enzyme produite par cette même souche. Ce travail a abouti à la caractérisation d'une nouvelle sérine extracellulaire alcaline protéase, subtilisine (appelée SAPN), thermostable et halotolérante comme la Chia-Mt45, potentiellement adaptée à l'extraction de chitine à partir de sous-produits de crustacés (crevettes, crabes...).

*Conclusion
et perspectives*

Le principal objectif de cette thèse était d'étudier le métabolome de trois nouveaux taxons thermohalophiles isolés de sebkha de Melghir (Biskra) *Melghirimyces algeriensis* Nari EX, *Melghirimyces thermohalophilus* Nari 11A et *Melghiribacillus thermohalophilus* Nari 2A.

Le criblage effectué sur ces souches polyextrêmophiles ont mis en évidence une activité antibiotique spécifique anti-*Archaea* présentée par deux entre-elles (Nari EX et Nari 2A). D'autres activités enzymatiques potentiellement intéressantes ont été également détectées chez les trois souches. Toutefois, nous avons ciblé la souche Nari 2A en raison de ses particularités morphologiques uniques dans la famille des *Bacillaceae*, de l'intensité de son action antibiotique et des enzymes qu'elles élaborent.

Concernant son activité antibiotique, nous avons été interpellés par son action spécifique sur les archaea et malgré le fait qu'aucune inhibition des bactéries n'ait été décelée, nous avons opté pour son étude approfondie, d'autant plus que le germe-cible sensible est résistant à un grand nombre d'antibiotiques.

L'étude de son activité anti-*Archaea* a été menée après culture sur milieu liquide, extraction à partir du surnageant avec de l'acétate d'éthyle. Après avoir déterminé son maximum de production, nous avons étudié la stabilité de l'activité vis-à-vis de différents paramètres physiques et fait une recherche préliminaire sur sa structure. Celles-ci a révélé que cette activité n'agit pas sur la paroi bactérienne ; elle est acidotolérante, thermostable, non protéique et pigmentée. Ensuite, nous avons entrepris le processus de purification par différentes méthodes chromatographiques (CCM et HPLC). Ce travail nous renseigne sur le grand nombre de métabolites différents (des centaines) qu'une souche microbienne peut produire.

L'étape de caractérisation du métabolite ATA actif sur les *Archaea* a été poursuivie par des méthodes spectroscopiques. Sa masse moléculaire est de 278. Le spectre RMN a orienté l'identification de la molécule vers les phtalates et probablement des phtalates de dibutyl. Cette substance appartient à la famille des antibiotiques aromatiques selon la classification chimique de Berdy, la molécule est insérée dans le groupe 8.1.2. des dérivés benzéniques monocycliques avec chaîne latérale aliphatique qui comporte le type 8.1.2.3. Benzènes avec une chaîne aliphatique. Les phtalates sont aussi produites par de nombreux autres microorganismes mais peuvent présenter des activités très diverses : antibactériennes, anti-cancéreuses, ... La nouveauté introduite par ce travail concerne l'activité anti-archaea non signalée auparavant chez l'ensemble des bactéries connues. Il reste à préciser la structure exacte de la molécule car nous pensons qu'elle n'a pas été élucidée de façon certaine. C'est ce à quoi nous nous attèlerons dans le futur.

S'agissant des travaux de recherche relatifs aux activités enzymatiques hydrolytiques extracellulaires des trois nouvelles espèces ont été mises en évidence : la cellulase, chitinase, protéases, amylase, estérase et lipase.

L'étude a porté sur la caractérisation d'une nouvelle Chitinase (Chia-Mt45) produite par la souche *Melghiribacillus thermohalophilus* Nari 2A. L'enzyme est halotolérante et unique dans le genre avec un poids moléculaire égale à 45 kDa, un temps de rétention de 10.909 min et présente une activité maximale à pH 3.5 et à une température de 90°C. Ces caractéristiques collectivement suggèrent sa pertinence potentielle pour l'exploitation commerciale à l'avenir dans différents domaines biotechnologiques (industrie alimentaire, industrie d'énergie, la production des insecticides).

En perspectives à ce travail de thèse, nous comptons réaliser :

- Produire des quantités importantes d'ATA pour pouvoir approfondir l'étude de la structure de l'antibiotique. Cela nécessite une étude d'optimisation de la production de la molécule active en milieu liquide, par la recherche des meilleures conditions (effets des sources carbonées et azotées, éléments minéraux, aération, pH, etc...).
- Des tests de toxicité de la molécule bioactive sécrétée par notre souche contre des lignées cellulaires humaines ou animales, in vitro et in vivo, afin de mieux évaluer son intérêt dans le domaine médical et biotechnologique. Dans le cas contraire, la molécule peut servir de base pour la chimie de synthèse qui permet des améliorations à partir de structure de base qu'elle ne peut inventer elle-même.
- Compte tenu du nombre de molécules produite par cette souche extrêmophile, il serait intéressant d'effectuer par des méthodes d'emprunt génétique ciblant des gènes codant pour d'autres antibiotiques ou des enzymes clés de certaines voies métaboliques pour détecter des substances bioactives. Par ailleurs, le séquençage du génome entier des trois souches criblées (Nari 2A et Nari EX) qui nous informerait sur le potentiel réel de production de métabolites secondaires possédant un intérêt biotechnologique.

*Références
bibliographiques*

A

- **Aboobaker Z., Viljoen A., Chen W., Crous P.W., Maharaj V.J., van Vuuren S. (2019)** Endophytic fungi isolated from *Pelargonium sidoides* DC: Antimicrobial interaction and isolation of a bioactive compound. *South African Journal of Botany*, 122, 535-542.
- **Adams, M. W. W., Perler, F. B., Kelly, R. M. (1995)** Extremozymes: Expanding the Limits of Biocatalysis. *Nature Biotechnology*, 13(7), 662-668.
- **Adams, M. W., Kelly, R. M. (1995)** Enzymes from Microorganisms in Extreme Environments. *Chemical & Engineering News*, 73, 32-42.
- **Addou, A.N., Schumann, P., Spröer, C., Hacene, H., Cayol, J.-L., Fardeau, M.-L. (2012)** *Melghirimyces algeriensis* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Thermoactinomycetaceae*, isolated from a salt lake. *Int J Syst Evol Microbiol* 62, 1491-1498.
- **Addou, A. N., Schumann, P., Spröer, C., Bouanane-Darenfed, A., Amarouche-Yala, S., Hacene, H., Cayol, J.-L., Fardeau, M. L. (2013)** *Melghirimyces thermohalophilus* sp. nov., a thermoactinomycete isolated from an Algerian salt lake. *Int J Syst Evol Microbiol* 63, 1717- 1722.
- **Addou, N.A., Schumann, P., Spröer, C., Ben Hania, W., Hacene, H., Fauque, G., Cayol, J.L., Fardeau, M.L. (2015)** *Melghiribacillus thermohalophilus* gen. nov., sp. nov., a novel filamentous, endospore-forming, thermophilic and halophilic bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(4), 1172-1179.
- **Adrangi, S., Faramarzi, M. A., Shahverdi, A. R., Sepehrizadeh, Z. (2010)** Purification and characterization of two extracellular endochitinases from *Massilia timonae*. *Carbohydrate Research*, 345(3), 402-407.
- **Aiadi, S., Touati, N., Yahiaoui, H. (2018)** Criblage des souches halophiles locales productrices d'enzymes hydrolytiques extracellulaires d'intérêt biotechnologique. Université de Béjaïa.
- **Aktuganov, G. E., Galimzianova, N. F., Gilvanova, E. A., Kuzmina, L. Yu., Boyko, T. F., Safina, V. R., Melentiev, A. I. (2018)** Characterization of Chitinase Produced by the Alkaliphilic *Bacillus mannanolyticus* IB-OR17 B1 Strain. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 54, 505-511.
- **Al-Mueini, R., Al-Dalali, M., Al-Amri, I.S., Patzelt, H. (2007)** Hydrocarbon degradation at high salinity by a novel extremely halophilic actinomycete. *Environ. Chem.*, 4, 5-7.
- **Albers, Sonja,V., Vossenbergh, Jack, L.C.M., vande , Driessen, A., Konings, Wil, N.(2001)** Bioenergetics and solute uptake under extreme conditions. *Extremophiles*, 5,285-294.
- **Albuquerquea, L., Rainey, F. A., Nobrec, M. F., da Costa M.S. (2012)** *Oceanicella actignis* gen. nov., sp. nov., a halophilic slightly thermophilic member of the *Alphaproteobacteria*. *Systematic and Applied Microbiology*, 35, 385-389.
- **Allison, S.D., Anchordoquy, T.J. (2000)** Mechanisms of protection of cationic lipid-DNA complexes during lyophilization. *J Pharm Sci* 89, 682-691.

- **Amadei, A., Del Galdo, S., D'Abramo, M. (2018)** Density discriminates between thermophilic and mesophilic proteins. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*.
- **Amoozegar, M. A., Fatemi, A. Z., Karbalaee-Heidari, H. R., Razavi, M. R. (2007)** Production of an extracellular alkaline metalloprotease from a newly isolated, moderately halophile, *Salinivibrio* sp. strain AF-2004. *Microbiological Research*, 162, 369-377.
- **Amoozegar, M. A., Salehghamari, E., Khajeh, K., Kabiri, M., Naddaf, S. (2008)** Production of an extracellular thermohalophilic lipase from a moderately halophilic bacterium, *Salinivibrio* sp. strain SA-2. *Journal of Basic Microbiology*, 48(3), 160-167.
- **Amoozegar, M. A., Safarpour, A., Noghabi, K. A., Bakhtiary, T., Ventosa, A. (2019)** Halophiles and their vast potential in biofuel production. University of Tehran, Iran.
- **Andronopoulo, E., Vorgias, C. E. (2004)** Multiple components and induction mechanism of the chitinolytic system of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus chitonophagus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65, 694-702.
- **Antranikian, G., Vorgias, C., Bertoldo, C. (2005)** Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysts. *Marine Biotechnology. Adv Biochem Eng Biotechnol*, 96, 219-262
- **Antranikian, G. (2008)** Industrial relevance of thermophiles and their enzymes in: Thermophiles, biology and technology at high temperatures.
- **Arakawa, T., Timasheff, S. N. (1985)** The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophysical Society*, 47, 411-414.
- **Atta, H.M., Dabour, S.M., Desoukey, S.G. (2009)** Sparsomycin antibiotic production by *Streptomyces* sp. AZ-NIOFDI: Taxonomy, fermentation, purification and biological activity. *J Agric & Environ Sci*, 5(3), 368-377.
- **Averya, L.M., Kuti, J. L., Maja Weisser, A., Rybake, M. J., Zasowski, E., Arias, C. A., Pearlie, P. Chongj, S.L., Aitkenk , A. J., DiPippok, Jann-Tay, W., Nicholas, S. Britt , Nicolaua, D. P. (2019)** Pharmacodynamics of daptomycin in combination with other antibiotics for the treatment of *enterococcal bacteraemia*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 54, 346-350.

B

- **Babashpour, S., Aminzadeh, S., Farrokhi, N., Karkhane, A., Haghbeen, K. (2012)** Characterization of a Chitinase (Chit62) from *Serratia marcescens* B4A and Its Efficacy as a Bioshield Against Plant Fungal Pathogens. *Biochem Genet*, 50,722-735.
- **Baker-Austin, C., Dopson, M. (2007)** Life in acid: pH homeostasis in acidophiles.

- **Baker-Austin, C., Dopson, M. (2007)** Wexler, M., Sawers, R. G. Extreme arsenic resistance by the acidophilic archaeon '*Ferroplasma acidarmanus*' Fer1. *Extremophiles*, 11,425-434.
- **Bahrami, A., Shojaosadati, S.A., Mohebali, G., (2001)** Biodegradation of dibenzothiophene by thermophilic bacteria. *Biotechnol. Lett*, 23, 899- 901.
- **Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Klenk HP, Clément C, Ouhdouch Y and van Wezel GP. (2016)** Taxonomy, physiology, and natural products of *Actinobacteria*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*, 80, 1- 43.
- **Barton, L. L. (2005)** Physiological Basis for Growth in Extreme Environments. *Structural and Functional Relationships in Prokaryotes*, 348-393.
- **Beeby, M., Connor, B., Ryttersgaard, C., Daniel, R. Boutz, L. Perry, J., Todd, Yeates O. (2005)** The Genomics of Disulfide Bonding and Protein Stabilization in Thermophiles. *Disulfide Bonds in Thermophiles*, 3, 9, 309.
- **Belyagoubi, L., Belyagoubi-Benhammou, N., Jurado, V., Djebbah, F. Ounadjela, Z., Benaissa, S. (2018)** Antimicrobial activities of culturable microorganisms (actinomycetes and fungi) isolated from Chaabe Cave, Algeria. *International Journal of Speleology*, 47, 189-199.
- **Berezovsky, I.N., Shakhnovich, E.I. (2005)** Physics and evolution of thermophilic adaptation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 12742-12747.
- **Bérdy, J. (1974)** Recent Developments of Antibiotic Research and Classification of Antibiotics According to Chemical Structure. Research Institute for Pihamceutical Chemistry, Budapest, Hungary.
- **Bérdy, J. (2005)** Bioactive Microbial Metabolites. *J. Antibiot.*, 58(1), 1-26.
- **Bérdy, J. (2012)** Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *The Journal of Antibiotics*, 65, 385-395.
- **Besse, A., Peduzzi, J., Rebuffat, S., Carre-Mlouka, A. (2015)** Antimicrobial peptides and proteins in the face of extremes: Lessons from archaeococci. *Biochimie*, 118, 344-355.
- **Bhatnagar, I., Kim, S.K. (2010)** Immense essence of excellence: marine microbial bioactive compounds, *Mar. Drugs*, 8, 2673-2701.
- **Billi, D. (2012)** Plasmid Stability in Dried Cells of the Desert Cyanobacterium *Chroococcidiopsis* and its Potential for GFP Imaging of Survivors on Earth and in Space. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, 42, 235-245.
- **Blöchl, E., Rachel, R., Burggraf, S., Hafenbradl, D., Jannasch, H.W. 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*, 1, 14-21.
- **Blunt, J. W., Copp B. R., Keyzers, R. A., Munro, M. H. G., Prinsep, M. R. (2015)** Marine natural products. *Royal Society of Chemistry*, 32, 116-211.
- **Bonete, M. J., Martínez-Espinosa, R. M. (2011)** Enzymes from Halophilic Archaea: Open Questions. *Halophiles and Hypersaline Environments*, 359-371.
- **Bouacem, K., Laribi-Habchi, H., Mechri, S., Hacene, H., Jaouadi, B., Bouanane-Darenfed, A. (2018)** Biochemical characterization of a novel thermostable chitinase from *Hydrogenophilus hirschii* strain KB-DZ44,106, 338–350.

- **Bouanane-Darenfed, A., Boucherba, N., Bouacem, K., Gagaoua, M., Joseph, M., Kebbouche-Gana, S., Nateche, F., Hacene, H., Ollivier, B., Cayol, J.L., Fardeau, M.L. (2016)** Characterization of a purified thermostable xylanase from *Caldicoprobacter algeriensis* sp. nov. strain TH7C1 T. Carbohydrate Research, 419, 60-68.
- **Boubetra, D., Zitouni, A., Bouras, N., Mathieu, F., Lebrihi, A., Schumann, P. Sproer, C., Klenk, H. P., Sabaou, N. (2013)** *Saccharothrix hoggarensis* sp. nov., an actinomycete isolated from Saharan soil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63, 549-553.
- **Boubetra, D. Sabaou, N., Zitouni, A., Bijani, C., Lebrihi, A., Mathieu, F. (2013)** Taxonomy and chemical characterization of new antibiotics produced by *Saccharothrix* SA198 isolated from a Saharan soil. Microbiological Research, 168, 223-230.
- **Boumehira, A.A., El-Enshasy, H.A., Hacène, H., Elsayed, A., Aziz, R., Park, Y. (2016)** Recent Progress on the Development of Antibiotics from the Genus *Micromonospora*, Biotechnology and Bioprocess Engineering ,21, 199-223.
- **Boumehira, A. Z., El-Enshasy, H. A., Hacène, H., Elsayed, E. A., Aziz, R., Park, E. P. (2016)** Recent progress on the development of antibiotics from the genus *Micromonospora*. Biotechnology and Bioprocess Engineering, Volume 21, 199-223.
- **Boutaiba, S., Bhatnagar, T., Hacene, H., Mitchell, D. A., Baratti, J. C. (2006)** Preliminary characterisation of a lipolytic activity from an extremely halophilic archaeon, *Natronococcus* sp. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 41, 21-26.
- **Bowers, j. (2009)** Chaucer and Langland: The Antagonistic Tradition. The journal of the Medieval Academy of America.
- **Bowers, K. J., Wiegel, J. (2011)** Temperature and pH optima of extremely halophilic archaea: a mini-review. Extremophiles, 15,119-128.
- **Bradford, M.M. 1976** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72(1), 248-254.
- **Brock, T. D., Freeze, H. (1969)** *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a Nonsporulating Extreme Thermophile. Journal of bacteriology, 289-297.
- **Brock, Scott, A., Chapman, E. A., Man, A., Waoe, G. (1994)** Dietary Manganese Deficiency Decreases Rat Hepatic Arginase Activity. American Institute of Nutrition. 3122-3166, 94.
- **Bruna N., Collao, B., Tello, A., Caravantes, P., Díaz-Silva, N., Monrás, J. P., Órdenes Aenishanslins, N., Flores, M., Espinoza-Gonzalez, R., Bravo, D., Pérez-Donoso, J. M. (2019)** Synthesis of salt-stable fluorescent nanoparticles (quantum dots) by polyextremophile halophilic bacteria. Scientific Reports, 9, 19-53.
- **Buenger, J., Driller, H. (2004)** Ectoin: An Effective Natural Substance to Prevent UVA-Induced Premature Photoaging. Skin Pharmacology and Physiology, 17(5), 232-237.
- **Bus, J. B. and J. E. Gibson (1979)** Lipid peroxidation and its role in toxicology. In: Hodgson, E., J. Bend, and R. Philpot (eds.), Rev. Biochem. Toxicol. 1: 125-149.

