



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



Université Amar Téliidji- Laghouat

FACULTE: Sciences

DEPARTEMENT : Biologie

MEMOIRE DE MASTER

Présenté par : M^{lle}. Daoudech Freiha

M^{lle}. Kheddadi Nacira

DOMAINE : Science de la Nature et de la Vie

FILIERE : Biologie

OPTION : Microbiologie Environnementale et Infectieuse

Thème

**Isolement et identification sommaire de microorganismes
halophiles à partir de biotopes salés dans les régions de la wilaya
de Laghouat et la Wilaya de Djelfa**

Jury de soutenance :

Nom et Prénom	Grade	qualité
M ^{lle} Benabed nour el-Houda	Maitre Assistante Classe A	Présidente
M ^{me} Aoussi Hadjer	Maitre Assistante Classe A	Examinatrice
M ^{lle} Takhi Djalila	Maitre Assistante Classe A	Rapporteuse

Promotion : Septembre - 2015

Remerciements

Nous remercions notre Dieu, le plus miséricordieux pour nous guider et de nous donner la force de continuer et de réaliser notre travail et de nous avoir ouvert les portes de savoir.

En premier lieu, nous remercions énormément M^{lle} Thakhi Djalila pour être notre promotrice dans notre projet de fin d'étude.

Nous tenons à exprimer nos gratitudeux aux membres du jury de nous avoir donné l'honneur en acceptant de juger ce travail.

Nos plus profondes reconnaissances s'adressent à M. Gouzi et nous le remercions profondément qu'il n'a jamais cessé à nous aider, à croire en nous et à nous encourager.

Un immense merci également à la Haut-commissariat au développement de la Steppe et à l'institution publique de la santé à Djelfa de nous avoir aidés à atteindre les étapes importantes dans notre travail.

Nous remercions Mr Chaibi Rachid de nous aider à réaliser ce travail, nos vifs remerciements s'adressent aux travailleurs de laboratoire biologique dans l'Université Amar telidji pour leurs aides et leur patience.

Nos sincères remerciements et un grand respect pour tous les professeurs qui nous ont enseigné beaucoup de choses, non seulement dans la science.

Grand merci pour tous nos collègues de master de la promotion 2014-2015

Nos sincères remerciements pour tous ceux qui ont participé pour réaliser ce travail, que Dieu vous bénisse.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A notre prophète Mohamed (paix soit sur lui).

Aux mes chères parents qui n'ont jamais cessé de me soutenir, de m'encourager afin d'apporter le meilleur de moi.

A ma chère sœur et mes chers frères pour être toujours là pour moi.

A mon ami Abderrahmane Ghuibeche.

A mes chères amies en particulier Hicham.

Fraiha

Dédicace

A mon enseignant, Monsieur *GOUZI* Hicham, Je tiens à exprimer ma très grande considération et ma vive reconnaissance

A ma très chère grand mère Khadidja Allah yarhamha

A mon grand père et ma grande mère

Aux mes chères parents Saad et Saaida

A mes chères soeurs Noura et Kholoud

A mes chers frères Nacer, Mustapha et Abdnour

A toute ma grande famille

A tous mes chères amis, surtout ma collègue d'etude Freiha, Keltoum et Khadidja

A ma chère chef service et tous mes chères collègues du travail d'EPHG

A toutes les personnes qui m'ont aidée à réaliser ce travail.

A mon ami Said.

Nacira

	Page
Figure 01 : Le bras nord du Grand Lac Salé, Utah, USA.....	4
Figure 2 : La mer morte, environnement hypersalin.....	5
Figure3 : Arbre phylogénétique du vivant montrant la diversité des halophiles....	8
Figure 4 : Différentes morphologies des cellules des <i>Halobacteriales</i>	10
Figure 5 : Microscopie à contraste de phase des membres de <i>Haloanaerobiales</i> , <i>Haloanaerobium alcaliphilum</i> et <i>Halobacteroides halobius</i>	11
Figure 6 : Microscopie à phase contraste de <i>Desulfovibrio gracilis</i> et <i>Desulfotomaculum halophilum</i>	12
Figure 7 : Microscopie à phase contraste de <i>Halobacillus halophilus</i> image microscopique à lumière de <i>Chromohalobacter salexigens</i>	12
Figure 8 : Microscopie à phase contraste de <i>Salinibacter ruber</i>	13
Figure 9 : Lac Urmia, environnement hypersalin.....	14
Figure 10 : Distribution des microorganismes halophiles qui accumulent le KCl..	15
Figure 11 : Distribution des microorganismes halophiles qui accumulent les solutés organiques compatibles.....	17
Figure12 : Photos de la sebkha de la zone (1).....	20
Figure 13 : Photos de la sebkha de la zone (2).....	20
Figure14 : Photos de la sebkha de la zone (3).....	21
Figure 15 : Appareil de filtration de membrane.....	24
Figure 16 : photographie d'une observation microscopique (Gx100) après coloration de Gram des isolats : (a) ZG1-A, isolé de la Zone1, (b) RS2-2 et (d) RS2-3 isolés de la Zone 2 ; (c) KM2-B isolé de la zone 3.....	33

	Page
Tableau 1 : Composition chimique d'un exemple d'environnements thalassohalins et d'un milieu athalassohalins en comparaison à celle de l'eau de mer.....	6
Tableau 2 : Situation géographiques des zones étudiées.....	19
Tableau 3 : les valeurs de pH et température des sites.....	27
Tableau 4 : Analyse chimique de l'échantillon d'eau RSE et lac sidi Ameer.....	28
Tableau 5 : types de colonies trouvées sur le GN.....	29
Tableau 6 : types de colonies trouvées sur le MNH.....	29
Tableau 7 : types de colonies trouvées sur le MSH.....	30
Tableau 8 : types de colonies trouvées sur le MG.....	31
Tableau 9 : Résultats de la coloration de Gram.....	32
Tableau 10 : Résultats de l'identification phylogénétique de quelques isolats isolées à partir d'un échantillon de sol.....	34

Br⁻ : ion bromure.

Ca²⁺ : ion calcium.

CaCl₂ 2H₂O : chlorure de calcium deux fois hydraté.

CaCO₃ : calcite.

CaSO₄ 2H₂O : gypse.

Cl⁻ : ion chlorure.

CNV : crémeuse non visqueuse.

CO₃⁻ : ion carbonate.

EDTA: l'acide éthylène-diamine-tétracétique **F⁻** : ion fluor.

FeCl₂ 4H₂O : chlorure de fer quatre fois hydraté.

GN : gélose nutritif.

HCO₃⁻ : ion bicarbonate.

K⁺ : ion potassium.

KCl : chlorure de potassium.

MG : milieu Gibbons.

Mg²⁺ : ion magnésium.

MgCl₂ 6H₂O : chlorure de magnésium six fois hydraté.

MgSO₄ 7H₂O : sulfate de magnésium sept fois hydraté.

MnCl₂ 4H₂O : chlorure de manganèse quatre fois hydraté.

MNH : milieu naturel des halophiles.

MSH : milieu sélectif pour les halophiles.

Na⁺ : ion sodium.

NaBr : bromure de sodium.

NaCl : Chlorure de sodium.

NaHCO₃ : bicarbonate de sodium.

SO₄²⁻: ion sulfate.

UV: ultra-violet.

Sommaire

	Page
Introduction	1
Rappel bibliographique	3
A. Habitats salines et hypersalines.....	3
1. Environnement aqueux thalassohalins et athalassohalins.....	3
I. Environnement thalassohalins.....	3
II. Environnement athalassohalins.....	5
B. Les microorganismes halophiles.....	7
I. Les <i>Archaea</i> halophiles.....	9
II. Les bactéries halophiles.....	11
III. Eucaryotes halophiles.....	13
C. Adaptation des halophiles dans les environnements hypersalins.....	14
1. Régulation de la pression osmotique.....	15
a. Première stratégie : accumulation du KCl.....	15
b. Deuxième stratégie : accumulation de solutés compatibles.....	16
D. Domaines d'application des halophiles.....	14
Matériels et méthodes	
I. Sites d'étude et échantillonnage.....	19
1. Les sites de l'étude.....	19
2. Prélèvement des échantillons de sol.....	19
II. Etude des paramètres physico-chimiques de l'eau.....	21
1. pH et température.....	21
2. Dosage de calcium et Magnésium.....	22
3. Titre alcalimétrique HCO ³⁻	22
4. Dosage des chlorures.....	22
5. Dosage des sulfates.....	23
III. Isolement.....	23
1. Etape de pré-culture.....	23
a. Traitement de l'échantillon de sol.....	23
b. Traitement de l'échantillon d'eau.....	24
2. Mise en culture, isolement et purification.....	25
3. Identification phénotypique des isolats.....	25
a. Etudes des Caractères cultureux des colonies.....	25
b. Observation microscopique des cellules.....	26
c. Analyse phylogénétique de quelques isolats.....	26

<i>Résultats et discussion</i>	27
I. Résultats de l'Analyse physico-chimique de l'échantillon d'eau RSE.....	27
1. pH et Température.....	27
2. composition chimique de l'eau de la zone (2).....	27
II. Résultats de l'étude microbiologique.....	28
1. Etude morphologique des colonies.....	28
2. Résultat de l'observation microscopique des isolats	32
III. Identifications phylogénétique des souches.....	33
<i>Conclusion</i>	38
<i>Références bibliographiques</i>	39
<i>Annexes</i>	47
<i>Glossaire</i>	52

Introduction

Au cours des 30 dernières années, nous avons assisté à la découverte d'une extraordinaire diversité de microorganismes habitant des milieux que l'on croyait auparavant hostiles à la vie. Aujourd'hui, on sait que la vie microbienne s'étend sur Terre partout, ces microorganismes sont adaptés à des valeurs extrêmes d'un ou plusieurs paramètres physicochimiques :

- Les microorganismes adaptés aux hautes températures avec des optimums dépassant 80°C sont nommés les hyperthermophiles. A l'autre extrême de température, on retrouve les psychrophiles qui préfèrent une température inférieure à 15°C ;
- Les halophiles se développent dans des environnements où la concentration des sels avoisine la saturation ;
- Les barophiles supportent des pressions allant jusqu'à 1000 atm.(Horikoshi *et al.*, 2010), nous pouvons citer d'autres paramètres (pH, radiations... ect), mais les domaines de l'extrémophilie les plus étudiés sont la thermophilie et la halophilie (Priest et Goodfellow, 2012).

Les habitats hypersalins sont des écosystèmes extrêmes comprennent les eaux et les sols (Ventosa *et al.*, 2007 in Dion et Nautiyal, 2007) contenant des concentrations considérables en sels minéraux dont le NaCl est le sel majeur (Iarsen in Nissenbaum, 2011). Ces écosystèmes hébergent une grande biodiversité de microorganismes nommés halophiles incluant les trois domaines de vie : *Archea*, *Bacteria* et *Eucarya* (Cimerman *et al.*, 2006).

Bien que l'halophilie soit très répandue dans le domaine *Bacteria*, les halophiles extrêmes les plus connus se trouvent dans le domaine *Archea*. En revanche les halophiles sont peu répandus dans le domaine *Eucarya* (Mcgenity et Oren, 2012 in Bell, 2012; Melack *et al.*, 2013). Ces microorganismes sont bien adaptés à la vie à des concentrations élevées en sel et à la pression osmotique élevée qui résulte de la salinité importante (Oren, 2006 ; Oren in Marshall, 2013).

Les premiers organismes extrémophiles isolés font partie des organismes halophiles, découverts dans un environnement qu'on croyait dépourvu de vie, d'où son nom: la Mer Morte (Lopez in Michaud, 2006).

Les capacités étonnantes d'adaptation des microorganismes extrêmophiles au stress physico-chimique offrent des perspectives en termes d'application biotechnologiques et conduit également à s'interroger sur leur capacité de produire de nouvelles substances exceptionnelles telle que les substances antimicrobiennes et les exoenzymes par exemple amylase (Ventosa *et al.*, 2011).

Parallèlement à leur diversité, l'étude de ces organismes halophiles a mené à les considérer comme des organismes à fort potentiel biotechnologique notamment par leurs productions d'enzymes extracellulaires, des solutés compatibles, des polymères à grand intérêt dans différentes industries. Aussi ces organismes sont utilisés dans les procédés de bioremédiation (Rath *et al.*, in Mishra, 2009).

L'Algérie compte plusieurs milieux hypersalins, dont plusieurs sont situés en zones arides et semi-arides. De nombreuses études microbiologiques de ces milieux ont été réalisées par (Hacène *et al.*, 2004) afin d'étudier la biodiversité microbienne de ces régions.

Ainsi, notre travail s'inscrit dans le même objectif :

- Isolement et caractérisation sommaire de isolats obtenus à partir de trois sites hypersalins dans deux wilaya : Djelfa et Laghouat ;
- Identification moléculaire de quelques isolats.

***Rappel
bibliographique***

A. Habitats salines et hypersalines

La plus grande partie de la biosphère est saline, les eaux des océans et les mers qui couvrent la majorité de la surface de la planète contiennent 35g de sels dissouts par litre (Oren, 2006; DasSarma et DasSarma, 2012). Deux types d'environnements peuvent contenir du sel, qui peut agir sur les populations microbiennes; le sol et l'eau (Ventosa *et al.*, 2007 in Dion et Nautiyal, 2007). Ces environnements montrent une grande variabilité de la composition ionique, dont le NaCl est le plus abondant (Seckbach, 2012; Larsen in Nissenbaum, 2011; McGenity *et al.*, 2000)

Le terme salin est utilisé pour un environnement qui présente une concentration de sel proche supérieure à celle de l'eau de mer, Le sol est considéré salin lorsque la teneur en sels solubles est supérieur à 0,2% (Ventosa et Arahall, 2009). En revanche, l'eau est considérée saline lorsque la concentration en sels dépasse 0,3% (Rodriguez-valera in Vreeland et Hochstein, 1998 ; Enach *et al.*, 2012 in Stan-Lotter et Fendrihan, 2012).

On définit hypersalin pour les environnements présentant des concentrations en sels supérieures à celle de l'eau de mer et dépassant 3,3% (Oren, 2006 ; Enach *et al.*, in Stan-Lotter et Fendrihan, 2012), qui se réfère à des valeurs plus élevées jusqu'à la saturation du NaCl, dans les marais salés, les lagunes, les sebkhas, dans les lacs intérieurs tels que la Mer morte, grand lac salé UTAH....etc. (Oren, 2006; Ventosa et Arahall 2009; DasSarma et DasSarma, 2012)

1. Environnement aqueux thalassohalins et athalassohalins

Les environnements hypersalins présentent une grande variabilité dans la composition ionique, la concentration totale de sel, dont le NaCl est le plus abondant, ainsi que le pH (Seckbach, 2012). Ces environnements peuvent être divisés en thalassohalins (du latin : *thalassa*, qui signifie mer) et athalassohalins (Oren, 2006 ; Ventosa, 2006 in Logan *et al.*, 2006; Ventosa et Arahall, 2009; DasSarma et DasSarma, 2012).

i. Environnement thalassohalins

Les environnements thalassohalins (tableau 1) ont pour origine l'évaporation de l'eau de mer, ainsi leurs compositions chimiques reflètent celle de l'eau de mer. Chimiquement parlant, on y remarque une dominance du Na⁺ et du Cl⁻ (responsable de 49% et 42% de la molarité totale, respectivement). D'autres ions importants : Mg²⁺, SO₄²⁻, K⁺, Ca²⁺, Br⁻, HCO₃⁻ et le F⁻. (Ventosa et Arahall 2009; Oren, 2006).

La salinité moyenne de l'eau de mer est de 3,5%. Lorsque celle-ci est concentrée suite à l'évaporation, sa composition change, dû aux précipitations en série (Ventosa et Arahall, 2009). Différents sels minéraux précipitent le long de la colonne d'eau avant que le NaCl atteigne la saturation. Ceux-ci incluent le CaCO_3 en tant que calcite ou aragonite, et le $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ comme gypse (Oren, 2006).

Le grand lac Salé d'Utah (USA) (fig.1), est un exemple d'environnement thalassohalin. La composition des sels son eau ressemble à celle de l'eau de mer, malgré le fait que ce lac ait été détaché des océans depuis des milliers d'années (Oren, 2006). Parmi les autres environnements thalassohalins, En citant les salines solaires Maras en Peru (Maturrano *et al.*, 2006).



Figure 1 : Le bras nord du Grand Lac Salé, Utah, USA.

La couleur verte est principalement due aux cellules de cyanobactéries et d'algues vertes (Madigan *et al.*, 2012).

ii. Environnement athalassohalins

Beaucoup d'autres saumures naturelles possèdent une composition ioniques totalement différente de celle de l'eau de mer. Ceux sont appelés "environnement athalassohalins" (tableau 1). Les lacs alcalins de soude, en sont des exemples. Ces derniers sont fortement pauvres en cations bivalents Mg^{+2} et Ca^{+2} , mais contiennent des concentrations élevées de carbonate/bicarbonate. Ils peuvent présenter des pH allant de 10 à 11, parfois plus (Oren, 2006).