- **Buss, S. B., Cole, J. A., Hannett, G. H., Nazarian, E. J., Nazarian, L., Coorevits, A., Landschoot, A. V., De Vos, P., Schumann, P., Musser, K. A., Wolfgang, W. J. (2013)** *Hazenella coriacea* gen. nov., sp. nov., isolated from clinical specimens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 4087-4093.

C

- **Carrasco, I. J., Marquez, M. C., Xue, Y., Ma, Y., Cowan, D. A., Jones, B. E., Grant, W. D., Ventosa, A. (2008)** *Sediminibacillus halophilus* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic, Gram-positive bacterium from a hypersaline lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 1961-1967.
- **Chakravartya, S., Varadarajan, R. (2000)** Elucidation of determinants of protein stability through genome sequence analysis. *FEBS Letters*, 470, 65-69.
- **Chamkha, M., Mnif, S., Sayadi, S. (2008)** Isolation of a thermophilic and halophilic tyrosol-degrading *Geobacillus* from a Tunisian high-temperature oil celd. *FEMS Microbiol Lett*, 283, 23-29.
- **Champdoré, M. D., Staiano, M., Rossi, M., Sabato D'Auria, S. (2006)** Proteins from extremophiles as stable tools for advanced biotechnological applications of high social interest. *Journal of The Royal Society Interface*, 4(13), 183–191.
- **Chaouch, F. C., Bouznada, K., Bouras, N., Meklat, A., Tata, S., Mokrane, S., Lamari, L., Florence, M., Spröer, C., Klenk H.P., Sabaou N. (2018)** *Planomonospora*, *Saccharothrix* and *Actinophytocola* Genera in saharan soils of Algeria : isolation, taxonomic identification and antagonistic properties. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 7, 5, 460-465.
- **Charpentier, M., Percheron, F. (1983)** The chitin-degrading enzyme system of a *Streptomyces* species. *The International Journal of Biochemistry*, 15(3), 289-292.
- **Chaston, J.J., Smits, C., Araga, D., Wong, S.W. Ahsan, B., Sandin, S., Sudheer, K., Sanjay, K. Molugu, R. A., Stock, D., Stewart, A. G. (2016)** *Structure* 24, 1–11.
- **Chen, Y., Cui, X., Fritze, D., Chai, L., Schumann, P., Wen, M., Wang, Y., Xu, L., Jiang, C. (2008)** *Virgibacillus kekensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a salt lake in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 647–653.
- **Chen, M., Zhou, J.R., Li, C.Y., Song, Y.Y., Xie, L.J., Chen, S. and Zeng, R.S. (2009)** Isolation, identification and bioactivity of allelochemicals of *Streptomyces* sp. strain 6803. *Allelopathy Journal*, 23, 411-424.
- **Chen, P., Zhu, Y., Men, Y., Zeng, Y., Sun, Y. (2018)** Purification and Characterization of a Novel Alginat Lyase from the Marine Bacterium *Bacillus* sp. Alg07. *Mar. Drugs*, 16, 86.

- **Cheikh, R. (2006)** Évaluation des classifications phylogénétiques des *Bacillaceae* basées sur les gènes de l'opéron *rrn* et de gènes de ménage. Université du Québec à Montréal.
- **Cho, S.C., Bhang, S.Y., Hong, Y.C., Shin, M.S., Kim, B.N., Kim, J.W., Yoo, H.J., Cho, I.H., Kim, H.W. (2010)** Relationship between environmental phthalate exposure and the intelligence of school-age children. *Environ. Environ Health Perspect*, 118(7), 1027-1032.
- **Ceylan O., Okmen G., Ugur A. (2008)** Isolation of soil *Streptomyces* as source antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria. *Eur Asia J BioSci*. 2: 73-82.
- **Collins, M. D., Jones, D. (1982)** Reclassification of *Corynebacterium pyogenes* (Glage) in the Genus *Actinomyces*, as *Actinomyces pyogenes* comb.nov. *Microbiology*, 120-128.
- **Collins, R. E., Deming, J. W. (2013)** An inter-order horizontal gene transfer event enables the catabolism of compatible solutes by *Colwellia psychrerythraea* 34H. *Extremophiles*, 17, 601-610.
- **Combet-Blanc, Y., Ollivier, B., Garcia, J. (2000)** Bacterial strains of the genus *Bacillus*, closely phenotypically related to the genus *Lactobacillus*, culture method and use.
- **Clardy, J., Fischbach, M.A., Walsh, C. T. (2006)** New antibiotics from bacterial natural products. *Nature biotechnology*, 24.
- **Coates, A., Hu, Y. (2007)** Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections. *British Journal of Pharmacology*, 152, 1147-1154.
- **Cohen-Kupiec, R., Chet, I. (1998)** The molecular biology of chitin digestion. *Current Opinion in Biotechnology*, 9, 270-277.
- **Colombo, S., D'auria, S., Fusi, P., Zecca, L., Raia, C. A., Tortora, P. (1992)** Purification and characterization of a thermostable carboxypeptidase from the extreme thermophilic archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*. *European Journal of Biochemistry*, 206, 349-357.
- **Conde-Cida, M., Álvarez-Esmorisa, C., Paradelo-Núñez, R., María, J. Fernández-Sanjurjo, Núñez-Delgado, A. (2018)** Occurrence of tetracyclines and sulfonamides in manures, agricultural soils and crops from different areas in Galicia (NW Spain) . *Word count*, 10, 166-170.
- **Coorevits, A., Logan, N. A., Dinsdale, A. E., Halket, G., Scheldeman, P., Heyndrickx, M., Schumann, P., Landschoot, A. V., De Vos, P. (2011)** *Bacillus thermolactis* sp. nov., isolated from dairy farms, and emended description of *Bacillus thermoamylovorans*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61.
- **Coque, R., (1962)** La Tunisie présaharienne : étude géomorphologique. Paris :. A. Collin, 27, 431-457.
- **Coolbear, T., Daniel R. M., Morgan, H. W. (1992)** The Enzymes from Extreme Thermophiles: Bacterial Sources, Thermostabilities and Industrial Relevance. *Biotechnology*, 45.

- **Cox, R.M., Parker, E. U., Cheney, D.M., Liebl, A.L., Martin, L. B., Calsbeek, R. (2010)** Experimental evidence for physiological costs underlying the trade-off between reproduction and survival . *Functional Ecology* 24, 1262-1269.
- **Creighton, T. E. (1994)** *Proteins: Structures and Molecular Properties*. W. H. Freeman. New York, NY.
- **Cross, T., Walker, P. D., Gould, G. W. (1968)** Thermophilic Actinomycetes producing Resistant Endospores. *Nature*, 220(5165), 352-354.
- **Cross, C. E., B. H. Halliwell, E. T. Borish, W. A. Pryor, B. E. Ames, R. L. Sual, J. Mccord, and D. Harman (1987)** Oxygen radicals and human disease. *Ann. Intern. Med.* 107, 526-545.
- **Csonka, L. N. (1989)** Physiological and Genetic Responses of Bacteria to Osmotic Stress. *Microbiological reviews*, 53, 1, 121-147.

D

- **Dahiya, N., Tewari, R., Hoondal, G. S. (2006)** Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 773-782.
- **Dai, D., Hu, W., Huang, G., Li, W. (2011)** Purification and characterization of a novel extracellular chitinase from thermophilic *Bacillus sp.* Hu1. *African Journal of Biotechnology*, 10, 2476-2485.
- **Dalmasso, C., Oger, P., Courtine, D., Georges, M., Takai, K., Maignien, L., Alaina, K. (2016)** Erratum for Dalmasso *et al.*, Complete Genome Sequence of the Hyperthermophilic and Piezophilic Archaeon *Thermococcus piezophilus* CDGST, Able To Grow under Extreme Hydrostatic Pressures. *Genome Announcements*, 4, 5, 101-116.
- **Das, R., Gerstein, M. (2000)** The stability of thermophilic proteins: a study based on comprehensive genome comparison. *Funct Integr Genomics*, 1, 76-88.
- **D'Alessandro, C. P., De Castro, R. E., Giménez, M. I., Paggi, R. A. (2007)** Effect of nutritional conditions on extracellular protease production by the haloalkaliphilic archaeon *Natrialba magadii*. *Letters in Applied Microbiology*, 44(6), 637-642.
- **D'Auria, F., Galassi, G. M. (1998)** Code validation and uncertainties in system thermalhydraulics. *Progress in Nuclear Energy*, 33(1-2), 175-216.
- **Demain, A. L., Lancini, G. (2006)** Bacterial Pharmaceutical Products. *The Prokaryotes*, 812-833.
- **Deming, j.w., Somers, L., Straub, W., Macdonell, M. (1988)** Isolation of an Obligately Barophilic Bacterium and Description of a New Genus, *Colwellia* gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 10, 2, 152-160.
- **Deng, Y., Lu, Z., Lu, F., Zhang, C., Wang, Y., Zhao, H., Bie, X. (2011)** Identification of LI-F type antibiotics and di-n-butyl phthalate produced by *Paenibacillus polymyxa*. *Journal of Microbiological Methods*, 85, 175-182.

- **De Lourdes Moreno, M., Garcia, M. T., Ventosa, A., Mellado, E. (2009)** Characterization of *Salicola sp.* IC10, a lipase- and protease-producing extreme halophile. *FEMS Microbiology Ecology*, 68(1), 59-71.
- **Diamant, S., Eliahu, N., Rosenthal, D., Goloubinoff, P. (2001)** Chemical Chaperones Regulate Molecular Chaperones in Vitro and in Cells under Combined Salt and Heat Stresses. *The journal of biological chemistry*, 276, 43, 39586-39591.
- **Dobrzynska MM, Tyrkiel EJ, Pachocki KA. (2011)** Developmental toxicity in mice following paternal exposure to di-n-butyl-phthalate (DBP). *Biomed Environ Sci*, 24(5), 569–578.
- **Dopson, M. (2016)** Physiological and phylogenetic diversity of acidophilic bacteria.
- **Driche, E., Belghit, S., Bijani, C., Zitouni, A., Sabaou, N., Mathieu, F., Badji, B. (2014)** A new *Streptomyces* strain isolated from Saharan soil produces di-(2-ethylhexyl) phthalate, a metabolite active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann Microbiol*.
- **Dufresne, A., Cavallé, J.-Y., Helbert, W. (1996)** New Nanocomposite Materials: Microcrystalline Starch Reinforced Thermoplastic. *Macromolecules*, 29(23), 7624-7626.
- **Dumorné, K., Córdova, D. C., Astorga-Eló, M., Renganathan, P. (2017)** jmb Extremozymes: A Potential Source for Industrial Applications. *J. Microbiol. Biotechnol*, 27(4), 649-659.
- **Dym, O., Mevarech, M., Sussman, J. L. (1995)** Structural Features That Stabilize Halophilic Malate Dehydrogenase from an *Archaeobacterium*. *Science, New Series*, 267, 5202, 1344-1346.

E

- **Ebel, C. Faou, P., Zaccai, G. (1999)** Protein-solvent and weak protein-protein interactions in halophilic malate dehydrogenase. *Journal of Crystal Growth*, 196, 395-402.
- **Edgerton, M., Brimblecombe, P. (1981)** Thermodynamics of halobacterial environments. *Revue canadienne de microbiologie*, 27(9), 899-909.
- **Ekka, B., Nayak, S. R., Achary, L. S. K., Sarita, Kumar, A., Mawatwal, S., Patel, R. K. (2018)** Synthesis of hydroxyapatite-zirconia nanocomposite through sonochemical route: a potential catalyst for degradation of phenolic compounds. *Journal of Environmental Chemical Engineering*.
- **Ekka, A., Namdeo, N. (2018)** Screening, Isolation and Characterization of Amylase Producing Bacteria and optimization for Production of Amylase. *Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 4, 50-56.
- **El-Hamshary, O., Khattab, A. A. (2008)** Evaluation of antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* and their fusants against *Fusarium solani*.

- **El-Sayed, M. H. (2012)** Di-(2-ethylhexyl) Phthalate, a Major Bioactive Metabolite with Antimicrobial and Cytotoxic Activity Isolated from the Culture Filtrate of Newly Isolated Soil *Streptomyces* (*Streptomyces mirabilis* Strain NSQu-25). *World Applied Sciences Journal*, 20, (9): 1202-1212.
- **El-Sayed, O.H., Asker, M. S., Shash, S.M., Hamed, S. R. (2015)** Isolation, Structure elucidation and Biological Activity of Di-(2-ethylhexyl) phthalate Produced by *Penicillium janthinellum* 62. *International Journal of ChemTech Research*.8, 1, 58-66.
- **Empadinhas, N., Da Costa, M. (2008)** Osmoadaptation mechanisms in prokaryotes: distribution of compatible solutes. *International microbiology*, 11,151-161.
- **Enache, M., Kanmekura, M. (2010)** Hydrolytic enzymes of halophilic microorganisms and their economic values. *Rom. J. Biochem.*, 47, 1, 47-59.

F

- **Falb, M., Muller, K., Konigsmair, L., Oberwinkler, T., Horn, P., Gronau, S., Gonzalez, O., Pfeiffer F., Bornberg-Bauer, E., Oesterhelt, D. (2008)** Metabolism of halophilic archaea. *Extremophiles*, 12,177-196.
- **Fardeau, M., Salinas, M. B., L'Haridon, S., Jeanthon, C., Verhé, F., Cayol, J., Patel, B. K. C., Garcia, J., Ollivier, B. (2004)** Isolation from oil reservoirs of novel thermophilic anaerobes phylogenetically related to *Thermoanaerobacter subterraneus*: reassignment of *T.subterraneus*, *Thermoanaerobacter yonseiensis*, *Thermoanaerobacter tengcongensis* and *Carboxydibrachium pacificum* to *Caldanaerobacter subterraneus* gen. nov., sp. nov., comb. nov. as four novel subspecies. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*,_54.
- **Faria, P.C.C. Orf, J.J.M., Pereira M.F.R. (2004)** Adsorption of anionic and cationic dyes on activated carbons with different surface chemistries. *Water Research*, 38, 2043-2052.
- **Fariha, H., Shah, A. A., Hameed A. (2009)** Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 27, 782-798.
- **Fenical, W. (1993)** Chemical studies of marine bacteria: developing a new resource. *Chemical Reviews*, 93, 5, 1673-1683.
- **Frankfurt, O.S., Krishan, A. (2003)** Apoptosis-based drug screening and detection of selective toxicity to cancer cells, *Anticancer Drugs*, 14, 555-561.
- **Ferrera, I., Reysenbach, A.L. (2007)** Thermophiles. eLS.
- **Fritze, D. (1996)** *Bacillus haloalkaliphilus* sp. nov. *International journal of systematic bacteriology*, 98-101.
- **Fu, X., Yan, Q., Yang, S., Yang, X., Guo, Y., & Jiang, Z. (2014)** An acidic, thermostable exochitinase with β -N-acetylglucosaminidase activity from *Paenibacillus*

barengoltzii converting chitin to N-acetyl glucosamine. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1).

- **Fu, X., Yan, Q., Wang, J., Yang, S., Jiang, Z. (2016)** Purification and biochemical characterization of novel acidic chitinase from *Paenicibacillus barengoltzii*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, 973-979.

G

- **Galinski, E. A.** Osmoadaptation in Bacteria. Institut für Mikrobiologie and Biotechnologie, Meckenheimer Allee 168, 53115 Bonn, Germany.
- **Galisteo, C., Sánchez-Porro, C., Haba, R. R., Fernández, B., María, E., Ventosa, A. (2019)** Characterization of *Salinivibrio socompensis* sp. nov., A New Halophilic Bacterium Isolated from the High-Altitude Hypersaline Lake Socompa, Argentina. *Microorganisms*, 7, 241.
- **Galleguillos, P. A., Grail, B. M., Hallberg, K. B., Demergasso, C. S., Johnson D. B. (2018)** Identification of trehalose as a compatible solute in different species of acidophilic bacteria. *Journal of Microbiology*, 56, 10, 727-733.
- **Garcia, M. T., Gallego, V., Ventosa, A., Mellado, E. (2005)** *Thalassobacillus devorans* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic, phenol-degrading, Gram-positive bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 1789-1795.
- **Gasmi, M., Kitouni, M., Carro, L., Pujic, P., Normand, P., Boubakri, H. (2019)** Chitinolytic actinobacteria isolated from an Algerian semi-arid soil: development of an antifungal chitinase-dependent assay and GH18 chitinase gene identification. *Annals of Microbiology*, 69, 395-405.
- **Gee, B. M., Lund, J., Mmetcalf, G., Peel J. L. (1980)** Properties of a New Group of Alkalophilic Bacteria. *Journal of General Microbiology* 117, 9-17.
- **Ghati, A., Paul, G. (2015)** Purification and characterization of a thermo-halophilic, alkali-stable and extremely benzene tolerant esterase from a thermo-halo tolerant *Bacillus cereus* strain AGP-03, isolated from “Bakreshwar” hot spring, India. *Process Biochemistry*, 50(5), 771-781.
- **Gomes, J. Steiner, W. (2004)** The Biocatalytic Potential of Extremophiles and Extremozymes. *Extremophiles and Extremozymes*, Food Technol. Biotechnol. 42 (4) 223-235.
- **González, J.M., Sheckells, D., Viebahn, M., Krupatkina, D., Borges, K.M., Robb, F. (1999)** *Thermococcus waiotapuensis* sp. nov., an extremely thermophilic archaeon isolated from a freshwater hot spring. *Arch Microbiol.*
- **Grant, W. D., Kamekura, M., McGenity, T. J., Ventosa, A. (2001)** Class III. *Halobacteria* class. nov. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, 1, 294-301. Edited by D. R. Boone, R. W. Castenholz & G. M. Garrity. New York: Springer.

- **Grant, W. D. (2004)** Life at low water activity. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 359, 1249-1267.
- **Gregoire, P., Fardeau, ML., Guasco, S., Bouanane, A., Michotey, V., Bonin, P., Dubourg, K., Cambar, J., Ollivier, B. (2009)** Les micro-organismes de l'extreme . Press Therm Climat, 146, 49-61.
- **Groth, I., Schumann, P., Weiss, N., Martin, K. & Rainey, F. A. (1996)** *Agrococcus jenensis* gen. nov., sp. nov., a new genus of actinomycetes with diaminobutyric acid in the cell wall. *Int J Syst Bacteriol* 46, 234-239.
- **Gunde, C. N., Plemenitas, A., Oren, A. (2018)** Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 42, 3.
- **Gupta, A., Khare, S. K. (2009)** Enzymes from solvent-tolerant microbes: Useful biocatalysts for non-aqueous enzymology. *Critical Reviews in Biotechnology*, 29(1), 44-54.
- **Gupta, R. S., Naushad, S., Baker, S. (2015)** Phylogenomic analyses and molecular signatures for the class *Halobacteria* and its two major clades: a proposal for division of the class *Halobacteria* into an emended order *Halobacteriales* and two new orders, *Haloferacales* ord. nov. and *Natrialbales* ord. nov., containing the novel families *Haloferacaceae* fam. nov. and *Natrialbaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65, 1050–1069.
- **Gupta, S. D., Agarwal, A., Pradhan, S. (2018)** Phytostimulatory effect of silver nanoparticles (AgNPs) on rice seedling growth: An insight from antioxidative enzyme activities and gene expression patterns. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 161, 624-633.

H

- **Hacene, H., Kebir, K. and Sid-Othmane, D. (1994)** Lefebvre. HM17, a new polyene antifungal antibiotic produced by a new strain of *Spirillospora*. *J Appl Bacteriol.*, 77, 484-489.
- **Hacène, H., Sabaou, N., Bounaga, N., Lefebvre, G. (1994)** Screening for non-polyenic antifungal antibiotics produced by rare Actinomycetales. *Microbios*, 79, 81-85.
- **Hacene, H., Rafa, F., Chebhouni, N., Boutaiba, S., Bhatnager, T., Baratti, J. C., Olivier, B. (2004)** Biodiversity of prokaryotic microflora in El Golea salt lake: Algerian sahara. *J Arid Environ.* 58, 273-284.
- **Hainque, B. (2008)** Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire.
- **Halitim, A. (1988)** Sols des régions arides. 384.
- **Hamedi, J., Mohammadipanah, F., Ventosa, A. (2012)** Systematic and biotechnological aspects of halophilic and halotolerant actinomycetes. *Extremophiles*, 17(1), 1–13.

- **Haque, R. U., Paradisi F., Allers, T. (2019)** *Haloferax volcanii* as immobilised whole cell biocatalyst: new applications for halophilic systems. Applied Microbiology and Biotechnology.
- **Hassani,I.I., Robert, C., Michelle, C., Raoult, D., Hacène, H., Desnues, C. (2013)** Non-contiguous finished genome sequence and description of *Halopiger djelfamassiliensis* sp. nov. Standards in Genomic Sciences 9:160-174.
- **Hatayama, K., Shoun, H., Ueda, Y., Nakamura, A. (2005)** *Planifilum fimeticola* gen. nov., sp. nov. and *Planifilum fulgidum* sp. nov., novel members of the family 'Thermoactinomycetaceae' isolated from compost. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55.
- **Heyndrickx, M., Lebbe, L., Vancanneyt, M., Kersters, K., De Vos, P., Logan, N. A., Forsyth, G., Nazli, S., Ali, N., Berkeley, R. C. W. (1997)** A Polyphasic Reassessment of the Genus *Aneurinibacillus*, Reclassification of *Bacillus thermoaerophilus* (Meier-Stauffer et al. 1996) as *Aneurinibacillus thermoaerophilus* comb. nov., and Emended Descriptions of *A. aneurinilyticus* corrig., *A. migulanus*, and *A. thermoaerophilus*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 47.
- **Hoang, V. T., Lib, Y., Kima, S. (2008)** Cathepsin B inhibitory activities of phthalates isolated from a marine Pseudomonas strain. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 18, 2083-2088.

- **Holden, M. T.G., Chhabra, S. R., Nys R. D., Stead, P., Bainton, N. J., Hill P. J., Manefield M., Kumar N., Labatte M., England, D., Rice, S., Mike Givskov, M., Salmond, G. P.C., Stewart, G. S.A.B., Bycroft B. W., Kjelleberg, S., Williams, P. (1999)** Quorum- sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram- negative bacteria. Journal of Molecular Biology,33, 1254-1266.
- **Holden, J. (2009)** Extremophiles: hot environments. Encyclopedia of Microbiology. Elsevier, Oxford, 127-146.
- **Horikoshi, K. (1999)** Alkaliphiles: Some Applications of Their Products for Biotechnology. Microbiology and molecular biology reviews, 63, 4, 735, 750.
- **Horikoshi, K., Bull, A. T. (2011)** Prologue: definition, categories, distribution, origin and evolution, pioneering studies, and emerging fields of extremophiles. In Extremophiles Handbook, 3-15.
- **Hough, D. W., Danson, M. J. (1999)** Extremozymes. Current Opinion in Chemical Biology: Biocatalysis and biotransformation, 3: 39-46.
- **Huber, H., Stetter, K. O. (1998)** Hyperthermophiles and their possible potential in biotechnology. J Biotechnol 64, 39-52.
- **Hung, K. S., Liu, S. M., Tzou, W.S., Lin, F.P., Pan, C.L., Fang, T.Y., Sun, K.H., Tang, S.J. (2011)** Characterization of a novel GH10 thermostable, halophilic xylanase from the marine bacterium *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* NTOU1. Process Biochem 46(6), 1257-1263.
- **Hunter, L., Christopher, J. (2018)** Protein adaptations of Archaeal extremophiles.

I

- **Ilic S.B., Konstantinovic S.S., Todorovic Z.B. (2005)** UV /VIS analysis and antimicrobial activity of *Streptomyces* isolates. *Medecine and Biology*. 12(1): 44-46.
- **Inokuma, K., Takano, M., Hoshino, K. (2013)** Direct ethanol production from *N*-acetylglucosamine and chitin substrates by *Mucor* species. *Biochemical Engineering Journal*, 72, 24-32.
- **Itoh, Y., Sugai, A., Uda, I., Itoh, T. (2001)** The evolution of lipids. *Adv Space Res* 28, 719-724.
- **Iyer, P. V., Ananthanarayan, L. (2008)** Enzyme stability and stabilization-Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochemistry*, 43, 1019-1032.

J

- **Jaenicke, R. (2000a)** Stability and stabilization of globular proteins in solution. *J Biotechnol* 79, 193-203.
- **Jaenicke, R. (2000b)** Do ultrastable proteins from hyperthermophiles have high or low conformational rigidity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 2962-2964.
- **Jaenicke, R., Sterner, R. (2006)** Life at High Temperatures. *The Prokaryotes*, 2, 167-209.
- **Juby, T.R., Usha, R. (2018)** Antibacterial Finish for Cotton Fabric from Actinomycetes Isolated from Forest Soil. *Journal of pure and applied microbiology*, 12(1), 333-341.

K

- **Kamekura, M., Urawa, Onishi, H. (1975)** Halophilic nuclease and process for producing the same. 406,788-789.
- **Kamekura, M., Hamakawa, T., Onishi, H. (1982)** Application of halophilic nuclease H of *Micrococcus varians* subsp. *halophilus* to commercial production of flavoring agent 5'-GMP. *American society for microbiology*.
- **Kamekura, M., & Onishi, H. (1982)** Cell-associated cations of the moderate halophile *Micrococcus varians* ssp. *halophilus* grown in media of high concentrations of LiCl, NaCl, KCl, RbCl, or CsCl. *Canadian Journal of Microbiology*, 28(2), 155-161.
- **Kanapathipillai, M., Lentzen, G., Sierks, M., & Park, C. B. (2005)** Ectoine and hydroxyectoine inhibit aggregation and neurotoxicity of Alzheimer's β -amyloid. *FEBS Letters*, 579(21), 4775-4780.
- **Kanchiswamy, C. N., Malnoy, M., Maffei M. E. (2015)** Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. *Frontiers in Plant Science*, 6, 151.

- **Kanekar, P. P., Kanekar, S. P., Kelkar , A. S. Dhakephalkar, P. K. (2012)** Halophiles – Taxonomy, Diversity, Physiolog and Applications. Halophiles, 1-34.
- **Karan, R., DeLeon, T., Biradar H., Subudhi, P. K. (2012)** Salt Stress Induced Variation in DNA Methylation Pattern and Its Influence on Gene Expression in Contrasting Rice Genotypes. Plos one, 7, 6.
- **Karbalaei-Heidari, H. R., Amoozegar, H. A., Hajighasemi, M., Ziaee, A. A., Ventosa A. (2009)** Production, optimization and purification of a novel extracellular protease from the moderately halophilic bacterium *Halobacillus karajensis*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 36, 21-27.
- **Karray, F., Ben Abdallah, M., Kallel, N., Hamza, M., Fakhfakh, M., Sayadi, S. (2018)** Extracellular hydrolytic enzymes produced by halophilic bacteria and archaea isolated from hypersaline lake. Molecular Biology.
- **Kavitha, A., Prabhakar, P., Vijayalakshmi, M., Venkateswarlu, Y. (2009)** Production of bioactive metabolites by *Nocardia levis* MK-VL_113. Letters in Applied Microbiology.
- **Kebaili, Z., Hameurlaine, S., Fellah, O., Djermane, M. Gherraf, N. Zellagui, A., Abidi A., Derouiche, K. (2019)** Assessment of Alkaloid Content and Antibacterial Activity of *Hyoscyamus Albus* and *Hyoscyamus Muticus* Collected in Two Different Climatic Regions in Algeria. J Biochem Tech, 10 (1), 1-6.
- **Khalil, S.R., Elhakim, Y.A., El-Murr, A. (2016)** Sublethal concentrations of di-n-butyl phthalate promote biochemical changes and DNA damage in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Jpn J Vet Res, 64, 67-80.
- **Khallef, S., Lestini, R., Hannu, M., Houali, K. (2018)** Isolation and identification of two extremely haloplic archaea from sebkhas in the Algerian Sahara. Cellular and Molecular Biology, 64, 4, 83-91.
- **Khan, I. F., Bisetty, K., Singh, S., Permaul, K., Hassan, I. Md. (2015)** Chitinase from *Thermomyces lanuginosus* SSBP and its biotechnological applications. Extremophiles, 19, 1055-1066.
- **Khatiwora, E., Adsul, V. B., Kulkarni, M., Deshpande N.R., Kashalkar, R.V. (2012)** Antibacterial activity of Dibutyl Phthalate: A secondary metabolite isolated from *Ipomoea carnea* stem. Journal of Pharmacy Research, 5(1), 150-152.
- **Koga, Y. (2012)** Thermal Adaptation of the Archaeal and Bacterial Lipid Membranes. Archaea, 6, 652-689.
- **Koike, S., Mackie, R. Aminov, R.** Agricultural use of antibiotic resistance.
- **Konings, W.N., Albers, S.V., Koning, S., Driessen, A.J. (2002)** The cell membrane plays a crucial role in survival of bacteria and archaea in extreme environments. Antonie van Leeuwenhoek 81, 61-72.
- **Krishnaveni, M., Jayachandran, S. (2009)** Inhibition of MAP kinases, down regulation of TNF-alpha, IL-beta and COX-2 genes by the crude extracts from marine bacteria, Biomed. Pharmacother, 63, 469-476.
- **Kristjansson, K., Hreggvidsson, GO. (1995)** Ecology and habitats of extremophiles. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 11, 17-25.
- **Kumar R., Varandani, D., Mehta B. R. , Singh,V.N., Wen, Z., Feng, X., Müllen, K. (2011)** Fast response and recovery of hydrogen sensing in Pd-Pt nanoparticle : graphene composite layers. Nanotechnology, 22, 71-79.

- **Kumar, S., Karan, R., Kapoor, S., Singh, S. P., Khare, S. K. (2012)** Screening and isolation of halophilic bacteria producing industrially important enzymes. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4), 1595-1603.
- **Kumar, V., Satyanarayana, T. (2013)** Thermoalkaliphilic Microbes. In J. Seckbach *et al.* (eds.), *Polyextremophiles: Life Under Multiple Forms of Stress, Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*. *Polyextremophiles*, 27, 271-296.
- **Kumar, A., Alama, A., Tripathi, D., Rani, M., Khatoona, H., Pandey, S., Ehteshamd, N. Z., Hasnaina, S. E. (2018)** Protein adaptations in extremophiles: An insight into extremophilic. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 11.connection of mycobacterial proteome.
- **Kurohane K, Sekiguchi K, Ogawa E, Tsutsumi M, Imai Y. (2017)** Dibutyl phthalate rather than monobutyl phthalate facilitates contact hypersensitivity to fluorescein isothiocyanate in a mouse model. *Biol. Pharm. Bull*, 40(11), 2010-2013.
- **Kurz, M. (2008)** Compatible solute influence on nucleic acids: many questions but few answers. *Saline Syst*, 4, 1-14.
- **Kushner, D. J. (1978)** Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria, 317–368. In D. J. Kushner (ed.), *Microbial life in extreme environments*. Academic Press, Ltd., London, United Kingdom.

L

- **Lacey, J. Vince, D.A. (1971)** Endospore formation and germination in a new *Thermoactinomyces* species.
- **Lacey, J., Cross, T. (1989)** Genus *Thermoactinomyces* Tsiklinsky 1899, 501AL, *Bergey's manual of systematic*.
- **Ladenstein, R., Ren, B. (2008)** Reconsideration of an early dogma, saying “there is no evidence for disulfide bonds in proteins from archaea”. *Extremophiles*, 12, 29-38.
- **Laemmli, U.K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- **Laribi, H.H., Dziril, M., Badis, A., Mouhoub, S., Mameri, N. (2012)** Purification and Characterization of a Highly Thermostable Chitinase from the Stomach of the Red Scorpionfish *Scorpaena scrofa* with Bioinsecticidal Activity toward Cowpea Weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 76 (9), 1-8.
- **Laribi, H.H., Bouanane, A., Drouiche, N., Pauss, A., Mameri, N. (2015)** Purification, characterization, and molecular cloning of an extracellular chitinase from *Bacillus licheniformis* stain LHH100 isolated from wastewater samples in Algeria. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 1117-1128.
- **Lautru S, Deeth R J, Bailey L ,Challis, G L. (2005)** Discovery of a new peptide.
- **Lawyer, F. C., Stoffel, S., Saiki, R. K., Myambo, K., Drummond, R., Gelfand, D. H. (1989)** Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 264, 6427-6437.