La mer morte (fig.2) est un environnement athalassohalin. C'est un lac légèrement acide. Les cations bivalents (Mg^{+2} , Ca^{+2}) y sont plus abondants que les cations monovalents (Na^+ , K^+). Le chlorure et le bromure sont les anions dominants. Cependant le taux de sulfate est très faible. Il y a d'autres lacs salins et hypersalins dans le monde et leurs compositions chimiques varient considérablement (Oren, 2006; Ventosa et Arahal, 2009; DasSarma et DasSarma, 2012). D'autre exemple d'un environnement athalassohalin est wadi natrun en égypte (Browsers *et al.*, 2009) qui caractérisé par un PH alcalin (Javor, 2012)



Figure 2 : La mer morte, environnement hyper salin qui est un habitat pour une variété des procaryotes halophiles (Krasner, 2010)

Tableau1 : Composition chimique d'un exemple d'environnementsthalassohalins et d'un milieuathalassohalins en comparaison à celle de l'eau de mer (Ayad, 2012)

Ions	Milieu		
	La mer morte g/l	Eau de mer g/l	Grand lac salé, Utah (USA) g/l
Na ⁺	40,10	10,60	105
K ⁺	7,70	0,38	6,70
Mg ⁺²	44	1,27	11
Ca ⁺²	17,20	0,40	0,30
Cl ⁻	225	18,90	181
Br ⁻	5,30	0,065	0,20
SO ₄ ⁻	0,50	2,65	27
HCO ₃ ⁻	0,20	0,14	0,70
pH	6,10	8,10	7,70

En ce qui concerne les sols salins ou hypersalins, le terme thalassohalins ou son opposé doit être utilisé avec précaution à cause de la structure et l'hétérogénéité de cet environnement implique que des différences importantes peuvent se produire même dans les petites distances, ce qui résulte que la distinction entre les sols thalassohalins et athalassohalins n'est pas aussi claire que dans les eaux hypersalines (Ventosa et Arahall, 2009).

B. Les microorganismes halophiles

Les environnements hypersalins abritent des formes de vie microbienne appelées "halophiles" (Seckbach, 2012). Le terme halophile (*halo* signifie sel, *philos* signifie aimer) désigne les microorganismes qui nécessitent la présence de sel (NaCl) dans le milieu pour leur croissance (Dassarma et Dassarma, 2012 ; Kanekar et al., in Satyanarayana et al., 2012). Leur exigence en NaCl on peut la diviser, selon Larsen, 1962 *in* kushner *in* Vreeland et Hoshtein, 1992) en:

- a. Les non halophiles se développent optimalemnt au dessous d'une concentration de 2% ;
- b. Les légèrement halophiles avec une croissance optimale à des concentrations comprises entre 2 à 5% ;
- c. Les halophiles modérées dont la croissance optimale se situe à des concentrations allant de 5 à 20% ;
- d. Les halophiles extrêmes qui montrent une croissance optimale à des concentrations situées dans l'intervalle 20 à 30%.

Et en 1993, Kushner *in* kushner *in* Vreeland et Hoshtein, 1992) a refait la classification :

- i. Les microorgansimes qui croissent optimalement dans des milieux contenant de 1 à 3% de NaCl sont qualifiés légèrement halophiles ;
- ii. Les halophiles modérées montrent une croissance optimale dans des milieux contenant de 3 à 15% de NaCl ;
- iii. Les halophiles extrêmes ont une croissance optimale de 15 à 30%, parfois au dessus ;
- iv. Les non halophiles qui ont une croissance optimale à des concentrations au dessous 1%.

En revanche, le terme « halotolérant » signifie que les microorganismes tolèrent différentes concentrations en sel durant leur croissance(Ventosa *et al.* 2007 *in* Dion et Nautiyal, 2007; Vreeland et Hoshtein, 1992).

Les halophiles constituent un groupe important des microorganismes qui se sont adaptés à vivre et à prospérer dans une diversité de niches hypersalines. A l'aide des applications des nouvelles approches phylogénétiques et des techniques de biologie moléculaire, le nombre d'espèces d'halophiles identifiées a augmenté énormément pendant les dernières années (Ventosa *et al.*, 2006 in Cimermane *et al.*, 2006).

Chacun des trois domaines de la vie (fig.3) inclut des microorganismes halophiles : *Archaea*, *Bacteria* et *Eucarya* (Oren et Litchfield, 2001 in Melack *et al.*, 2012; Ventosa *et al.*, 2006 in Cimermane *et al.*, 2006; Oren, 2006).

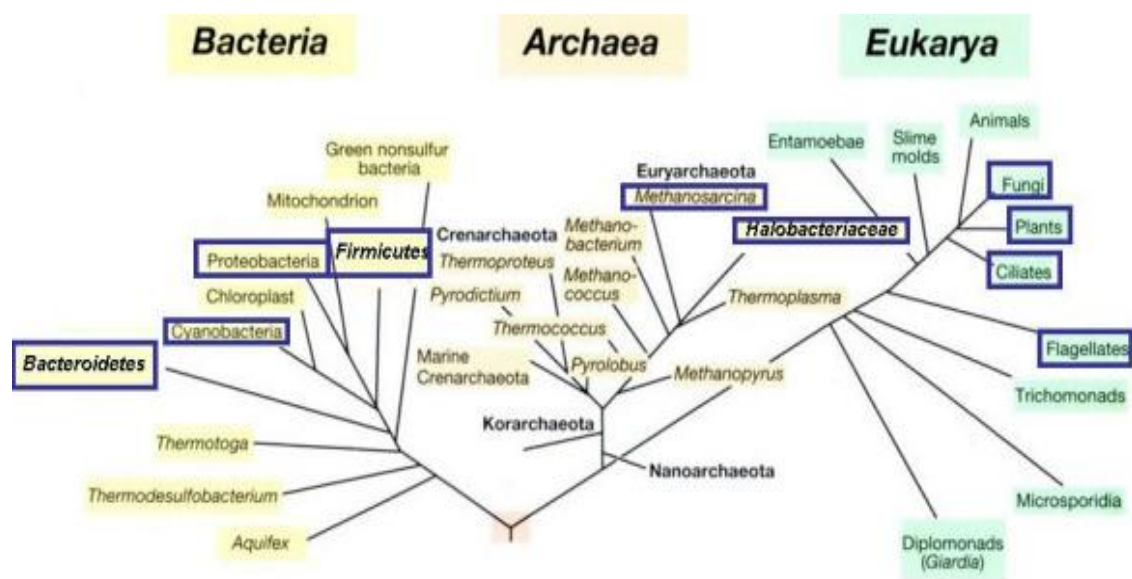


Figure3 : Arbre phylogénétique du vivant montrant la diversité des halophiles qui sont encadré en bleu (Oren, 2008).

Toutes les archées halophiles appartenant au Phylum des *Euryarchaeota*, il y a une seule famille : les *Halobacteriaceae*. Certains d'entre eux sont également alcaliphiles (Gragaud, 2011), cette famille englobe 36 genres (Oren, 2012), d'autres halophiles méthanogènes (Seckbach *et al.*, 2013)

Les phylums bactériens tels que les *Cyanobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes*, *Bacteroidetes* comprennent des bactéries halophiles (Gragaud, 2011; Ventosa *et al.*, 2010 in Horikoshi *et al.*, 2010; Seckbach *et al.*, 2013; Mcgenity et Oren, 2012 in Bell, 2012; Oren, 2006).

Enfin, quelques organismes eucaryotes sont halophiles, notamment les plantes (ou halophytes), champignons et levures, ciliés et flagellés (Gargaud, 2011). L'algue verte unicellulaire *Dunaliella salina* est l'organisme halophile le plus connu (Gargaud, 2011), en citant un autre microorganisme halophile eucaryotique, la levure *Pichia guilliermondii*. (Ventosa, 2013).

Les bactéries et les archées sont les groupes prédominant des halophiles et les halophiles extrêmes (Oren, 2006).

I. Les *Archaea* halophiles

Une question a été posée par Magrum *et al.*, 1978 : est ce que les halophiles extrêmes sont effectivement des bactéries ? La réponse fut négative grâce aux travaux de Woese et collaborateurs à la fin des années 1970, qui ont démontré que beaucoup des organismes halophiles étudiés étaient des archées (Oren, 2006).

La majorité des archées halophiles appartiennent à la classe *Halobacteria*, qui compte un seule ordre, *Halobacteriales*, et une seule famille, les *Halobacteriaceae*. Cette classe forme une branche dans le phylum *Euryarcheota*, s'enbranchant près des *Methanomicrobiales* dans l'arbre phylogénétique (Fig. 3) (Oren, 2006).

Les *Halobacteriaceae* comprennent essentiellement des halophiles extrêmes dont la croissance optimale se fait dans des milieux contenant des concentrations en NaCl allant de 15 à 30%. Aérobie et hétérotrophe, les archées halophiles utilisent préférentiellement les acides aminés comme une source de carbone et d'énergie (Oren *et al.*, in Rosenberg, 1993, Mcgenity et Oren, 2010 in Bell, 2012).

Ils sont aussi capables de convertir l'énergie lumineuse en énergie chimique en utilisant une pompe à protons, la bactériorhodopsine, pompe à proton lumière-dépendante, et l'halorhodopsine une pompe à Cl⁻ lumière-dépendante. On a noté également l'existence de la bacteriorubérine. Ces trois composants sont rencontrés chez *Halobacterium salinarum* (Oren, 2006 ; Oren, 2002 in Läuchli et Lüttge, 2007; Munn, 2011).

La bacteriorubérine est un pigment caroténoïde. Sa fonction principale est de protéger les microorganismes halophiles des dommages des rayons UV causés par le soleil (Oren, 2002 in Läuchli et Lüttge, 2007; Brocks in Schlesinger, 2005). Des études montrent que la bacteriorubérine accélère le taux de photocycle de halorhodopsine la pompe de Cl⁻ (Tiomaka in Rigaud, 1992).