- **Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G., Marinelli, F. (2000)** Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek* 78, 399-405.
- **Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G., Marinelli, F. (2001)** Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 78, 399-405.
- **Lee, C. K., Daniel, R. M., Shepherd, C., Saul, D., Cary, S. C., Danson, M. J., Peterson, M. E. (2007)** Eurythermalism and the temperature dependence of enzyme activity. *The FASEB Journal* 21, 1934-1941.
- **Lentzen, G., Schwarz, T. (2006)** Extremolytes: natural compounds from extremophiles for versatile applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 72, 623-634.
- **Leigh, J.A., Wolfe, R.S. (1983)** *Acetogenium kivui*, a new thermophilic hydrogen-oxidizing, acetogenic bacterium. *Arch Microbiol* 129, 275-280.
- **Li, R., Shi, F., Fukuda, K. (2010)** Interactive effects of salt and alkali stresses on seed germination, germination recovery, and seedling growth of a halophyte *Spartina alterniflora* (Poaceae). *South African Journal of Botany*, 76, 380-387.
- **Li, J., Zhang, G., Yang, J., Tian, X., Wang, F., Zhang, C. S., Zhang, S., Li, W. (2012)** *Marininema mesophilum* gen. nov., sp. nov., a thermoactinomycete isolated from deep sea sediment, and emended description of the family *Thermoactinomycetaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62, 1383-1388.
- **Li, X.J., Jiang, L., Chen, L., Chen, H.S., Li, X. (2013)** Neurotoxicity of dibutyl phthalate in brain development following perinatal exposure: A study in rats. *Environ Toxicol Phar*, 36(2), 392-402.
- **Lim, J., Jeon, C. O., Song, S. M., Kim, C. (2005)** *Pontibacillus chungwhensis* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic Gram-positive bacterium from a solar saltern in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 165-170.
- **Lippert, K., Galinski, E. A. (1992)** Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Appl Microbiol Biotechnol*, 37, 61-65.
- **Litchfield, C. D. (1998)** Survival strategies for microorganisms in hypersaline environments and their relevance to life on early Mars. *Meteoritics & planetary science* 33, 813-819.
- **Litchfield, C. D. (2002)** Halophiles. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 28, 21-22.
- **Loni, P., Patil, J., Phugare, S., Bajekal, S. (2014)** Purification and characterization of alkaline chitinase from *Paenibacillus pasadenensis* NCIM 5434. *Basic Microbiol*, 53, 1-10.
- **Sylvie, L., Robert J D., Lianne M B., Gregory L C. (2005)** Discovery of a new peptide natural product by *Streptomyces coelicolor* genome mining. *Nature Chemical Biology*, 1, 265-269.
- **Louis P., Galinski, E. A. (1997)** Characterization of genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine from *Marinococcus halophilus* and osmoregulated expression in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 143, 1141-1149.
- **Lourdes Moreno, M. D., Pérez, D., García, M. T., Mellado, E. (2013)** Halophilic Bacteria as a Source of Novel Hydrolytic Enzymes. *Life*, 3(1), 38-51.

M

- **Mac Elroy. (2011)** Isolation and Characterization of Warm Springs' Extremophiles.
- **Madigan, M.T., Oren, A. (1999)** Thermophilic and halophilic extremophiles. *Curr Opin Microbiol*, 2, 265-269.
- **Madern, D., Ebel, C., Zaccai, G. (2000)** Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles*, 4(2), 91-98.
- **Madigan, M., Martinko, J. (2007)** Brock Biologie des micro-organismes. 11 édition, Pearson Education. France.
- **Malin G., Lapidot A. (1996)** Induction of Synthesis of Tetrahydropyrimidine Derivatives in *Streptomyces* Strains and Their Effect on *Escherichia coli* in Response to Osmotic and Heat Stress. *Journal of bacteriology*, 178, 2, 385-395.
- **Margesin, R., Schinner, F. (2001)** Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, 5(2), 73-83.
- **Marhuenda-Egea, F. C., Bonete, M. J. (2002)** Extreme halophilic enzymes in organic solvents. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 385-389.
- **Matallah-Boutiba, A., Amiard, J.C., Boutiba, Z (2008)** Inventaire des especes fongiques des eaux marines du littoral occidental algerien. *Larhyss Journal*, 07,93-102.
- **Mathivanan, N., Kabilan, V., Murugesan, k. (1998)** Purification, characterization, and antifungal activity of chitinase from *Fusarium chlamydosporum*, a mycoparasiteto groundnut rust, *Puccinia arachidis*. *Canadienne de microbiologie*, 44(7), 646-651.
- **Matsuo Y., Katsuta, A., Matsuda, S., Shizuri, Y., Yokota, A., Kasai, H. (2006)** *Mechercharimyces mesophilus* gen. nov., sp. nov. and *Mechercharimyces asporophorigenens* sp. nov., antitumour substance-producing marine bacteria, and description of *Thermoactinomycetaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56.
- **Meklat, A., Bouras, N., Zitouni, A., Mathieu, F., Lebrihi, A., Schumann, P. Sproer, C., Klenk, H., Sabaou, N. (2013)** *Actinopolyspora mzabensis* sp. nov., a halophilic actinomycete isolated from an Algerian Saharan soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63, 3787-3792.
- **Meknaci, R., Lopes,P., Servy, C., Andrieu, J., Hacène, H., Ouazzani, J. (2014)** Agar-supported cultivation of *Halorubrum* sp. SSR, and production of halocin C8 on the scale-up prototype Platotex. *Extremophiles*, 18, 6, 1049-105.
- **Mesbah, N.M., Wiegel, J. (2005)** Halophilic thermophiles: a novel group of extremophiles.
- **Mesbah, N.M., Abou-El-Ela, S.H., Wiegel, J. (2007)** Novel and unexpected prokaryotic diversity in water and sediments of the alkaline, hypersaline lakes of the Wadi An.
- **Mesbah, N. M., Hedrick, D. B., Peacock, A.D. Rohde, M., Wiegel, J. (2007)** *Natranaerobius thermophilus* gen. nov., sp. nov., a halophilic, alkalithermophilic bacterium from soda lakes of the Wadi An Natrun, Egypt, and proposal of *Natranaerobiaceae* fam. nov. and *Natranaerobiales* ord. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 2507-2512.

- **Mesbah, N.M., Wiegel, J. (2008)** Life at extreme limits: the anaerobic halophilic alkalithermophiles. In: Wiegel J, Adams MWW, Maier R (eds) The incredible anaerobes: from physiology to genomics to fuels. Ann New York Acad Sci 1125, 44-57.
- **Mesbah, N. M., Wiegel J. (2011)** Halophiles Exposed Concomitantly to Multiple Stressors: Adaptive Mechanisms of Halophilic Alkalithermophiles. Halophiles and Hypersaline Environments, 249-273.
- **Mesbah, N.M., Wiegel, J. (2012)** Life under Multiple Extreme Conditions: Diversity and Physiology of the Halophilic Alkalithermophiles.
- **Miranda-Tello, E., Fardeau, M., Joulain, C., Magot, M., Thomas, P., Tholozan, J., Ollivier, B. (2007)** *Petrotoga halophila* sp. nov., a thermophilic, moderately halophilic, fermentative bacterium isolated from an offshore oil well in Congo. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57, 40-44.
- **Mokashe, N., Chaudhari, B., Patil, U. (2018)** Operative utility of salt-stable proteases of halophilic and halotolerant bacteria in the biotechnology sector. International Journal of Biological Macromolecules, 117, 493-522.
- **Mohamed, S., Bouacem, K., Mechri, S., Addou, A.N., Laribi, H.H., Fardeau, M., Jaouadi, B., Bouanane-Darefed, A., Hacène, H. (2019)** Purification and biochemical characterization of a novel acido-halotolerant and thermostable endochitinase from *Melghiribacillus thermohalophilus* strain Nari2A. Carbohydrate Research, 473, 46-56.
- **Montalvo-Rodriguez, R., Lopez-Garriga, J., Vreeland, R. H., Oren, A., Ventosa, A., Kamekura, M. (2000)** *Haloterrigena thermotolerans* sp. nov., a halophilic archaeon from Puerto Rico. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 50, 1065-1071.
- **Morozkinaa, E. V., Sluts kayaa, E. S., Fedorovaa, T. V., Tugayb T. I., Golubevaa L. I., Korolevaa O. V. (2010)** Extremophilic Microorganisms: Biochemical Adaptation and Biotechnological Application. Applied Biochemistry and Microbiology, 46, 1, 1-14.
- **Moushumi A. P., Jayachandran S. (2012)** Induction of apoptosis and cell cycle arrest by Bis (2-ethylhexyl) phthalate produced by marine *Bacillus pumilus* MB 40. Chemico-Biological Interactions, 195, 133-143.
- **Mueller, D., Vincent, W., Bonilla, S., Laurion, I. (2005)** Extremotrophs, extremophiles and broadband pigmentation strategies in a high arctic ice shelf ecosystem. FEMS Microbiology Ecology, 53, 73-87.
- **Muga, A., Moro, F. (2008)** Thermal adaptation of heat shock proteins. Curr. Protein Pept. Sci., 9, 552-566.

N

- **Nagrале, D. T., Gawande, S. P. (2018)** Archaea: Ecology, Application, and Conservation. Microbial Resource Conservation, 431-451.

- **Nascimento, W. C.; Martins, M. L. (2006)** Studies on the stability of protease from *Bacillus sp.* And its compatibility with commercial detergent. *Brazilian Journal of Microbiology* 37:307-311.
- **Nawani, N., Kapadnis B.P., Das, A.D., Rao, A.S., Mahajan, S.K. (2002)** Purification and characterization of a thermophilic and acidophilic chitinase from *Microbispora sp.* V2. *Journal of Applied Microbiology*, 93, 965-975.
- **Netzker, T., Flak, M., Krespach, K.C., Stroe, M., Weber, J., Schroeckh, V., Brakhage, A. (2018)** Microbial interactions trigger the production of antibiotics. *Current Opinion in Microbiology*, 45:117-123.
- **Newton, I. (2010)** What are Extremophiles? *Extremophiles Handbook*, 1, 3-15.
- **Niehaus, F., Bertoldo, C., Kähler, M., Antranikian, G. (1999)** Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 711-729.
- **Nonomura, H., Ohara, Y. (1971)** Distribution of actinomycetes in soil. X. New genus and species of monosporic actinomycetes in soil. *J Ferment Technol* 49, 895-903.

O

- **Oiwa R. (1992)** Antibacterial agents, dans: Omura S. The search for bioactive compounds from microorganisms. Spring-Verlag, New York: 1-29.
- **Ollivier, B., Caumette, P., Garcia, J. L., Mah, R. A. (1994)** Anaerobic bacteria from hypersaline environments. *Microbiol rev* 58, 27-38.
- **Oren, A., (1999)** Bioenergetic Aspects of Halophilism. *Microbiology and molecular biology reviews*, 63, 2, 334-344,.
- **Oren, A., Ventosa, A., Gutierrez, M. C. Kamekura, M. (1999)** *Haloarcula quadrata* sp. nov., a square, motile archaeon isolated from a brine pool in Sinai (Egypt). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 1149-1155.
- **Oren, A., (2001)** The bioenergetic basis for the decrease in metabolic diversity at increasing salt concentrations: implications for the functioning of salt lake ecosystems. *Hydrobiologia*, 466: 61-72.
- **Oren, A. (2002)** a. Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications. *J Ind Microbiol Biotechnol* 28, 56-63.
- **Oren, A. (2002)** b. Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria. *FEMS. Microbiol Ecol* 39, 1-7.
- **Oren, A. (2004)** Prokaryote diversity and taxonomy: current status and future challenges. *The Royal Society*, 359, 623-638.
- **Oren, A. (2006)** Life at High Salt Concentrations in Prokaryotes. The ordre halobacterales The Prokaryotes. *A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology and Biochemistry.* (ed) Springer-Verlag, New York, 263-282.
- **Oren, A. (2008)** Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Sal Syst*, 4, 2.
- **Oren, A. (2010)** Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environmental Technology*, 31, 825-834,.

- **Oren, A. (2013)** Life at High Salt Concentrations. The Prokaryotes-Prokaryotic Communities and Ecophysiology, 3, 642, 0-57.
- **Orita, I., Futatsuishi, R., Adachi, K., Ohira, T., Kaneko, A., Minowa, K., Suzuki, M., Tamura, T., Nakamura, S., Imanaka, T., Suzuki, T., Fukui, T., (2019)** Random mutagenesis of a hyperthermophilic archaeon identified tRNA modifications associated with cellular hyperthermotolerance. Nucleic Acids Research.
- **Ortega, A., Amorós, D., García de la Torre, J. (2011)** Prediction of Hydrodynamic and Other Solution Properties of Rigid Proteins from Atomic- and Residue-Level Models. Biophysical Journal, 101, 892-898.

P

- **Park, H.J., Dastager, S. G., Lee, J., Yeo, S., Yoon, J., Kim, C. (2007)** *Shimazuella kribbensis* gen. nov., sp. nov., a mesophilic representative of the family *Thermoactinomycetaceae*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57.
- **Park, H.J., Kim, D., Kim, I., Lee, I., Kim, C., Kim, J., Kim, S., Lee, H., Yim, J. (2008)** Characteristics of cold-adaptive endochitinase from Antarctic bacterium *Sanguibacter antarcticus* KOPRI 21702. Enzyme and Microbial Technology, 45, 391-396.
- **Patil, R. S., Ghormade, V., Deshpande, M. V. (2000)** Chitinolytic enzymes: an exploration. Enzyme and Microbial Technology, 26, 473-483.
- **Pikuta, E. V., Hoover, R. B., & Tang, J. (2007)** Microbial extremophiles at the limits of life. Critic rev microbiol 33, 183-209.
- **Pinchuk, I.V., Bressollier, P., Verneuil, B., Fenet, B., Sorokulova, I.B., Mégraud, F., Maria C. Urdaci, M.C. (2001)** In Vitro Anti-*Helicobacter pylori* Activity of the Probiotic Strain *Bacillus subtilis* 3 Is Due to Secretion of Antibiotics. American Society for Microbiology.
- **Pokrovsky, V. S., Chepikova, O. E., Davydov, D. Zh., Zamyatnin, Jr., Andrey A., Lukashov, A. N., Lukashova, E. V. (2019)** Amino Acid Degrading Enzymes and their Application in Cancer Therapy. Current Medicinal Chemistry, 26, 3.
- **Por, F. D. (1980)** A Classification of Hypersaline Waters, Based on Trophic Criteria. Marine ecology, 1, 121-131.
- **Pouget M. (1980)** Les relations sol-végétation dans les steppes Sud-algéroises. Thèse Docorat, 285-295.
- **Price, L. B., Shand, R. F. (2000)** Halocin S8: a 36-Amino-Acid Microhalocin from the Haloarchaeal Strain S8a. American Society for Microbiology, 182, 17, 4951-4958.
- **Priest F. G. (1993)** Systematics and Ecology of *Bacillus*. American society for microbiology.
- **Promchai, R., Boonchalearn, A., Visessanguan, W., Luxananil, P. (2018)** Rapid production of extracellular thermostable alkaline halophilic protease originating from an extreme haloarchaeon, *Halobacterium salinarum* by recombinant *Bacillus subtilis*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 15, 192-198.

- **Prowe, S. G., Antranikian, G. (2001)** *Anaerobranca gottschalkii* sp. nov., a novel thermoalkaliphilic bacterium that grows anaerobically at high pH and temperature. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 457-465.

Q

- **Quadri, I., Hassani, I.I., l'Haridon, S., Chalopin, M., Hacène, H. and Jebbar, M. (2016)** Characterization and antimicrobial potential of extremely halophilic archaea isolated from hypersaline environments of the Algerian Sahara. *Microbiological Research*, 186:119-131.
- **Quérellou, J., Guézennec, J. (2010)** *Biotechnologie des extrêmophiles. Techniques de l'Ingenieur*, 1-13.

R

- **Rajan B. M., Kannabiran K. (2010)** Antimicrobial activity of *Streptomyces albofaciens* vitbrk1 spp. isolated from the bay of Bengal coast of Tamil Nadu, India. *Pharmacologyonline*. 1: 124-132.
- **Ramos-Cormenzana, A. (1989)** Ecological distribution and biotechnological potential of halophilic microorganisms, In M. S. Da Costa, J. C. Duarte, and R. A. D. Williams (ed.), *Microbiology of extreme environments and its potential for biotechnology*. Elsevier Applied Science, London, United Kingdom, 289-309.
- **Rampelotto, P. H. (2010)** Resistance of Microorganisms to Extreme Environmental Conditions and Its Contribution to Astrobiology. *Sustainability*, 2, 1602-1623.
- **Rampelotto, P. H. (2013)** Extremophiles and Extreme Environments. *Life*, 3, 482-485.
- **Rainey, F.A., Donnison, A.M., Janssen, P.H., Saul, D., Rodrigo, A., Bergquist, P.L., Daniel, R.M., Stackebrandt, E., Morgan H.W. (1994)** Description of *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* gen. nov., sp. nov: An obligately anaerobic, extremely thermophilic, cellulolytic bacterium. *FEMS Microbiology Letters* 120 263-266.
- **Ratnakar, D. (2013)** Use of halophile physiology and adaptations in various industrial applications. *Research Journal of Biotechnology*, 8(2).
- **Ren, P., Zhou, P. (2005)** *Salinibacillus aidingensis* gen. nov., sp. nov. and *Salinibacillus kushneri* sp. nov., moderately halophilic bacteria isolated from a neutral saline lake in Xin-Jiang, China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55.
- **Robb, F., Maeder, D. (1998)** Novel evolutionary histories and adaptive features of proteins from hyperthermophiles. *Curr Opin Biotechnol* 9, 288-291.
- **Roberts, M.F. (2005)** Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems*, 1:5.

- **Rodriguez-Valera, F., Juez, G., Kushner, D. J. (1982)** Halocins: salt-dependent bacteriocins produced by extremely halophilic rods. *Revue canadienne de microbiologie*, 28(1), 151-154.
- **Rodríguez-Valera, F. (1988)** Characteristics and microbial ecology of hypersaline environments. In: Rodríguez-Valera F (ed) *Halophilic Bacteria*, 1, 3-3.
- **Rohwerder, T. Sand, W. (2007)** Oxidation of Inorganic Sulfur Compounds in Acidophilic Prokaryotes. *Eng. Life Sci*, 7, 4, 301-309.
- **Rohwerder, T., Sand, W. (2007)** Mechanisms and biochemical fundamentals of bacterial metal sulfide oxidation.
- **Roy, R.N., Laskarb, S., Sena, S.K., (2006)** Dibutyl phthalate, the bioactive compound produced by *Streptomyces albidoflavus* 321.2. *Microbiological Research*, 161, 121-126.
- **Russel, R.J.M., Ferguson, J.M.C. Hough, D.W. Danson, M.J., Taylor, G.L. (1997)** The crystal structure of citrate synthase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* at 1.9 Å resolution. *Biochem* 36, 9983-9994.
- **Russell, N. J. (1993)** Lipids of halophilic and halotolerant microorganisms, p. 163–210. In R. H. Vreeland and L. I. Hochstein (ed.), *The biology of halophilic bacteria*. CRC Press, Boca Raton, Fla.

S

- **Sabaou, N., Boudjella, H., Bennadji, A., Germain, P. (1998)** Les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes, rares producteurs d'antibiotiques. *Science et changements planétaires / Sécheresse*, 9, 2, 147-53.
- **Sadfi-Zouaoui, N., Hannachi, I., Andurand, D., Essghaier, B., Boudabous, A., Nicot P. (2008)** Biological control of *Botrytis cinerea* on stem wounds with moderately halophilic bacteria, 24, 2871-2877.
- **Saisivam S., Bhikshapathi D.V., Krishnaveni J., Kishan V. (2008)** Isolation of borrelidin from *Streptomyces californicus*-An Indian soil isolate. *Indian J Biotechnol.* 7: 349-355.
- **Sakai, K., Yokota, A., Kurokawa, H., Wakayama, M., Moriguchi, M.** Purification and Characterization of Three Thermostable Endochitinases of a Noble *Bacillus* Strain, MH-1, Isolated from Chitin-Containing Compost. *Applied and environmental microbiology*, 64, 9, 3397-3402.
- **Sakai, J., Rawson, R. B., Espenshade, P. J., Cheng, D., Seegmille, A. C., Goldstein, J. L., Brown, M. S. (1998)** Molecular Identification of the Sterol-Regulated Luminal Protease that Cleaves SREBPs and Controls Lipid Composition of Animal Cells. 2, 505-514.
- **Sanchez-Porro, C., Martin, S., Mellado, E., Ventosa, A. (2003)** Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *Journal of Applied Microbiology*, 94(2), 295-300.
- **Santos, H., Lamosa, P., Borges, N., Gonçalves, L.G., Pais, T., Rodrigues, M.V. (2011)** Organic compatible solutes of prokaryotes that thrive in hot environments: the importance of ionic compounds for thermostabilization. In : *Extremophiles Handbook*, Springer, 497-520.

- **Satyanarayana, T., Raghukumar, C., Shivaji, S., (2005)** Extremophilic microbes: Diversity and perspectives, *Current science*, 89, 1-10.
- **Satyanarayana, T., Littlechild, J., Kawarabayasi, Y. (2013)** *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology*. Springer, Netherlands, Dordrecht.
- **Scandurra, R., Consalvi, V., Chiaraluce, R., Politi, L. (2000)** Protein stability in extremophilic archaea. *Front. Biosci.*
- **Schallmeyer, M., Singh, A., Ward, O.P. (2004)** Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*, 50(1), 1-17.
- **Schiraldi, C., De Rosa, M. (2002)** The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles. *TRENDS in Biotechnology*, 20, 12.
- **Schlesner, H., Lawson, P. A., Collins, M. D., Weiss, N., Wehmeyer, U., Völker, H., Thomm, M. (2001)** *Filobacillus milensis* gen. nov., sp. nov., a new halophilic spore-forming bacterium with Orn-D-Glu-type peptidoglycan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51.
- **Schneider, D., Liu, Y., Gerstein, M., Engelman, D.M. (2002)** Thermostability of membrane protein helix–helix interaction elucidated by statistical analysis. *FEBS Letters*, 532(1), 231 -236.
- **Schrempf, H. (2001)** Recognition and degradation of chitin by streptomycetes. *Antonie van Leeuwenhoek*, 79, 285-289.
- **Schumann, J., Bohm, G., Schumacher, G. Rudolph, R., Jaenicke, R. (1993)** Stabilization of creatinase from *Pseudomonas putida* by random mutagenesis. *Protein Science*, 2, 1612-1620.
- **Schwartz, L.M., Osborne, B.A. (1993)** Programmed cell death, apoptosis and killer genes, *Immunol. Today*, 14, 582-590.
- **Seckbach, J., Oren, A. (2007)** Oxygenic photosynthetic microorganisms in extreme environments: Possibilities and Limitations. *Cellular Origins, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*.
- **Seckbach J., Chela-flores, J. (2012)** Habitable environments by extremophiles on earth, the solar system, and elsewhere. *Precursors of Life, Chemical Models and Early Biological Evolution, Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology* 22, 859-870.
- **Selama, O., Amos, G., Djenane, Z., Borsetto, C., Laidi, R.F., Porter, D., Nateche, F., Wellington, E. H., Hacène, H. (2014)** Screening for Genes Coding for Putative Antitumor Compounds, Antimicrobial and Enzymatic Activities from Haloalkalitolerant and Haloalkaliphilic Bacteria Strains of Algerian Sahara Soils. *BioMed Research International*, 11.
- **Sen N, Liu X, Craig ZR. (2015)** Short term exposure to di-n-butyl phthalate (DBP) disrupts ovarian function in young CD-1 mice. *Reprod Toxicol*, 53,15-22.
- **Serdakowski, A. L., Dordick, J. S. (2008)** Enzyme activation for organic solvents made easy. *Trends in Biotechnology*, 26(1), 48-54.
- **Serour, E., Antranikian, G. (2002)** Novel thermoactive glucoamylases from the thermoacidophilic Archaea *Thermoplasma acidophilum*, *Picrophilus torridus* and *Picrophilus oshimae*. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 73-83.

- **Serrab, N. A., Thabet, k., Bensalma, O. (2018)** Etude de l'activité biologique de quelques métabolites secondaires des souches actinomycétales isolées du sol. Université Oum El Bouaghi.
- **Setati M. E. (2010)** Diversity and industrial potential of hydrolaseproducing halophilic/halotolerant eubacteria. *African Journal of Biotechnology*, 9 (11), 1555-1560.
- **Setyorini, E., Takenaka, S., Murakami, S., Aoki, K.** Purification and Characterization of Two Novel Halotolerant Extracellular Proteases from *Bacillus subtilis* Strain FP-133. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70:2, 433-440.
- **Shafiei, M., Ziaee, A.-A., Amoozegar, M. A. (2011)** Purification and characterization of an organic-solvent-tolerant halophilic α -amylase from the moderately halophilic *Nesterenkonia* sp. strain F. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(2), 275-281.
- **Shafiei, M., Ziaee, A., Amoozegar, M. A. (2012)** Purification and characterization of a halophilic α -amylase with increased activity in the presence of organic solvents from the moderately halophilic *Nesterenkonia* sp. strain F. *Extremophiles*, 16, 627-635.
- **Shah, S., Solanki, K., Gupta, M. N. (2007)** Enhancement of lipase activity in non-aqueous media upon immobilization on multi-walled carbon nanotubes. *Chemistry Central Journal*, 1(1), 30.
- **Shivanand, P., Jayaraman, G. (2009)** Production of extracellular protease from halotolerant bacterium, *Bacillus aquimaris* strain VITP4 isolated from Kumta coast. *Process Biochemistry*, 44, 1088-1094.
- **Shoemark, D.K., Sessions, R. B., Brancaccio, A., Bigotti, M. G. (2019)** Intraring allostery controls the function and assembly of a hetero-oligomeric class II chaperonin. *The FASEB Journal*, 2223-2241.
- **Siglioccolo, A., Paiardini, A., Piscitelli, M., Pascarella, S. (2011)** Structural adaptation of extreme halophilic proteins through decrease of conserved hydrophobic contact surface. *Structural Biology*, 11:50.
- **Singh, J., Mishra, N. S., Uma, Banerjee, S., Sharma, Y. C. (2011)** Comparative studies of physical characteristics of raw and modified sawdust for their use as adsorbents for removal of acid dye. *BioRessources*, 6.
- **Sioud, M., Baldacci, G. Forterre, P. and de Recondo, A. M. (1987).** Antitumor drugs inhibit the growth of halophilic archaeobacteria. *Eur J Biochem.* 169, 231-236.
- **Smaoui, S., Mathieu, F., Elleuch, L., Coppel, Y., Merlina, G., Karray-Rebai, I., Mellouli, L. (2012)** Taxonomy, purification and chemical characterization of four bioactive compounds from new *Streptomyces* sp. TN256 strain. *World J Microbiol Biotechnol*, 28, 793-804.
- **Smirnov A, Esnault C., Nowacka-Mazurek A., Martel C., Darbon-Rongere E., Chouayekh H., Ghorbel S., Shikura N., Seghezzi N., Virolle MJ. (2008)** Toward a better understanding of why and how antibiotic biosynthesis is being triggered in *Streptomyces*? In: *Proceedings of the 1st industrial biotechnology international conference*, Naples, Italie.
- **Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., Holt, J. G. (1968)** *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2.

- **Solecka, J., Zajko, J., Postek, M., Rajnisz, A. (2012)** Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes. *Central European Journal of Biology* 7(3), 373-390.
- **Spring, S., Ludwig, W., Marquez, M. C., Ventosa, A., Schleifer, K. (1996)** *Halobacillus* gen. nov., with Descriptions of *Halobacillus litoralis* sp. nov. and *Halobacillus trueperi* sp. nov., and Transfer of *Sporosarcina halophila* to *Halobacillus halophilus* comb. nov. *International journal of systematic bacteriology*, 46, 492-496.
- **Stackebrandt, E., Woese, C. R. (1981)** Towards a phylogeny of the actinomycetes and related organisms. *Current Microbiology*, 5(4), 197-202.
- **Staufenberger, T., Imhoff, J. F., Labes A. (2012)** First crenarchaeal chitinase found in *Sulfolobus tokodaii*. *Microbiological Research*, 167, 262-269.
- **Stefanidi, E., Vorgias, E. (2008)** Molecular analysis of the gene encoding a new chitinase from the marine psychrophilic bacterium *Moritella marina* and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Extremophiles*, 12, 541-552.
- **Stein, T. (2005)** *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56, Pages 845-857.
- **Sterner, R. H., Liebl, W. (2001)** Thermophilic adaptation of proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 36, 39-106.
- **Stetter, K.O. (1996)** Hyperthermophilic prokaryotes. *FEMS Microbial Rev.* 18, 149-158.
- **Stetter, K. O., Fiala, G., Huber, G., Huber, R., Seegerer, A. (1990)** Hyperthermophilic Microorganisms. *Fems Microbiol Reviews* 75, 117-124.
- **Stetter, K. O. (1999)** Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS letters* 452, 22-25.
- **Stetter, K.O. (1996)** Hyperthermophiles in the history of life. *Ciba Found Symp* 202, 1-18
- **Stetter, K.O. (1998)** Hyperthermophiles: isolation, classification, and properties. In *Extremophiles - Microbial Life in Extreme Environments*. Edited by Horikoshi K, Grant WD. New York: Wiley: 1-24.
- **Stetter, K. O. (2006)** Hyperthermophiles in the history of life. *Phil. Trans. R. Soc. B* 361, 1837-1843.
- **Subbanna, A.R.N.S., Chandrashekhara, C., Stanley, J., Mishra, K.K., Mishra, P.K., Pattanayak, A., (2019)** Bio-efficacy of chitinolytic *Bacillus thuringiensis* isolates native to northwestern Indian Himalayas and their synergistic toxicity with selected insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 158, 166-174.
- **Sulaiman, N. A., Mahadi, N. M., Ramly, N.Z. (2019)** Biochemical Properties and Potential Application of Proteases from Alkalophilic *Bacillus lehensis* G1. *Tropical Life Sciences Research*, 30(2), 25-37.
- **Sultanpuram, V.R., Mothe, T. (2018)** *Thalassorhabdus alkalitolerans* gen. nov., sp. nov., a novel *Bacillaceae* member isolated from marine sediment. , *Int J Syst Evol Microbiol*, 68: 2969-2976.
- **Synowiecki, J. (2010)** Some applications of thermophiles and their enzymes for protein processing. *African Journal of Biotechnology*, 9(42), 7020-7025.

- **Syed, J., Özbilgin, M. (2009)** A relational framework for international transfer of diversity management practices. *The International Journal of Human Resource Management*, 20, 12.
- **Szilágyi, A., Závodszky, P. (2000)** Structural differences between mesophilic, moderately thermophilic and extremely thermophilic protein subunits: results of a comprehensive survey. *Structure*, 8, 5.

T

- **Takai, K., Nakamura, K., Toki, T., Tsunogai, U., Miyazaki, M., Miyazaki, J., Hirayama, H., Nakagawa, S., Nunoura, T., Horikoshi, K. (2008)** Cell proliferation at 122 °C and isotopically heavy CH₄ production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 10949–10954.
- **Tanaka, Y., Tsumoto, K., Yasutake, Y., Umetsu, M., Yao, M., Fukada, H., Tanaka, I., Kumagai, I. (2004)** How oligomerization contributes to the thermostability of an archaeon protein. Protein l-isoaspartyl-O-methyltransferase from *Sulfolobus tokodaii*. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 32957-32967.
- **Tawiah, A.A., Gbedema, S. Y., Adu, F., Boamah, V.E., Annan, K. (2012)** Antibiotic producing microorganisms from River Wiwi, Lake Bosomtwe and the Gulf of Guinea at Doakor Sea Beach, Ghana. *BMC Microbiology*, 12, 234.
- **Taylor, T. J., Vaisman, I. I. (2010)** Discrimination of thermophilic and mesophilic proteins. *BMC struct biol*, 10.
- **Tenreir, S., Nobre, M. F., Rainey, F.A., Miguel, C., Costa, M. (1997)** *Thermonema rossianum* sp. nov., a New Thermophilic and Slightly Halophilic Species from Saline Hot Springs - in Naples, Italy. *International journal of systematic bacteriology*, 47, 122-126.
- **Thakur, D., Yadav, A., Gogoi, B.K., Bora, T.C. (2007)** Isolation and screening of *Streptomyces* in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites Isolement et criblage de *streptomyces* du sol des forets protegees des etats d'Assam et de Tripura pour des metabolites antimicrobiens. *Journal de Mycologie Médicale*, 17, 242-249.
- **Thompson, M. J., Eisenberg, D. (1999)** Transproteomic Evidence of a Loop-Deletion Mechanism for Enhancing Protein Thermostability. *J. Mol. Biol*, 290, 595-604.
- **Thongthai, C., McGenity, T. J., Suntainalert, P., Grant, W. D. (1992)** Isolation and characterization of an extremely halophilic archaeobacterium from traditionally fermented Thai fish sauce (nam pla). *Letters in Applied Microbiology*, 14(3), 111-114.
- **Tian, C., Chang, F., Xu, N., Xie, Y., Ma, Y., Yang, Z., Dang, C., Huang, Y., Zhexian T., Wang, Y. (2016)** Bio-Source of di-n-butyl phthalate production by filamentous fungi. *Scientific RepoRts*, 6, 19-791.
- **Tiberti, M., Papaleo, E. (2011)** Dynamic properties of extremophilic subtilisin-like serine-proteases *Journal of Structural Biology*, 174, 69-83.
- **Tigerström, A. (2005)** The Biologist's Forum: Thermostability of proteins. *Bios* 76, 22-27.