Les archées aérobies, membre des *Halobacteriales* se trouvent abondamment dans la plupart des environnements hypersalins, à l'instar des genres *Haloarcula*, *Haloferax*, *Halobacterium* et *Halorubrum*, ainsi que *Natronobacterium* ou *Natronococcus* dans les lacs alcalins (Ventosa *et al.*, 2010 in Horikoshi *et al.*, 2010)

L'ordre *halobacteriales* contient une variété de morphologies de cellules : tiges ou batonnets, cocci, plates, triangulaires, en forme de trapèze, à des cellules extrêmement pleomorphes (fig 4) (Oren, 2006).

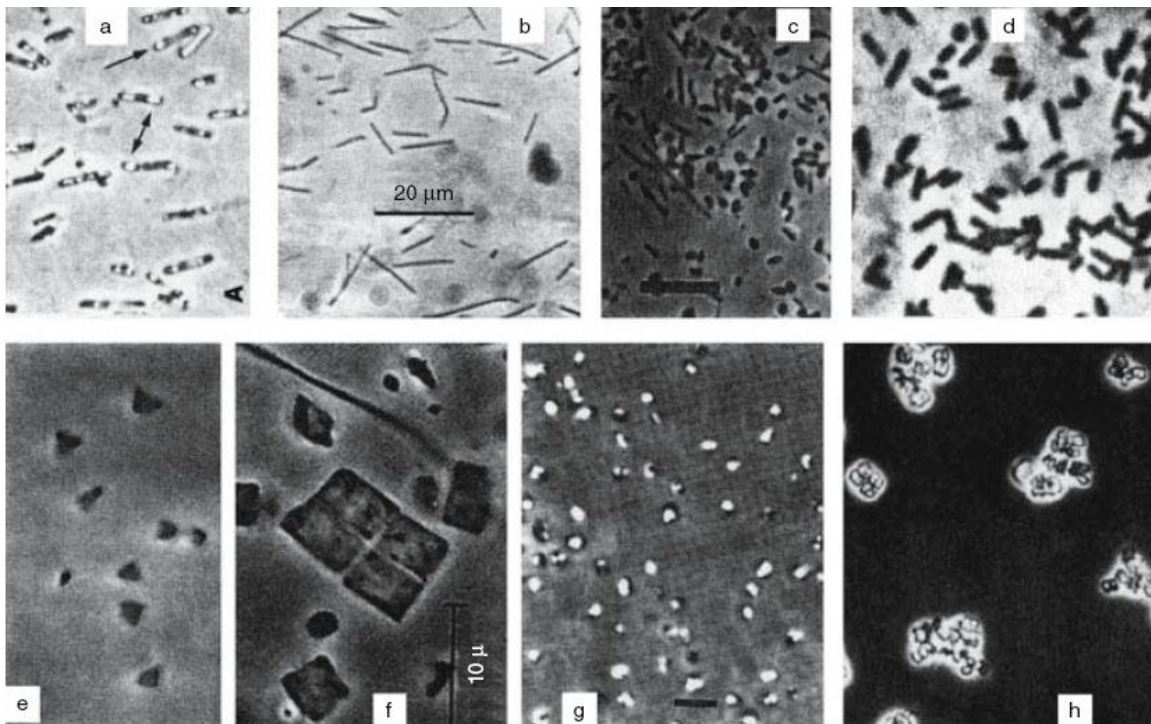


Figure 4 : différentes morphologies des cellules des *Halobacteriales* (microscopie à contraste de phase) : *Halobacterium salinarum* (a), *Natronobacteriumgregoryi* (b), *Halorubrum lacusprofundi* (c), *Natronomonas pharaonis* (d), *Haloarcula japonica* (e), Organisme de Walsby, cellule carrée (f), *Halogeometricum borinquense* (g), et *Natronococcus occultus* (h). Des vésicules de gaz sont visibles en (a) et (g) (Oren, 2006 in Falkow *et al.*, 2006).

La classification des espèces de la famille *Halobacteriaceae* est basée actuellement sur une approche polyphasique qui inclut une évaluation des propriétés telle que : la morphologie des cellules, caractéristiques de la croissance, traits chimiotaxonomiques (notamment la présence ou l'absence des lipides polaires spécifiques) et les données des séquences des acides nucléiques (Oren, 2006).

II. Les bactéries halophiles

Ce domaine comprend des bactéries halophiles modérées plutôt qu'extrêmes. Celles-ci croissent optimalement dans les milieux contenant une concentration en NaCl de 3 à 15% (Ventosa *et al.*, 2007 in Dion et Nautiyal, 2007; Cinerman *et al.*, 2006; Rodriguez-Valera, 2012; Ventosa in logan *et al.*, 2006). Ces bactéries halophiles modérées sont retrouvées dans 5 phylum : *Cyanobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes*, *Bacteroidetes* (Mcgenity et Oren in Bell, 2012).

Des bactéries halophiles anaerobies modérées sont représentées dans la figure 5. Elles appartiennent à l'ordre haloanaerobiales qui comprend deux familles *Halobacteroidaceae* et *Haloanaerobiaceae*. Cet ordre appartient à le phylum *Bacteroidetes* (Oren, 2006 in Falkow *et al.*, 2006, Oren 2010 in Horikoshi *et al.*, 2010). Des bactéries halophiles sulfato-reductrices telles que *Desulfovibrio* et *Desulfobacter* (fig. 6) appartiennent au phylum *Proteobacteria*. Quant au genre *Desulfatodulum*, il appartient aux *Firmicutes* (fig. 6) (Tardy-Jacquenod *et al.*, 1998; Seckbach, 2012).

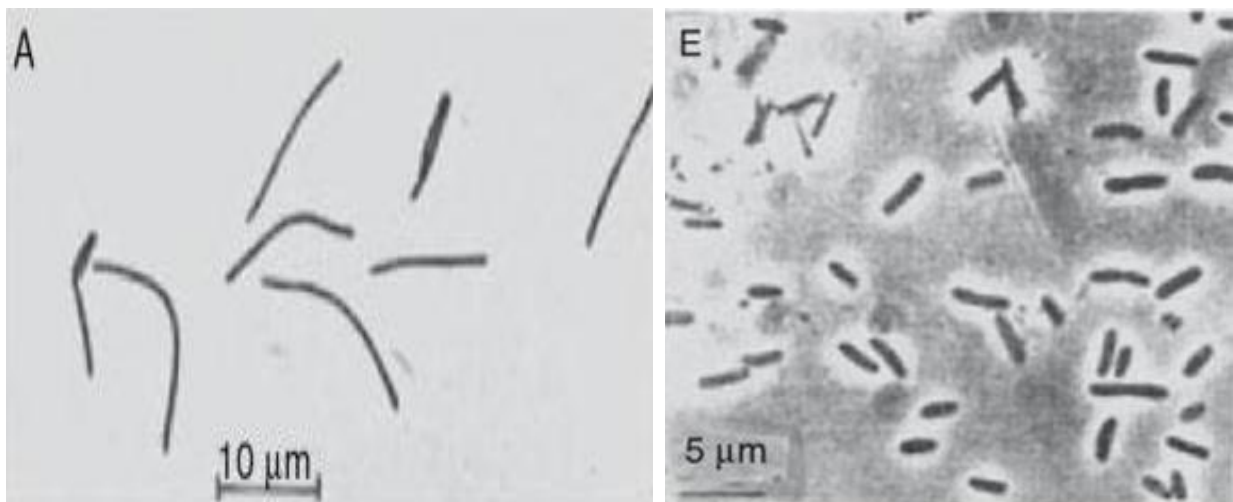


Figure 5: Microscopie à contraste de phase des membres de *Haloanaerobiales*, E (*Haloanaerobium alcaliphilum*) et A (*Halobacteroides halobius*) (Oren, 2006 in Falkow *et al.*, 2006)