- **Tiquia, S.M., Davis, D., Hadid, H., Kasparian, S., Ismail, M., Ahly, S., Shim, J., Singh, S., Murray, K.S. (2007)** Halophilic and Halotolerant Bacteria from River Waters and Shallow Groundwater Along the Rouge River of Southeastern Michigan. *Environmental Technology*, 28, 297-307.
- **Tomlinson, G., Hochstein, L.I. (1976)** *Halobacterium saccharovorurn* sp. nov., a carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacterium. *Can. J. Microbio*, 22.
- **Tompa, P. (2005)** The interplay between structure and function in intrinsically unstructured proteins *FEBS Letters*, 579, 3346-3354.
- **Tortorano A.M., Cabrini E. et Viviani M.A. (1979)** Sensibilité in vitro des levures à cinq antibiotiques. Comparaison de deux méthodes CMI en gélose et méthode des disques. *Bull Soc Fr Myc Med*, 8, 69-74.
- **Tokunaga, H., Arakawa, T., Tokunaga, M. (2008)** Engineering of halophilic enzymes: Two acidic amino acid residues at the carboxy-terminal region confer halophilic characteristics to *Halomonas* and *Pseudomonas* nucleoside diphosphate kinases. *Protein Science*, 17, 1603-1610.
- **Touzel, J.P., O'Donohue, M., Debeire, P., Samain, E., Breton, C. (2000)** *Thermobacillus xylanilyticus* gen. nov., sp. nov., a new aerobic thermophilic xylan-degrading bacterium isolated from farm soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50.
- **Trent, J. D. (1996)** A review of acquired thermotolerance, heat-shock proteins, and molecular chaperones in archaea. *FEMS Microbiology Reviews*, 18, 249-258.
- **Trivedi, S., Gehlot, H., Rao, S. (2006)** Protein thermostability in Archaea and Eubacteria. *Genetics and Molecular Research*, 5(4), 816-827.
- **Tseng, C. K. H., Marquez, V. E., Milne, G. W. A., Wysocki, R. J., Mitsuya, H., Shirasaki, T., Driscoll, J. S. (1991)** A ring-enlarged oxetanocin A analog as an inhibitor HIV infectivity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 34(1), 343-349.

U

- **Uehara, Y., Temma, K., Kobayashi, Y., Irie, N., Yamaguchi, T. (2018)** Reduction of Thermotolerance by Heat Shock Protein 90 Inhibitors in Murine Erythroleukemia Cells. *Biol. Pharm. Bull*, 41, 1393-1400.
- **Ulrih, N. P., Ota, A., Šentjurc, M., Kure, S., Abram, V. (2010)** Flavonoids and cell membrane fluidity. *Food Chemistry*, 121, 78-84.
- **Unsworth, L. D., Van der Oost, J., Koutsopoulos, S. (2007)** Hyperthermophilic enzymes— stability, activity and implementation strategies for high temperature applications. *Febs Journal* 274, 4044-4056.

V

- **Van den Burg, B., (2003)** Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, 6, 213-218.
- **Velázquez-Becerra, C., Macías-Rodríguez, L.I., López-Bucio, J., Altamirano-Hernández, J., Flores-Cortez, I., Eduardo Valencia-Cantero, E. (2011)** A volatile organic compound analysis from *Arthrobacter agilis* identifies dimethylhexadecylamine, an amino-containing lipid modulating bacterial growth and *Medicago sativa* morphogenesis in vitro. *Plant and Soil*, 339, 329-340.
- **Ventosa, A., García, M. T., Kamekura, M., Onishi, H., Ruiz-Berraquero, F. (1989)** *Bacillus halophilus* sp. nov., a Moderately Halophilic *Bacillus* Species. *Systematic and Applied Microbiology*, 12(2), 162-166.
- **Ventosa, A., Márquez, M. C., Garabito, M. J., & Arahál, D. R. (1998)** Moderately halophilic gram-positive bacterial diversity in hypersaline environments. *Extremophiles*, 2(3), 297-304.
- **Ventosa, A., Nieto, J. J., Oren, A. (1998)** Biology of Moderately Halophilic Aerobic Bacteria. American Society for Microbiology.
- **Ventosa, A. (2006)** Unusual microorganisms from unusual habitats: hypersaline environments. In *Symposia-Society for General Microbiology*. 66,223. Cambridge University Press; 1999.
- **Vetriani, C., Maeder, D. L., Tolliday, N., Timothy, J., Britton, K. L., Klump, H., Robb, F.T. (1998)** Protein thermostability above 100°C: A key role for ionic interactions. *Biophysics*, 95, 12300-12305.
- **Vidyasagar, M., Prakash, S., Litchfield, C., Sreeramulu, K. (2006)** Purification and characterization of a thermostable, haloalkaliphilic extracellular serine protease from the extreme halophilic archaeon *Halogeometricum borinquense* strain TSS101. *Archaea* 2, 51-57.
- **Vidyasagar, M., Prakash, S., Mahajan, V., Shouche, Y. S., Sreeramulu, K. (2009)** Purification and characterization of an extreme halothermophilic protease from a halophilic bacterium *Chromohalobacter* sp. TVSP101. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(1), 12-19.
- **Vogt, G., Argos P. (1997) a.** Protein thermal stability: hydrogen bonds or internal packing? *Fold Des*, 2, 40-46.
- **Vogt, G., Woell, S., Argos, P. (1997) b.** Protein thermal stability, hydrogen bonds and ion pairs. *J Mol Biol*, 269, 631-643.
- **von Jan, M., Riegger, N., Pötter, G., Schumann, P., Verbar, S., Spröer, C., Rohde, M., Lauer, B., Labeda, D. P., Klenk, H. (2011)** *Kroppenstedtia eburnea* gen. nov., sp. nov., a thermoactinomycete isolated by environmental screening, and emended description of the family Thermoactinomycetaceae Matsuo *et al.* 2006 emend. *Yassin et al.* 2009. Division of Microbiology.
- **Von Nessbaum, F. (2019)** Antibacterial Natural Products in Medicinal Chemistry-Exodus or Revival? *Angewandte Chemie*, 58, 46, 11.
- **Vreeland, R. H. (1987)** Mechanisms of halotolerance in microorganisms. *Crit Rev Microbiol* 14,311–356.

W

- **Wainø, M., Tindall, B. J., Schumann, P., Ingvorsen, K. (1999)** *Gracilibacillus* gen. nov., with description of *Gracilibacillus halotolerans* gen. nov., sp. nov.; transfer of *Bacillus dipsosauri* to *Gracilibacillus dipsosauri* comb. nov., and *Bacillus salexigens* to the genus *Salibacillus* gen. nov., as *Salibacillus salexigens* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49.
- **Wainø, M., & Ingvorsen, K. (1999)** Production of halostable β -mannanase and β -mannosidase by strain NN, a new extremely halotolerant bacterium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52(5), 675-680.
- **Wainwright, M. (2003)** A Microbiologist Looks at Panspermia. *Fred Hoyle's Universe of new natural products*, *Adv. Appl. Microbiol.*, 43, 57-90.
- **Wang, T.B. Ng, F. Yuan, Z.K. Liu, F. Liu, (2007)** Induction of apoptosis in human leukemia K562 cells by cyclic lipopeptide from *Bacillus subtilis* natto T-2, *Peptides*, 28 1344-1350.
- **Wang, Q., Fu, S.-J., Sun, J.-Y., Weng, X.-Y. (2010)** Characterization of a thermostable alkaline phytase from *Bacillus licheniformis* ZJ-6 in *Pichia pastoris*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(5), 1247-1253.
- **Waty, M., Tichoo, R., Bhol, D. (2001)** How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Archivs of microbiology*, 176, 5, 386-390.
- **Whipps, J. M. (2001)** Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52, 487-511.
- **Wiegel, J., Ljungdahl, L. G. (1981)** *Thermoanaerobacter ethanolicus* gen. nov., spec. nov., a new, extreme thermophilic, anaerobic bacterium. *Archives of Microbiology*, 128(4), 343-348.
- **Wiegel, J. (1992)** The obligately anaerobic thermophilic bacteria. In: Kristjansson JK (ed) *Thermophilic bacteria*. Press Boca Raton, 105-184.
- **Wiegel, J. (1998)** Anaerobic alkalithermophiles, a novel group of extremophiles. *Extremophiles* 2, 257-267.
- **Wiegel, J., Canganella, F. (2000)** Extreme thermophiles. In: *Encyclopedia of life sciences*. John Wiley & Sons, Ltd pp 1-12.
- **Wiegel, J., Kevbrin, V. V. (2004)** Alkalithermophiles. *Biochem Soc Transact* 32, 193-198.
- **Wiegel, J., Ljungdahl, L.G. (1996)** The importance of thermophilic bacteria in biotechnology. *Crit Rev Biotechnol* 3, 39-107.
- **Wisotzkey, J. D., Jurtshuk P. JR., Fox, G. E., Deinhard, G., Poralla, K. (1992)** Comparative Sequence Analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and Proposal for Creation of a New Genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 42.
- **Woese, C., Kandler, O., Wheelis, M. (1990)** Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. *Evolution*, 87, 4576-4579.

- **Wright, D. B., Banks, D., Lohman J. R., Hilsenbeck, J. L., Gloss, L. M. (2002)** The Effect of Salts on the Activity and Stability of *Escherichia coli* and *Haloferox volcani* Dihydrofolate Reductases. *J. Mol. Biol.* 323, 327-344.

x

- **Xiao Q, Li D, Guo R, Zheng L, An X, Zeng Z. (2018)** In vivo in vitro *Paralichthys olivaceus* and toxicities of diethyl phthalate to flounder fish and its gill cell line (FG cells). *JEB*, 39(1):73–81.
- **Xiayun Jianga,1, Daochun Chena,1, Shenle Honga, Weifen Wanga, Shunshen Chena, Shuming Zoub(2012)** Identification, characterization and functional analysis of a GH-18 chitinase from *Streptomyces roseolus*. *Carbohydrate Polymers* ,87, 2409-2415

y

- **Yang, J., Ferranti, D. C., Stern, L. A., Sanford, C. A., Huang, J., Ren, Z., Hall, A. R. (2011)** Rapid and precise scanning helium ion microscope milling of solid-state nanopores for biomolecule detection. *Nanotechnology*, 22, 28.
- **Yang, S., Fu, X., Yan, Q., Guo, Y., Liu, Z., Jiang, Z. (2016)** Cloning, expression, purification and application of a novel chitinase from a thermophilic marine bacterium *Paenibacillus barengoltzii*. *Food Chemistry*, 192, 1041-1048.
- **Yassin, A. F., Hupfer, H., Klenk, H., Siering, C. (2009)** *Desmospora activa* gen. nov., sp. nov., a thermoactinomycete isolated from sputum of a patient with suspected pulmonary tuberculosis, and emended description of the family *Thermoactinomycetaceae* Matsuo *et al.* 2006. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59.
- **Ye, Z., Jiang, J., Wu, G. (2008)** Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: Progresses and prospects. *Biotechnology Advances*, 26, 352-360.
- **Yeoman, C. J., Han, Y., Dodd, D., Schroeder, C. M., Mackie, R. I., Cann, I. K. (2010)** Thermostable enzymes as biocatalysts in the biofuel industry. *Adv appl microbiol* 70, 1-55.
- **Yoon, J. H., Shin, Y. K., Park, Y. H. (2000)** DNA-DNA relatedness among *Thermoactinomyces* species: *Thermoactinomyces candidus* as a synonym of *Thermoactinomyces vulgaris* and *Thermoactinomyces thalpopphilus* as a synonym of *Thermoactinomyces sacchari*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 1905-1908.

- **Yoon, J., Kang, K. H., Park, Y. (2002)** *Lentibacillus salicampi* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a salt field in Korea. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52.
- **Yoon, J., Kim, I., Shin, Y., Park, Y. (2005)** Proposal of the genus *Thermoactinomyces sensu stricto* and three new genera, *Laceyella*, *Thermoflavimicrobium* and *Seinonella*, on the basis of phenotypic, phylogenetic and chemotaxonomic analyses. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55.
- **Yu, T., Zhang, B., Yao, J., Tang, S., Zhou, E., Yin, Y., Wei, D., Ming, H., Li, W. (2012)** *Lihuaxuella thermophila* gen. nov., sp. nov., isolated from a geothermal soil sample in Tengchong, Yunnan, south-west China. Antonie van Leeuwenhoek, 102, 711-718.

Z

- **Zale, S. E., and A. M. Klibanov. (1986)** What does ribonuclease irreversibly inactivate at high temperatures?. Biochem 25, 5432–5444.
- **Zannier, F., Portero, L.R., Ordoñez, O. F. Martinez, L.J., Far-as, M., Albarracin, V.H. (2019)** Polyextremophilic Bacteria from High Altitude Andean Lakes: Arsenic Resistance Profiles and Biofilm Production. BioMed Research International, 1231975, 11.zh
- **Zhang, Y., Zhou, G., Lin, K., Zhang, Q., Di, H. (2007)** Application of latent heat thermal energy storage in buildings: State-of-the-art and outlook. Building and Environment, 42, 2197-2209.
- **Zhang, J., Zhou, J.-M. (2010)** Plant Immunity Triggered by Microbial Molecular Signatures. Molecular Plant, 3(5), 783-793.
- **Zhang, R., Neu, T. R., Zhang, Y., Bellenberg, S., Kuhlicke, U., Li, Q., Sand, W., Vera, M. (2015)** Visualization and analysis of EPS glycoconjugates of the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus metallicus*. Applied Microbiology and Biotechnology, 99, 7343-7356.
- **Zhang, H., Zhao, Z., Wang, H. (2017)** Cytotoxic natural products from marine sponge-derived microorganisms. Mar Drugs, 1(3), 15- 68.
- **Zhang, H., Hua, Y., Chen, J., Li, X., Bai, X., Wang, H. (2018)** Organism-derived phthalate derivatives as bioactive natural products, Journal of Environmental Science and Health, Part C, 36:3, 125-144
- **Zhao, X., John G., Lynch, JR., Chen, O. (2010)** Reconsidering Baron and Kenny: Myths and Truths about Mediation Analysis. Journal of consumer research, 37, 0093-5301.
- **Zhilina, T.N., Appel, R., Probian, C., Brossa, E. L., Harder, J., Widdel F. Zavarzin, G. A. (2004)** *Alkaliflexus imshenetskii* gen. nov. sp. nov., a new alkaliphilic gliding carbohydrate-fermenting bacterium with propionate formation from a soda lake. Arch Microbiol, 182, 244-253.
- **Zhong, W., Ding, S., Guo, H. (2015)** The chitinase C gene PsChiC from *Pseudomonas* sp. and its synergistic effects on larvicidal activity. Genetics and Molecular Biology, 38, 3, 366-372.

- **Zhou, X. X., Wang, Y. B., Pan, Y. J., Li, W. F. (2008)** Differences in amino acids composition and coupling patterns between mesophilic and thermophilic proteins. *Amino acids* 34, 25-33.
- **Zolfaghar, M., Amoozegar, M. A., Khajeh, K., Babavalian, H., Tebyanian, H. (2019)** Isolation and screening of extracellular anticancer enzymes from halophilic and halotolerant bacteria from different saline environments in Iran. *Molecular Biology*, 46, 3275-3286.

Web-graphie

Site Web 1: <http://www.partirenisrael.com/fr/menu/article/les-bienfaits-de-la-mer-morte-1>.

Site Web 2: <https://utah.com/boating/great-salt-lake>.

Site Web 3: <http://fr.depositphotos.com/23351580/stock-photo-salt-pans.html>.

Site Web 4: http://www.vitamitech.com/annuaire/la-sebkha-de-chottechergui/Photos_362_2860_32_1.