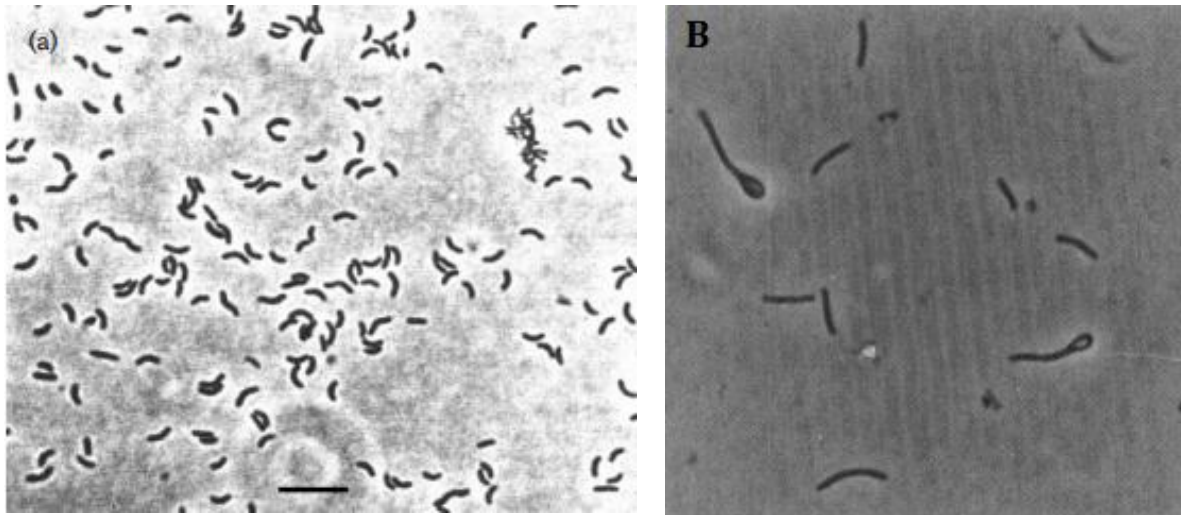


Figure 6: microscopie à phase contraste, (a) *Desulfovibrio gracilis* (Magot *et al.*, 2004); (B) *Desulfotomaculum halophilum* (Tardy-Jacquenod *et al.*, 1998)

Les bactéries halophiles modérées constituent un groupe physiologique hétérogène (fig.7). Ce groupe comprend des bactéries à Gram positif (*Halobacillus halophilus*) et des bactéries à Gram négatif (*Halomonas elongata*) (Ventosa *et al.*, in Cinerman *et al.*, 2006 ; Kanekar *et al.*, in Satyanarayana *et al.*, 2012).

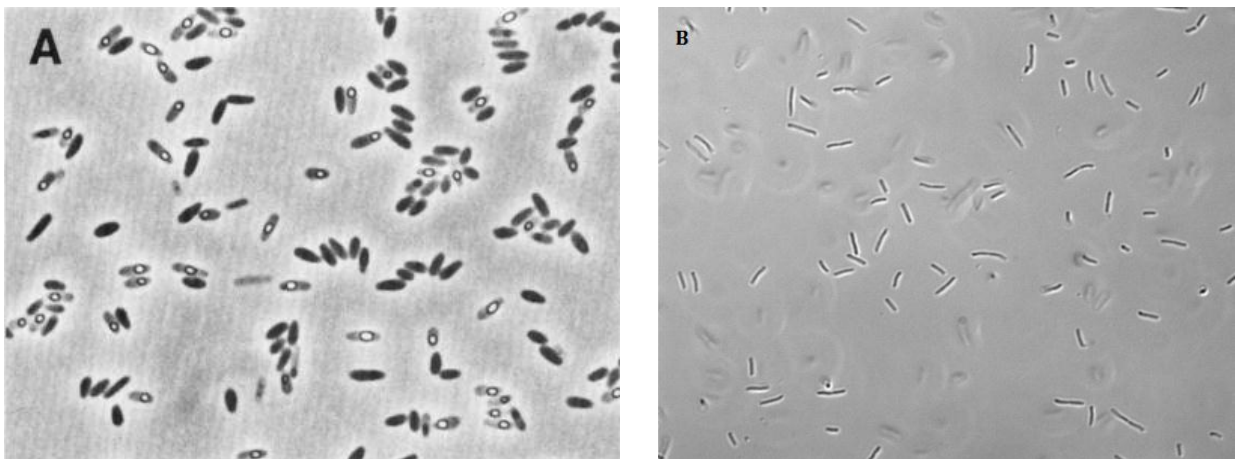


Figure 7: Microscopie à phase contraste de (A) *Halobacillus halophilus* (Ventosa *et al.*, 1996); image microscopique à lumière de (B) *Chromohalobacter salexigens* (Copeland *et al.*, 2011).

Ce groupe compte également des bactéries photosynthétiques halophiles et halotolérantes comme les cyanobactéries. Celles-ci ont été isolées de la surface de sédiments de milieux hypersalés et y forment une couche brune (Seckbach, 2007).

On compte également dans le domaine Bacteria, des bactéries phototrophes généralement trouvées en dessous des cyanobactéries, dans des zones anaérobies formant des tapis microbiens, tels que les genres : *Chromatium*, *Thiocapsa*, *Rhodospirillum* et *Ectothiorhodospira* (phylum *Proteobacteria*), *Chlorobium* (*Chlorobi*), *Chloroflex* (*Chloroflexi*). En outre, parmi les bactéries halophiles nous comptons des bactéries gram négatif hétérotrophes aérobies appartenant au phylum des Proteobactéries, à l'instar de: *Halomonas*, *Acinetobacter*, *Alteromonas*, *Marinomonas* et *Pseudomonas* (Le Borgne *et al.*, 2008).

On a décrit également quelques bactéries halophiles extrêmes, faisant partie des espèces phototrophes telles que les cyanobactéries, et la nouvelle bactérie *Salinibacter ruber* (fig.8) appartenant au phylum *Bacteroidetes* (Rodriguez-Valera, 2012 ; Ventosa *et al.*, 2011 ; Anton *et al.*, in Cinerman *et al.*, 2006).

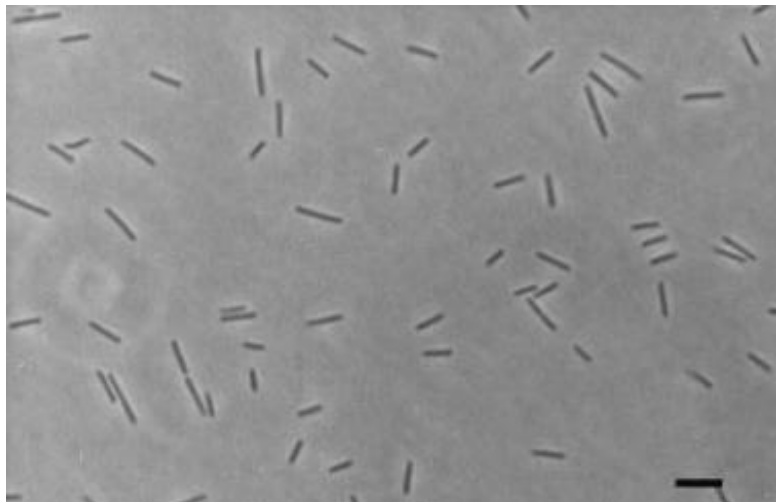


Figure 8: Microscopie à phase contraste de *Salinibacter ruber* (Rodriguez-valera *et al.*, 2002)

III. Eucaryotes halophiles

Dans le domaine Eucarya, les halophiles sont plus rares. Leur principal représentant est l'algue verte unicellulaire *Dunaliella*. Celle-ci est halotolérante plutôt que strictement halophile. Ce genre comprend des espèces halophiles modérées : *D. viridis*, *D. Parva* et une espèce halophile extrême : *D. salina*. *Dunaliella* est une algue qui produit de la β -carotène, ce pigment est responsable de la couleur orange (fig 9) des saumures et dont les propriétés sont exploitées en biotechnologie (Seckbach, 2007).



Figuer 9: Lac Urmia, environnement hypersalin en Iran sa couleur rouge-orange est due par la production de la beta-carotène par les algues *Dunaliella* (Rad *et al.*, 2011)

Parmi les eucaryotes halophiles, on peut aussi citer le crustacé *Artemia*. Les champignons contiennent également un certain nombre de représentants halophiles, faibles et modérés tels que : *Cladosporium*, *Aspergillus* et *Penicillium*, ainsi que quelques levures : *Rhodotorula*, *Pichia*, *Hortaea*, *Phaeotheca* et *Aureobasidium* (Kharroub, 2007).

C. Adaptation des halophiles dans les environnements hypersalins :

Les membranes biologiques sont perméables à l'eau donc dans un environnement hypersalin, les microorganismes non halophiles vont perdre l'eau ce qui donne un cytoplasme très concentré dans lequel protéines, acides nucléiques et d'autres macromolécules perdent leur structure et leur fonction (Mcgenity et Oren, 2012 *in* Bell, 2012). Le fait que le cytoplasme des micro-organismes halophiles soit isotonique avec le milieu environnant est une propriété de base des halophiles. L'intégrité de ces derniers en milieu salin exige le maintien d'un équilibre osmotique entre le cytoplasme et le milieu environnant (Oren, 2008).

Les microorganismes halophiles ont développé des mécanismes spéciaux afin de s'adapter à l'environnement hypersalin en résistant au forte teneur de sels, la déshydratation, le stress osmotique et la faible activité d'eau; ces mécanismes sont deux stratégies fondamentalement différentes pour assurer les fonctions de leurs protéines et leurs cellules (Ventosa *et al.*, 2006 *in* Cimermane *et al.*, 2006).

1. Régulation de la pression osmotique

a. Première stratégie : accumulation du KCL

De fortes concentrations de sel (NaCl) dans le milieu environnant entraînent la mort cellulaire suite au phénomène d'osmose. Pour compenser la pression osmotique du milieu hypersalin environnant, les microorganismes halophiles accumulent essentiellement du chlorure de potassium (KCl) pour empêcher la sortie d'eau. (Oren, 2008; Oren, 2013, Ventosa *et al.*, 2011; Kunt *in* Cimermane *et al.*, 2006; Ventosa *et al.*, 2006 *in* Cimermane *et al.*, 2006; Bolhuis *et al.*, *in* Siddiqui et Thomas, 2008; Oren, 2001 *in* Melack *et al.*, 2013; Parmar et Singh, 2013; Oren *in* Horikoshi *et al.*, 2010; Oren, 2002 *in* Läuchli et Lüttge, 2007; Stan-Lotte *et al.*, 2013).

Cette stratégie est adoptée par les archées aérobies halophiles extrêmes de l'ordre *Halobacteriales*, par des bactéries halophiles extrêmes comme *Salinibacter ruber*, et par les bactéries halophiles anaérobies fermentatives *Haloanaerobiales* (fig. 10) (Oren, 2008; Oren, 2013, Ventosa *et al.*, 2011; Kunt *in* Cimermane *et al.*, 2006; Ventosa *et al.*, 2006 *in* Cimermane *et al.*, 2006; Bolhuis *et al.*, *in* Siddiqui et Thomas, 2008; Oren, 2001 *in* Melack *et al.*, 2013; Parmar et Singh, 2013; Oren *in* Horikoshi *et al.*, 2010; Oren, 2002 *in* Läuchli et Lüttge, 2007; Stan-Lotter *et al.*, 2013).

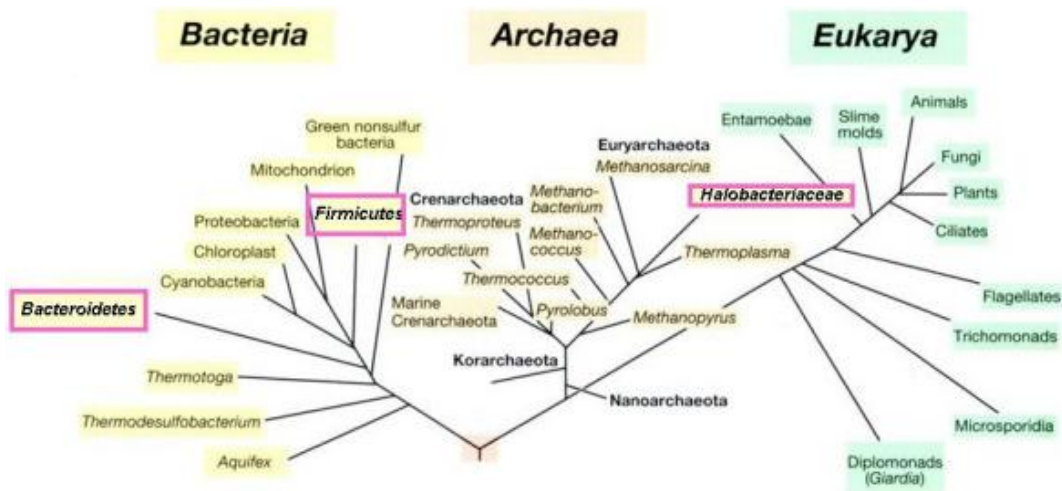


Figure 10 : Distribution des microorganismes halophiles qui accumulent le KCL en tant que stratégie d'adaptation dans le monde vivant (encadrés) (Oren, 2008).

b. Deuxième stratégie : accumulation de solutés compatibles (fig. 6)

Cette stratégie consiste à exclure le NaCl du cytoplasme, et à accumuler ou produire des solutés organiques pour assurer l'équilibre osmotique (Gragaud, 2011; Ventosa *et al.*, 2006 in Cimermane *et al.*, 2006). Ces solutés compatibles sont des molécules organiques de faible poids moléculaire et solubles (Severin et Stal, 2010 in Seckbach et Oren, 2011). Cette stratégie (fig 11) est rencontrée chez les halotolérants et les halophiles modérés, membres des domaines *Bacteria* et *Eucarya* et des archaea halophiles méthanogènes (Horikoshi *et al.*, 2010; Oren, 1998, Siddiqui et Thomas, 2008).

Il existe une large variété de solutés compatibles : le glycérol, les sucres, la glycine bêtaïne, l'éctoïne, les sucres simples, etc (Oren, 2008; Oren, 2013, Ventosa *et al.*, 2011; Kunt in Cimermane *et al.*, 2006; Ventosa *et al.*, 2006 in Cimermane *et al.*, 2006; Bolhuis *et al.*, in Siddiqui et Thomas, 2008; Oren, 2001 in Melack *et al.*, 2013; Parmar et Singh, 2013; Oren in Horikoshi *et al.*, 2010; Oren, 2002 in Läuchli et Lüttge, 2007; Ventosa in Logan *et al.*, 2006; Roberts, 2005).

Les osmoprotecteurs les plus prédominants dans le domaine des *Bacteria* pour les halophiles sont l'éctoïne et la glycine-bétaïne (Kunt *et al.*, 2012 in Horneck)

- L'éctoïne est le principal soluté compatible synthétisé par une grande variété de microorganismes halophiles et halotolérants comme les cyanobactéries, les bactéries aérobies hétérotrophes et les *Archaea* méthanogènes (Oren, 2008; Oren, 2013; Melack *et al.*, 2013; Parmar et Singh, 2013; Kunt *et al.*, 2012 in Horneck et Baumstark-Kha, 2012, Horikoshi *et al.*, 2010; Oren, 2002 in Läuchli et Lüttge, 2007).
- Quant à la glycine-bétaïne, celle-ci est synthétisée exclusivement par des procaryotes photosynthétiques comme les cyanobactéries, et accumulée à partir du milieu par des bactéries hétérotrophes (Oren, 2008; Oren, 2013; Melack *et al.*, 2013; Parmar et Singh, 2013; Kunt *et al.*, 2012 in Horneck et Baumstark-Kha, 2012, Horikoshi *et al.*, 2010; Oren, 2002 in Läuchli et Lüttge, 2007; Stan-Lotter *et al.*, 2013).

- En revanche les microorganismes eucaryotes halotolérants ou modérés, tels que les algues *Dunaliella*, les levures et les champignons, accumulent généralement le Glycérol comme soluté compatible (Wharton, 2002; Kunte, 2004 in Ventosa, 2013).

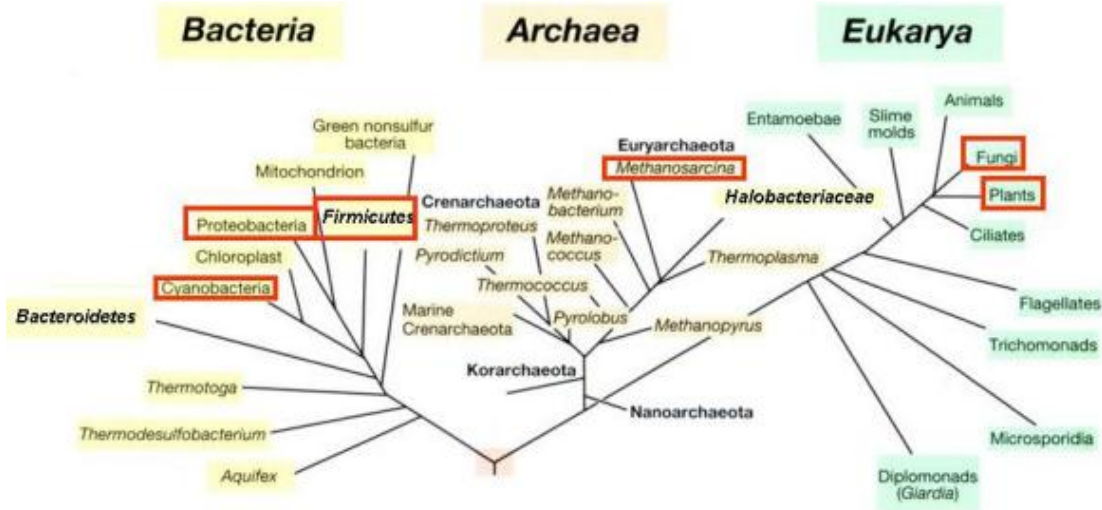


Figure 11 : Distribution des microorganismes halophiles qui accumulent les solutés organiques compatibles dans le monde du vivant (encadrés) (Oren, 2008)

D. Domaines d'application des halophiles

Les applications des microorganismes halophiles sont variées et représentent d'importantes opportunités commerciales. Ces organismes trouvent leur intérêt dans l'industrie chimique de biocarburants, l'industrie médicale et pédagogique, ainsi que des applications dans l'environnement (Dassarma *et al.*, 2010).

Les halophiles représentent une source potentielle de nouvelles molécules actives et stables dans des conditions extrêmes : antibiotiques, bactériocines, et enzymes. Ces dernières incluent des membres producteurs de cellulases, d'amylases, de xylanases, de protéases et de lipases. La plupart des producteurs halophiles d'hydrolases ont été assignés à la famille des *Halomonadaceae* (De la Haba *et al.*, in Ventosa *et al.*, 2011).