Site Web 5: <http://fr.alltravels.com/algerie/biskra/oumache/photos/courant-photo-1548704>

Annexes

Annexe 1

Composition des milieux de culture (dans 1000 mL d'eau distillée)

Milieu ISP2 :

- Glucose4g
- Extrait de levure4g
- Extrait de malt10g
- CaCO₃.....2g
- NaCl.....100g
- pH..... 7-7,2

Milieu DM

- NaCl240 g
- MgCl₂.6H₂O30 g
- MgSO₄.7H₂O35 g
- KCL..... 7 g
- pH7.5

Milieu Muller Hinton - Agar

- Hydrolysate acide de caséine 17.5g
- Infusion de viande..... 2g
- Amidon soluble1.5g
- Agar18-20g
- pH 7

Milieu Sabouraud

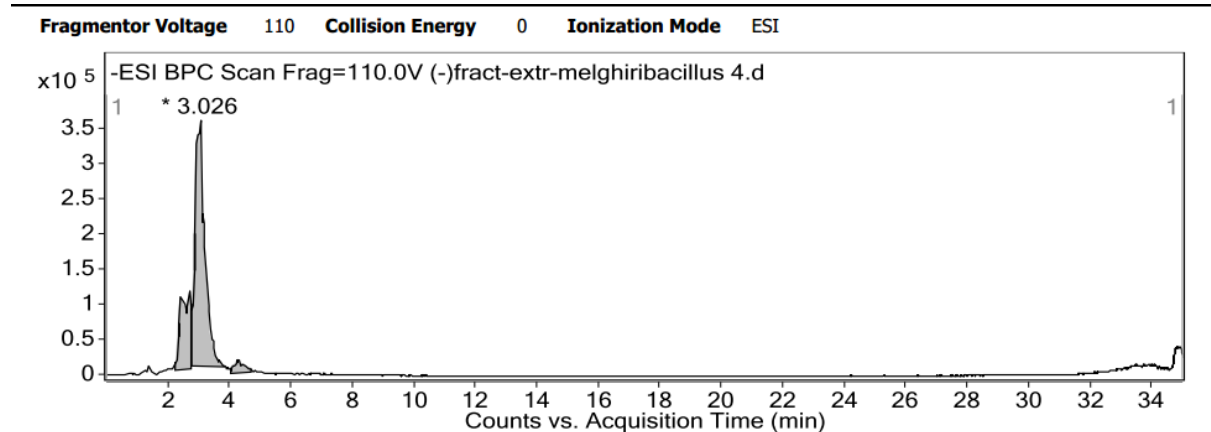
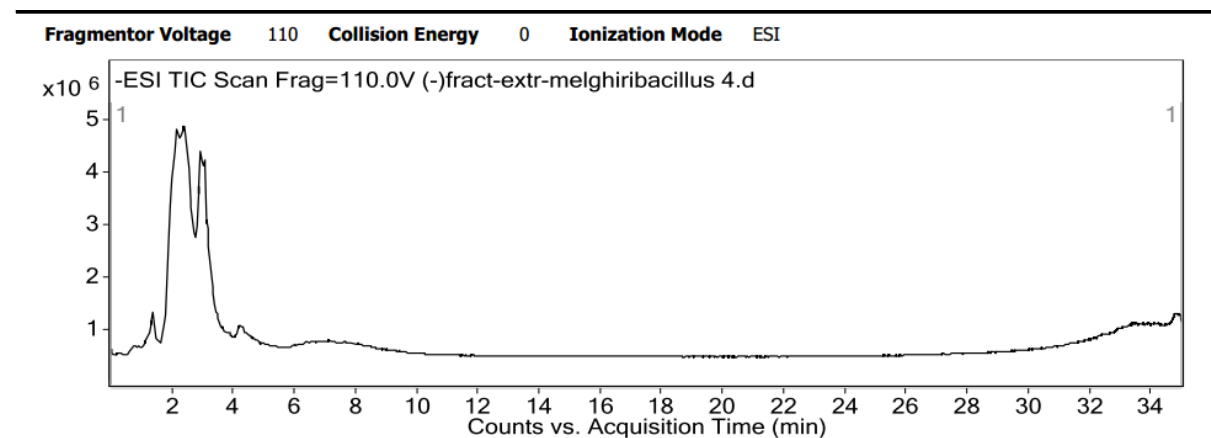
- Peptone10 g
- Glucose20 g
- Chloramphénicol0,5 g
- Agar.....15 g
- pH7

Milieu minimal (MM)

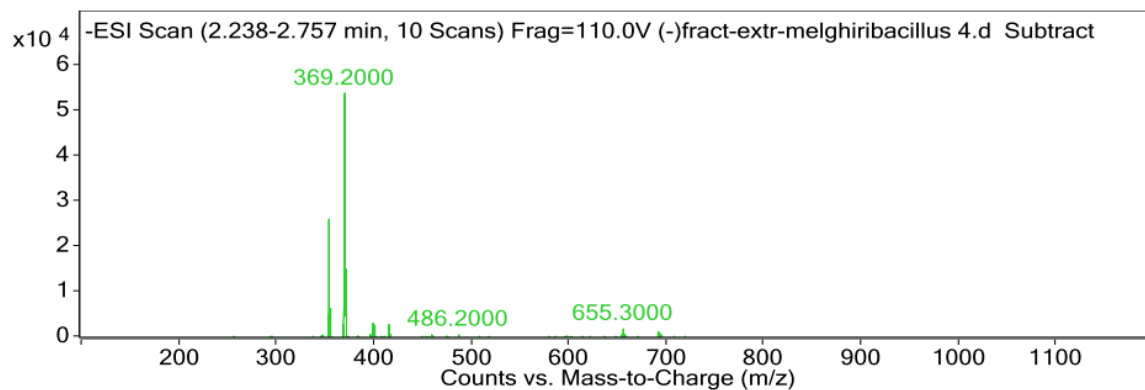
- CaCO₃.....2g
- NaCl.....100g
- Agar.....20g
- pH..... 7-7,2

Annexes 2

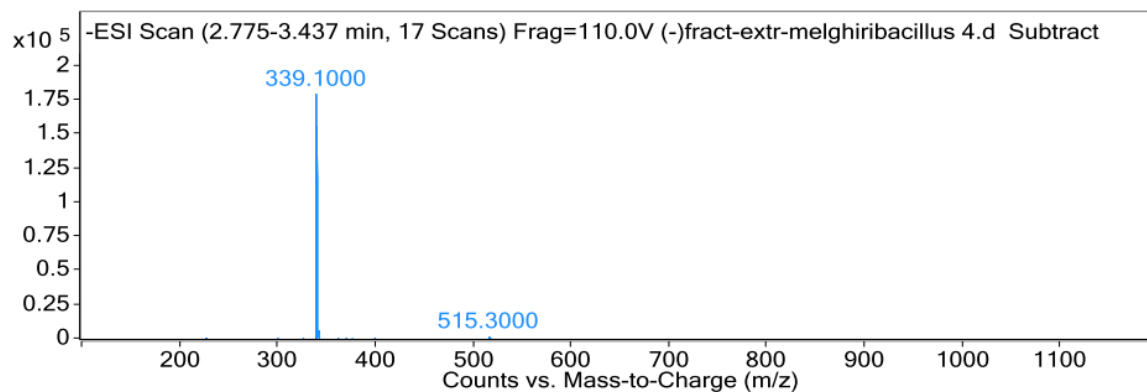
Masses moléculaires des autres molécules de l'extrait actif ATA détectées par LC-MS



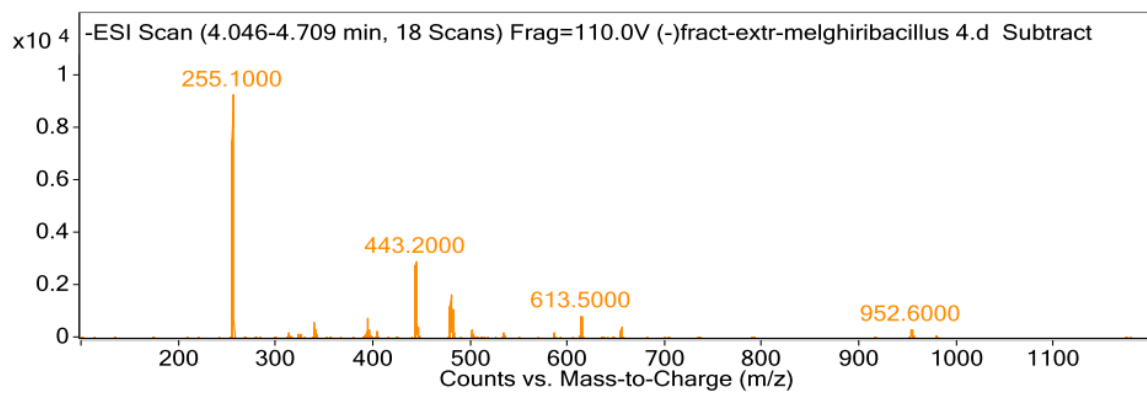
Spectrum Source Peak (1) in "- BPC Scan" **Fragmentor Voltage** 110 **Collision Energy** 0 **Ionization Mode** ESI



Spectrum Source	Fragmentor Voltage	Collision Energy	Ionization Mode
Peak (2) in "- BPC Scan"	110	0	ESI

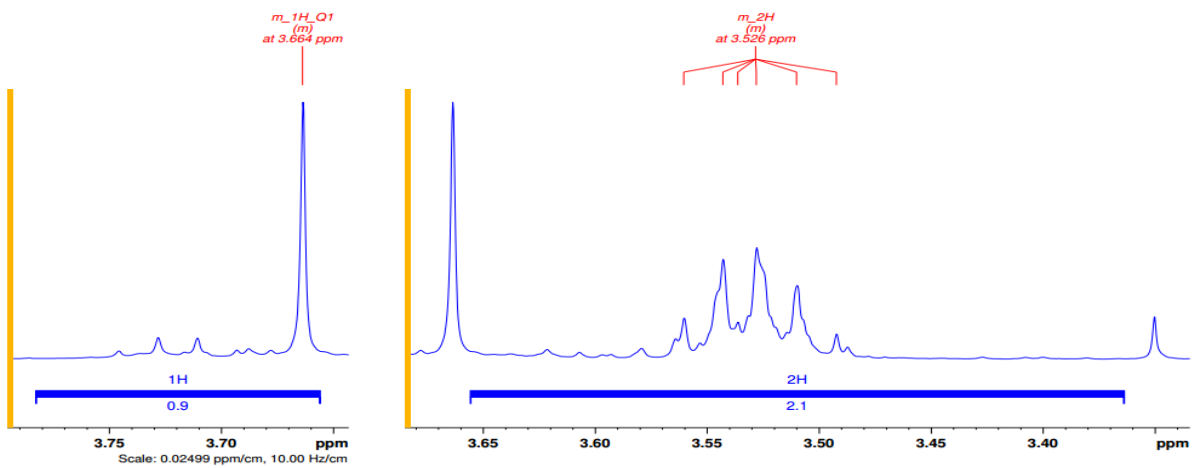
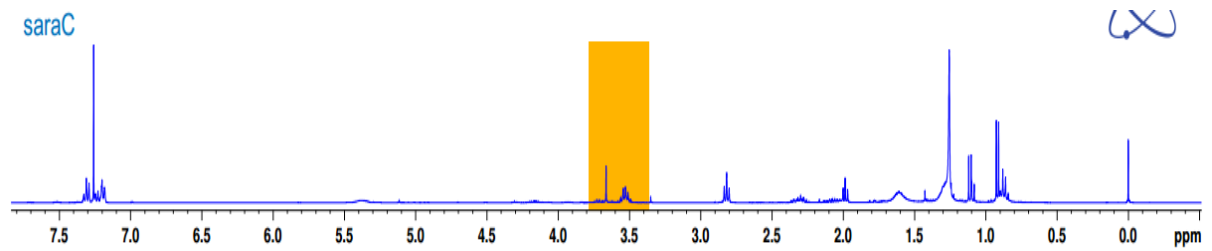
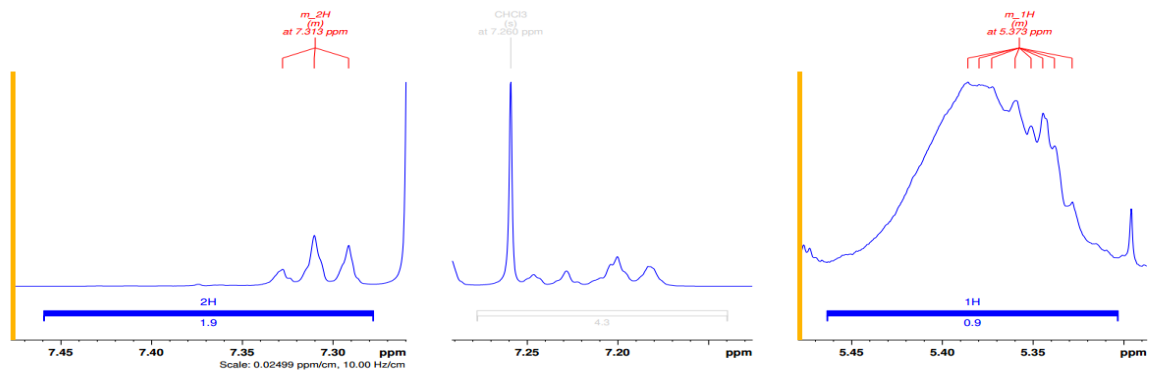
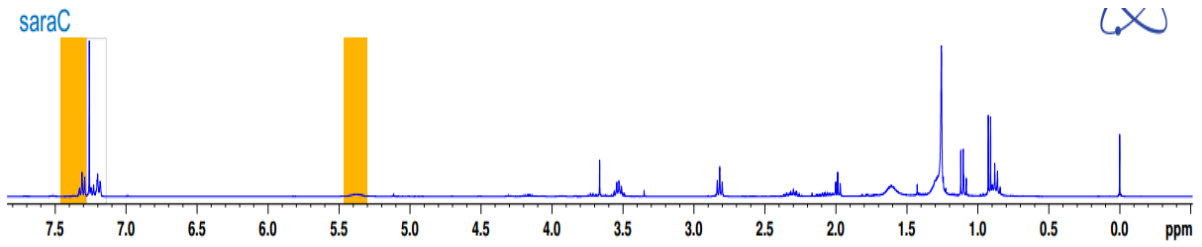


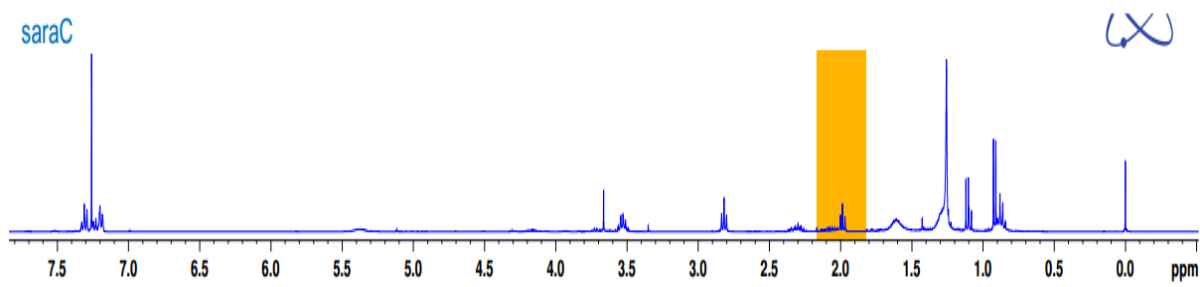
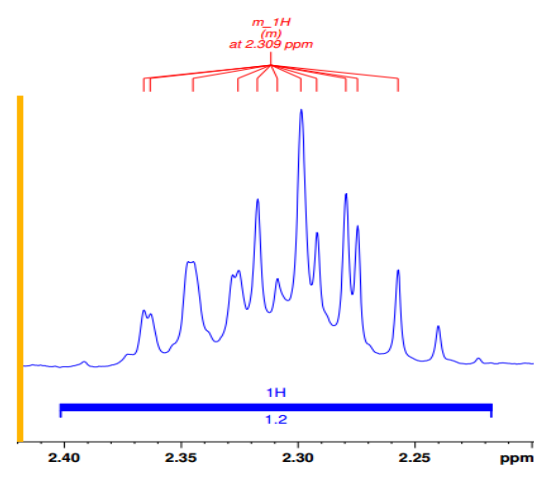
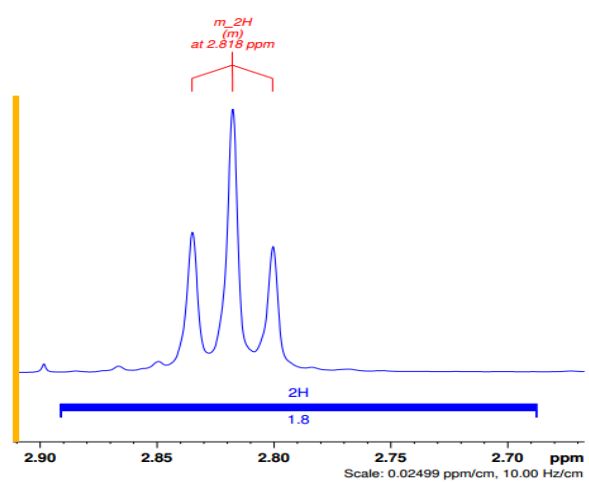
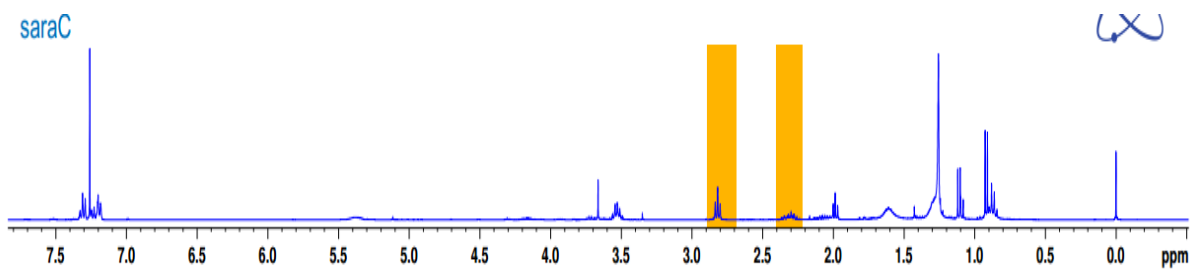
Spectrum Source	Fragmentor Voltage	Collision Energy	Ionization Mode
Peak (3) in "- BPC Scan"	110	0	ESI

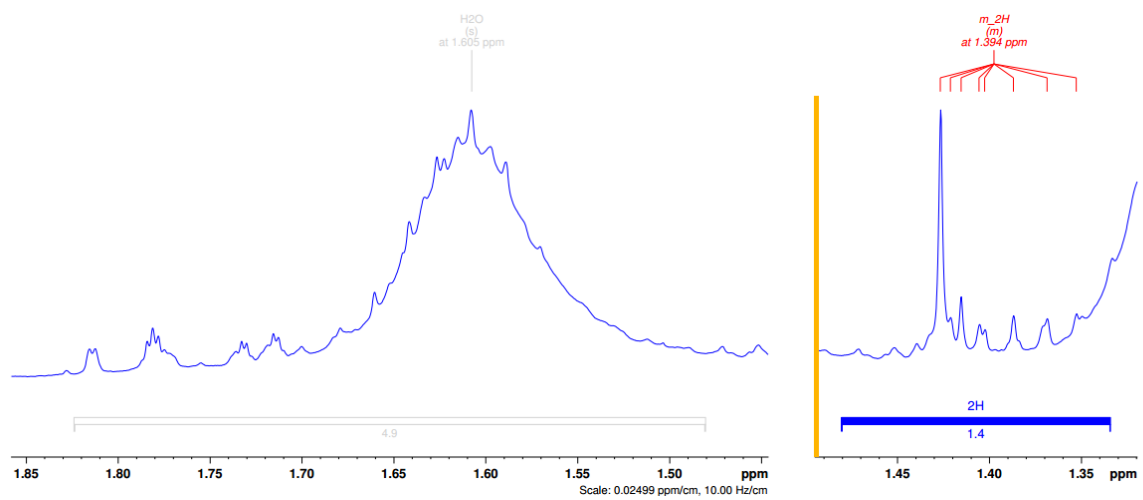
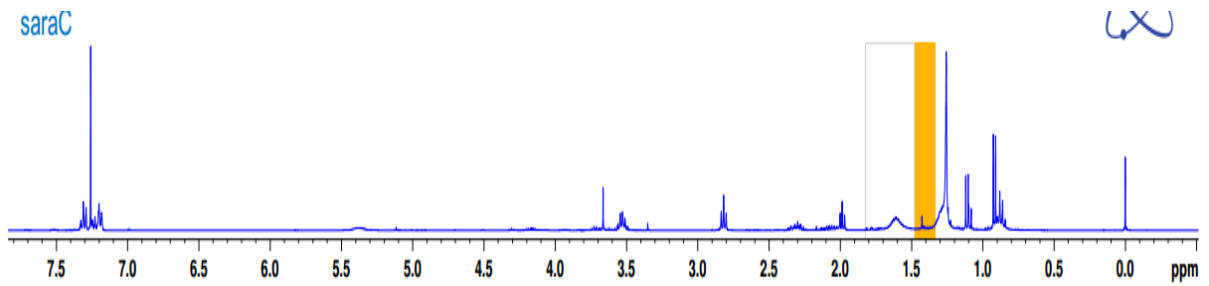
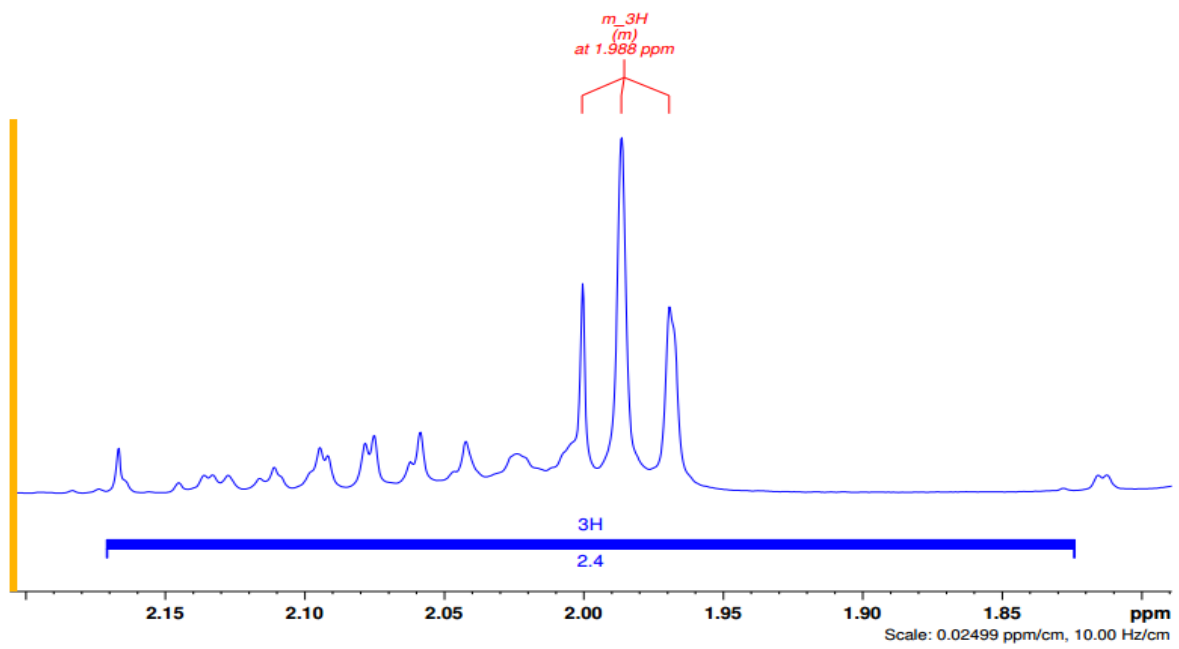


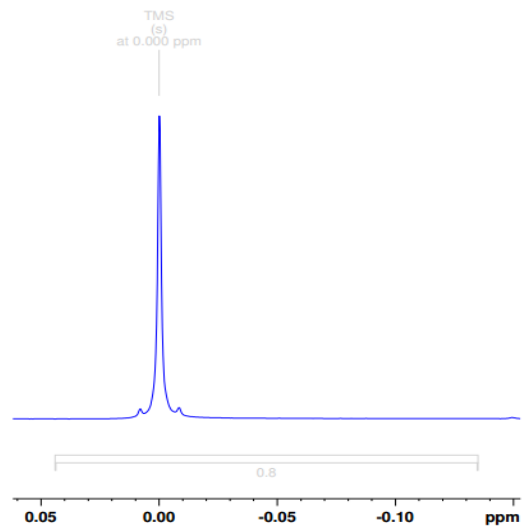
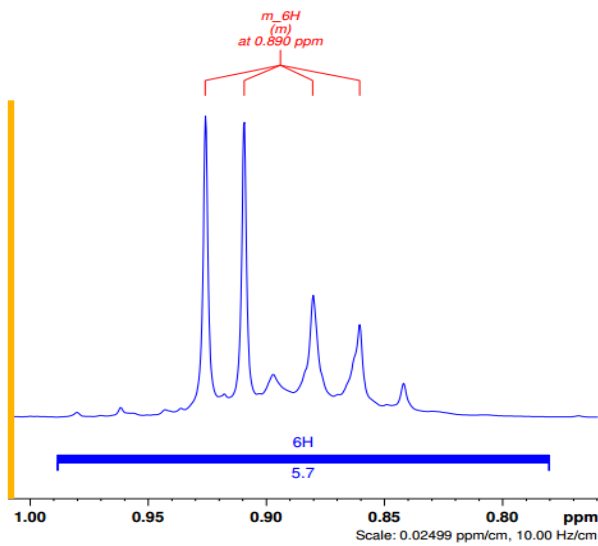
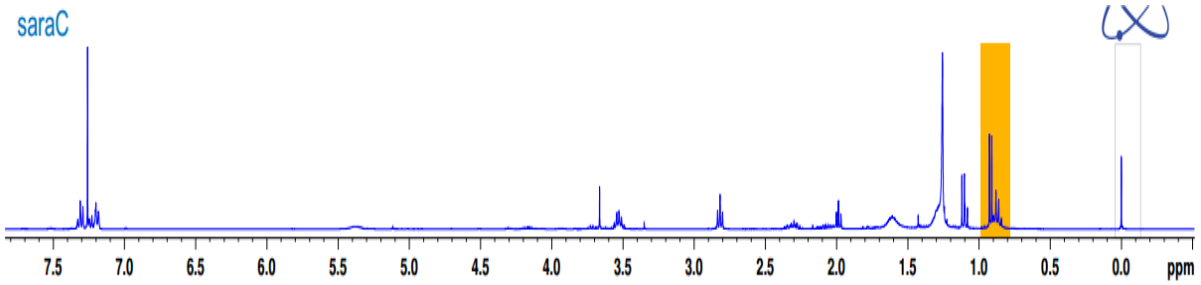
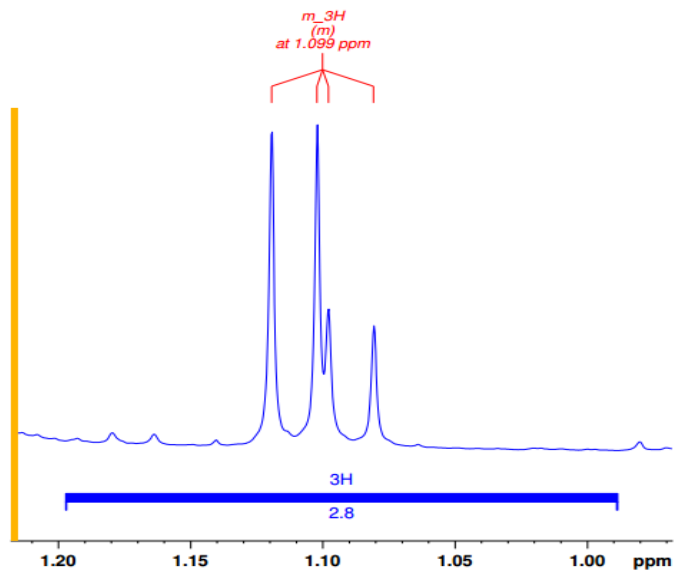
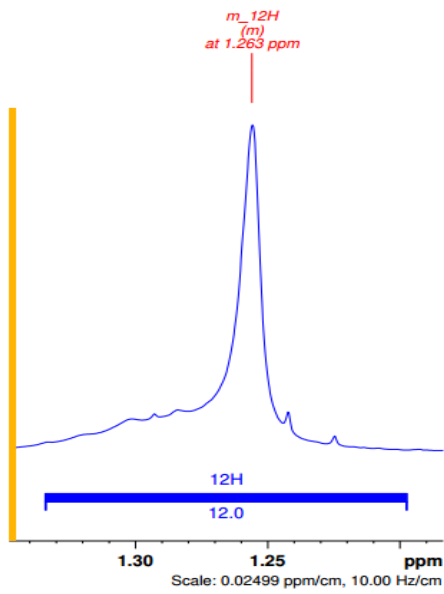
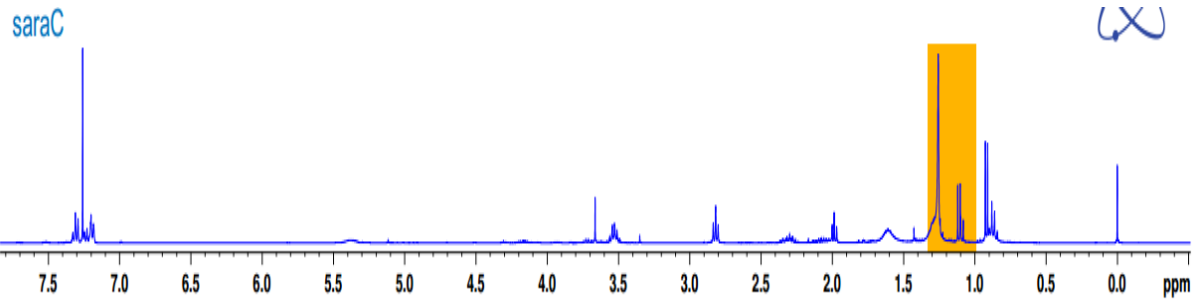
Annexe 3

Les spectres RMN









La description spectrale dans divers formats de revue

- Journal of Organic Chemistry (JOC)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) 7.34 - 7.28 (2H, m), 5.43 - 5.32 (1H, m), 3.67 - 3.66 (1H, m), 3.56 - 3.49 (2H, m), 2.84 - 2.79 (2H, m), 2.37 - 2.25 (1H, m), 2.01 - 1.96 (3H, m), 1.44 - 1.35 (2H, m), 1.28 - 1.25 (12H, m), 1.12 - 1.07 (3H, m), 0.93 - 0.85 (6H, m);

- Journal of Medicinal Chemistry

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.34 - 7.28 (m, 2H), 5.43 - 5.32 (m, 1H), 3.67 - 3.66 (m, 1H), 3.56 - 3.49 (m, 2H), 2.84 - 2.79 (m, 2H), 2.37 - 2.25 (m, 1H), 2.01 - 1.96 (m, 3H), 1.44 - 1.35 (m, 2H), 1.28 - 1.25 (m, 12H), 1.12 - 1.07 (m, 3H), 0.93 - 0.85 (m, 6H).

- Journal of the American Chemical Society (JACS)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ , ppm 7.34 - 7.28 (2H, m), 5.43 - 5.32 (1H, m), 3.67 - 3.66 (1H, m), 3.56 - 3.49 (2H, m), 2.84 - 2.79 (2H, m), 2.37 - 2.25 (1H, m), 2.01 - 1.96 (3H, m), 1.44 - 1.35 (2H, m), 1.28 - 1.25 (12H, m), 1.12 - 1.07 (3H, m), 0.93 - 0.85 (6H, m)

Abstract

Algeria's wealth in hypersaline biotopes is illustrated by the large number of sebkhas and hot and highly saline chotts widely distributed on the national territory. These ecosystems are presented as a privileged field of investigation for the search for new thermohalophilic stains producing active biomolecules. Research conducted by the microbiology team regularly highlights new and original taxa.

Our theme focuses on the study of antimicrobial and enzymatic activities of thermohalophilic bacterial strains newly isolated from hypersaline environments. 3 aerobic extremophilic strains were studied: *Melghirimyces algeriensis* Nari EX, *Melghirimyces thermohalophilus* Nari 11A and *Melghiribacillus thermohalophilus* Nari 2A.

The study undertaken in the framework of this thesis revealed two new biomolecules: an antagonistic bioactive molecule, with a low molecular weight, resistant to high temperatures, halotolerant, acidophilus and a non-halodependent thermostable chitinase, produced by the strain *Melghiribacillus thermohalophilus* Nari 2A, have been purified and characterized. These molecules that are potentially biotechnologically interesting are the subject of this work.

Keywords: biotechnology, thermohalophilic bacteria, extracellular molecules, antimicrobial activity, thermohalophilic enzyme, chitinase.

الملخص

ان الثروة التي تتمتع بها الجزائر في مجالات التحفيز الحيوي تتجلى في العدد الضخم من المناطق البحرية الساخنة والمالحة إلى حد كبير والموزعة على نطاق واسع على الاراضي الوطنية. وتعرض هذه الأنظمة البيئية كمجال متميز من مجالات التحقيق في البحث عن سلالات جديدة من الهلوفيليك الحرارية تنتج حبات حيوية نشطة. وتسلط البحوث التي يجريها فريق علم الأحياء الدقيقة الضوء بانتظام على التصنيفات الجديدة والأصلية.

يركز موضوعنا على دراسة الأنشطة المضادة للميكروبات والانزيمية للسلالات البكتيرية الحرارية الهلوفيلية المعزولة حديثا عن بيئات تحتوي على تركيز عالي من NaCl. 3 سلالات تمت دراستها: *Melghirimyces algeriensis* Nari EX, *Melghirimyces thermohalophilus* Nari 11A and *Melghiribacillus thermohalophilus* Nari 2A.

و قد كشفت الدراسة التي أجريت في إطار هذه النظرية عن جزيرتين حيويتين جديدتين: جزيء نشط حيوي مضاد له وزن جزيئي منخفض، و مقاوم لدرجات الحرارة المرتفعة، و الحماض، و عدم توفر تشيينيز مستقر حراري، ينتج عن سلالة *Melghiribacillus thermohalophilus* Nari 2A. وقد تم تطهيرها ووضوحها. وهذه الجزيئات التي يحتمل أن تكون مثيرة للاهتمام من الناحية التكنولوجية الحيوية هي موضوع هذا العمل.

Publication