La bactériorhodopsine est produite par *Halobacterium salinarum*, et est utilisée pour la fabrication de biopuces pour la nouvelle génération d'ordinateurs. Les osmorégulateurs comme l'éctoine produit par *Halomonas elongata*, protège la peau des altérations causées par les rayonnements UV, d'où son incorporation dans la préparation de certaines crèmes hydratantes.

Quant à la bêta-carotène, elle est essentiellement produite par des microalgues halophiles du genre *Dunaliella*. Elle qui est en demande élevée en tant qu'antioxydant, comme source de la provitamine A et comme agent de coloration d'aliments (Gupta, 2015; Dassarma *et al*, 2010; Mishra, 2009; Oren, 2006, Vreeland, 2012).

Les halobactéries peuvent être des agents dépolluants. En effet, certaines archaea halophiles appartenant au genre *Haloferax* et *Haloarcula* utilisent les hydrocarbures, tels que le pétrole, comme source de carbone (Cuadros-Orellana *et al*, 2012; Tapilatu *et al*, 2010; Le Borgne *et al*, 2008).

L'utilisation la plus intéressante des microorganismes halophiles est le clonage des gènes codant pour les solutés osmorégulateurs. Ceci est réalisé afin d'augmenter la tolérance de certaines plantes au sel dans les sols salés. Aussi, les halophiles sont une source de polymères tels que les biosurfactants (Dassarma *et al*, 2010)

Matériel et méthodes

I. Sites d'étude et échantillonnage**1. Les sites de l'étude**

L'Algérie compte plusieurs milieux hypersalins, dont plusieurs sont situés en zones arides et semi-arides. Notre étude a été effectuée sur trois habitats hypersalé, deux sebkhas (zone 1, zone 2) dans la wilaya de djelfa et sebkha (zone 3) au niveau de la wilaya de laghouat. Les coordonnées des cites sont décrit dans le tableau 3 :

Tableau 2 : Situation géographiques des zones étudiées

Code du site	Wilaya	Situation géographique	Latitude	Longitude
Zone 1 (ZC)	Djelfa	Nord-est de djelfa	35.23333	3.53333
Zone 2 (RS)	Djelfa	Nord de djelfa	34.83333	3.08333
Zone 3 (KM)	Laghouat	Ouest de laghouat	33.6500	1.8500

2. Prélèvement des échantillons de sol

A l'aide d'une spatule stérile, nous avons effectué des prélèvements de sol à une profondeur de 5 cm :

- Le 08/11/2014, deux échantillons, de sol ZC1 et ZC2, ont été prélevés à partir de la zone 1 (fig.12). Ces derniers ont été récupérés dans des flacons en verre stériles. La distance les deux sites échantillonnés est de 2 Km.



Figure 12 : Photos de la sebkha de la zone 1.

- Pour la zone 2(fig.13), un échantillon de sol a été prélevé et récupéré dans un flacon stérile le 8/12/2014, échantillon nommé RS. Un autre échantillon de sol fut collecté 08/03/2015, appelé RS1.



Figure 13 : Photos de la sebkha de la zone 2.

- 5 litres d'eau salée ont été prélevés le 8 Mars 2015 de la zone 2. Cet échantillon d'eau a été appelé RSE.

- Pour la zone 3 (fig.14), un prélèvement d'un échantillon de sol, KM2, a été effectué le 16/12/2014. L'étude a porté sur deux autres échantillons de sol prélevés antérieurement, KM et KM1, à des sites différents et distants de celui du KM2. Ces échantillons ont été collectés le 2 Mars 2014 et le 24 Mai 2014, respectivement.



Figure 14 : Photos de la sebkha de la zone 3.

Les échantillons ont été conservé à 4°C dès leur arrivé au laboratoire, en attendant leur traitement. Les échantillons doivent êtreensemencés dans les 48h qui suivent leur collecte afin d'éviter la perte des microorganismes susceptibles d'y exister.

II. Etude des paramètres physico-chimiques de l'eau

L'étude physico-chimique de l'eau RSE de la zone 2 a été effectuée au niveau de la HCDS Haut Commissariat au Développement de la Steppe à Djelfa.

1. pH et température

Le pH et la température des sites ont été mesurés *in-situ* à l'aide d'un papier pH et d'un thermomètre à mercure.

2. Dosage de calcium et Magnésium

Ajouter à l'échantillon à analyser 3 ml de solution d'hydroxyde de sodium puis quelques gouttes de solution de bleu de d'ériochrome. Verser la quantité nécessaire d'EDTA pour le virage de couleur au violet. Noter cette quantité V1. Ajouter 3.2 ml d'acide chlorhydrique et agiter durant 1 minute jusqu'à parfaite dissolution de précipité magnésium. Verser 5 ml de la solution tampon et une goutte de solution de noir d'ériochrome. Bien mélanger. Mettre la quantité d'EDTA nécessaire au virage au bleu V2.

Les résultats sont exprimé en ces deux formules :

$$\text{Le Ca}^{2+} = (\text{mg/litre}) = V1 \times 0,4008 \times 1000 / 50$$

$$\text{Le Mg}^{2+} (\text{mg/litre}) = V2 \times 0,243 \times 1000 / 50$$

3. Titre alcalimétrique : HCO³⁻

Prélever 20 ml de l'échantillon et la transférer dans erlen de 200ml , on y ajoute 0,2 ml de l'indicateur rouge de crésol-bleu de thymol, on introduit d'autre part dans Erlenmeyere une volume de la solution tampon (pH 8,4) qui est égal au volum prélevé de l'échantillon on titre l'échantillon avec l'acide chlorhydrique jusqu'à ce que la coloration de la solution soit comparable à celle du tampon, on note enfin le volume de l'acide employé.

Le calcul du HCO³⁻ :

$$\text{HCO}^{3-} = 40 \times T / V$$

V : volume (ml) de l'échantillon.

T : volume (ml) de l'acide chlorhydrique.

4. Dosage des chlorures:

100 ml d'échantillon est versé dans un bécher de 200 ml, on ajoute 25 ml de solution de nitrate de potassium assembler la cellule de titrage et connecter les différentes électrodes. Commencer l'agitation magnétique, mesurer le potentiel de l'électrode indicatrice Ag/AgCl. Fermer le circuit d'électrolyse, l'anode en argent étant connecté à la borne + et le cathode en platine à la borne -. Suivre l'évolution du potentiel de l'électrode indicatrice aux approches du point équivalent, arrêter le courant d'électrolyse et mesurer le potentiel de l'électrode indicatrice.

Les résultats sont donnés en milligrammes de Chlore par litre

5. Dosage des sulfates

Introduire 100 ml d'échantillon dans un bécher, ajouter 5 ml d'acide chlorhydrique, chauffer jusqu'à ébullition en agitant. Faire tomber goutte à goutte de

chlorure de baryum. Prolonger l'ébullition, laisser reposer. S'assurer que la précipitation est complète en ajoutant quelque gouttes chlorure de baryum. Laver le précipité de l'eau puis une encore fois à l'alcool puis à l'éther. Laisser reposer 5 minutes. Ajouter 2 à 3 gouttes d'acide nitrique de préférence dans un bain marie. Laisser refroidir puis peser le poids (P). (Rodier, 1994)

$$SO_4^- \text{ mg/litre} = P \times 10 \times 0,41600$$

III. Isolement

1. Etape de pré-culture

a. Traitement de l'échantillon de sol

Afin d'isoler les cellules halophiles extrêmes à partir des échantillons de sol, nous avons suivi le protocole expérimental suivant :

- Environ 10g de l'échantillon de sol a été suspendu dans 250ml à 300ml d'un milieu d'enrichissement liquide stérile (voir annexe). La concentration en NaCl du milieu liquide est de 20%;
- La culture liquide a été incubée, à 30°C, pour une période allant de 7 à 15 jours. L'apparition d'un trouble apparent et important correspond à une croissance microbienne ;

b. Traitement de l'échantillon d'eau

Afin d'isoler les microorganismes halophiles extrêmes à partir de l'échantillon d'eau, le protocole expérimental suivant a été suivi :

- Après désinfection du système de filtration (fig. 12), nous avons déposé la membrane filtrante stérile de 0,45 µm de diamètre à l'aide d'une pince stérile dans le récipient cylindrique en inox préalablement stérilisé. Nous avons revissé le récipient supérieur pour assurer de l'étanchéité du système ;
- Par la suite, dans la zone d'asepsie, l'eau salée est versée directement dans le récipient supérieur dont le volume est de 500 ml ;



Figure 15 : appareil de filtration de membrane (A : pompe à vide, B recipient en inox de 600ml, C : Erlen de récupération de l'eau filtré)

- L'aspiration de l'eau salée et son passage à travers le filtre est assurée par une pompe à vide manuelle branchée au récipient qui récupère le filtrat ;
- Les 5 l d'eau salées ont été filtrée à travers 3 membranes.
- Une fois l'étape de filtration terminée, les membranes millipores ont été transférées aseptiquement dans le milieu d'enrichissement liquide stérile.

Ce milieu a été préparé à l'aide de l'eau salée naturelle prélevée sur le site étudiée, à laquelle ont été ajoutés des composés organiques (voir annexe).

2. Mise en culture, isolement et purification

Une fois l'étape de préculture achevée, chaque échantillon a été ensemencé en masse sur 4 milieux de culture (voir annexe) :

- Milieu Payne, Seghal, et Gibbons avec 25% de NaCl.
- Milieu spécial pour *archaeae* halophiles avec 20% de NaCl ;
- Milieu naturel des halophiles.
- Gélose nutritive avec 20% de NaCl.

Avec leurs concentrations élevées en magnésium, le milieu Payne, Seghal, et Gibbons et le milieu spécial pour *Archaea* halophiles sont des milieux favorisant la croissance des archées à celle des bactéries. La gélose nutritive quant à elle offrirait un milieu favorable pour les bactéries.

Nous avons utilisé le milieu naturel afin de pouvoir isoler les procaryotes halophiles qui ne peuvent pas se développer sur les autres milieux, et ce en leur reproduisant les mêmes conditions nutritionnels retrouvées dans leur milieu naturel.

Une fois les gélosesensemencées, les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 10 à 15 jours pour tous les milieux. Seul le milieu MNA a été retiré de l'incubation dès l'observation d'une croissance importante, nous les avons retirées de l'incubateur.

Après une analyse macroscopique des différents types de colonies obtenues, une purification, par la technique des quatre quadrants, a été effectuée sur les milieux adéquats afin d'obtenir des cultures pures.

3. Identification phénotypique des isolats

a. Etudes des Caractères cultureux des colonies

Afin de pouvoir distinguer entre les différents types de colonies, nous avons procédé, à l'aide d'une loupe binoculaire, à une étude morphologique des colonies pures isolées sur tous les milieux de cultures utilisées. L'étude des caractères cultureux a porté sur les critères suivants :

- i.** Le contour de la colonie ;
- ii.** L'aspect du relief ;
- iii.** La taille ;
- iv.** La consistance ;
- v.** La transparence ;
- vi.** La couleur et la pigmentation.

b. Observation microscopique des cellules

L'analyse microscopique nous a permis de déterminer la morphologie des cellules et leur type de gram.

On a réalisé la coloration de Gram afin de déterminer le gram et la forme. Les étapes suivies sont :

- I. Préparation du frottis et sa fixation ;
- II. Coloration de base au violet de Gentiane pour une minute.

- III. Rinçage, suivi du mordantage au lugol pour une minute et demie, puis on rince la lame soigneusement ;
- IV. Couvrir la lame de l'éthanol absolu, et laisser agir pendant 30 secondes.
- V. Rincer et puis recouvrir la lame de fushine pendant une minute, pour la coloration de contraste.
- VI. Après le rinçage de la lame et séchage, on est passé à l'observation microscopique avec une goutte d'huile à immersion, au grossissement x100.

c. Analyse phylogénétique de quelques isolats

Quelques isolats halophiles ont subi une analyse phylogénétique. Celle-ci a été réalisée sous la supervision de l'équipe du professeur Antonio Ventosa, à la faculté de pharmacie, Université de Séville, Espagne.

L'identification des gènes des ARNr 16 S a été effectuée selon les étapes qui suivent :

- i. Les cellules sont soumises à un choc thermique afin de les lyser et en extraire l'ADN génomique total ;
- ii. Amplification des gènes de l'ARNr 16S par PCR à l'aide de séquences nucléotidiques spécifiques comme amorces ;
- iii. Séquençages des gènes amplifiés ;
- iv. Analyse et identification des gènes à l'aide de la banque de données d'EzTaxon, du site : www.ezbiocloud.net.

Résultats et discussion

I. Résultats de l'Analyse physico-chimique de l'échantillon d'eau RSE

1. pH et température

Le Tableau (3) regroupe les valeurs des températures et du pH enregistrées *in situ* lors des prélèvements des échantillons effectués pendant deux saisons humides et sèches.

Tableau 3 : les valeurs de pH et température des sites

Site	Échantillon	T°	pH
Zone 1	ZG1/ ZG2	16°C	6-7
Zone2	RS/RS2/RSE	11°C	6-7
Zone 3	KM et KM1	25°C	6-7
	KM2	18 °C	

D'après ces résultats, le pH des milieux hypersalins étudiés est relativement neutre. D'après Schneegurt (2012), la plus part des travaux sur les microorganismes halophiles et halotolerants sont effectués en conditions d'aérobie et a pH neutre. La majorité de ces microorganismes prolifèrent parfaitement a pH voisin de la neutralité et leurs nombre diminu lorsque le pH varie de la neutralité (Purohit *et al.*, 2013).

Une température plus basse (11°C) a été enregistré dans la zone (2) tandis qu'elle est élevée (25°C) dans la zone (3). Les valeurs de pH nous ont permis de déterminer le pH à utiliser lors de la préparation des milieux de cultures pour l'étude microbiologique afin de reproduire au mieux les conditions naturelles de croissance pour les microorganismes.

2. Composition chimique de l'eau de la zone (2)

La composition chimique de l'eau salée prélevée à partir de la zone (2), et qui a été utilisée pour la préapration dumilieu de culture pour l'isolementdes halophiles,est indiquée dans le tableau (4). Ces valeurs sont rapportées en comparaison à la composition chimique du Lac Sidi Ameur situé dans la region de Bousaada de la Wilaya de M'sila (Boutaiba *et al.*, 2011).

En comparant nos résultats à ceux de l'étude conduite par (Boutaiba *et al.*, 2011) sur le lac de Sidi Ameer, nous remarquons que ce dernier est plus riche en carbonate et en sulfate que l'eau de la zone (2). Par contre, celle-ci est plus riche en Chlore, calcium et en magnésium.

Tableau 4 : Analyse chimique de l'échantillon d'eau RSE et lac sidi Ameer

Elément/composé chimique	Composition chimique de l'eau de la zone 2 g/l	Composition chimique de l'eau Lac sidi Ameer g/l
Cl ⁻	186,73	111
SO ₄ ⁻²	0,00391	2.01
HCO ₃ ⁻	0,002	0,19
Ca ⁺²	1,2008	0,51
Mg ⁺²	7,30992	3

II. Résultats de l'étude microbiologique

1. Etude morphologique des colonies

Après isolement et purification, 88 souches ont été purifiées à partir de l'ensemble des échantillons de sol et d'eau. Nous avons fait l'étude des six caractères morphologiques des colonies, comme cité dans le chapitre matériels et méthodes, après 15 jours d'incubation. Nous avons sélectionné les morphologies les plus rencontrées. Celles-ci sont citées dans les tableaux 5, 6, 7 et 8 par rapport aux milieux sur lesquels les colonies ont été cultivées.

Sur gélose nutritive (GN) à 20%, (tableau 5), nous avons rencontré un seul type de colonie. Celles-ci sont toutes blanchâtre, crémeuses, non visqueuses. Leur surface est lisse. Le seul paramètre qui variait parmi les colonies des isolats était la transparence.

Tableau 5 : Morphologies des colonies isolées sur GN à 20%

Zone	Echantillon	Nombre d'isolats	Forme	Transparence
1	Sol	2	Bombé	Opaque
2	Sol	8	Bombé	Translucide
	Eau	3		
3	Sol	7	Convexe	Translucide

Sur le Milieu naturelle des halophiles (MNH), nous avons rencontré des colonies opaques, crémeuses et non visqueuses. Le résumé de leurs morphologies est rapporté dans le tableau (6).

Tableau 6 : Morphologies des colonies isolées sur le MNH

Zone	Echantillon	Nombre d'isolats	Forme	Aspet de la surface	Couleur
2	Sol	12	Convexe avec un centre oblique	lisse	Beige clair
	Eau	6			
3	Sol	5	En cratère Régulier	Rugueuse	Blanchatre

Sur le milieu spécifique pour les archées halophiles (MSH), nous avons isolé cinq différents types de colonies qui ont toutes un aspect de surface lisse (tableau 7).

Tableau 7 : Morphologies des colonies isolées sur le MSH

Zone	Echantillon	Nombre D'isolats	Forme	Couleur	Transparence	Consistance
1	Sol	9	Bombée	Rosatré	Opaque	CNV
		2	Convexe	Rouge Brique	Opaque	Filante
		1	Bombée	Blanchâtre	Opaque	CNV
2	Sol	5	Bombée	Blanchâtre	Translucide	CNV
		1	Convexe	Rouge	Translucide	CNV
		1	Convexe	Jaunâtre	Opaque	CNV
		1	Plate	Blanchâtre	Translucide	CNV
	Eau	3	Bombée	Blanchâtre	Opaque	CNV
3	Sol	8	Ponctiforme	Beige	Translucide	CNV

CNV : Crémeuse Non Visqueuse

Sur le milieu Payne, Seghal, et Gibbons (MG) à 25%, nous avons rencontré les caractères cultureux cités dans le tableau 8.

Tableau 8 : Morphologies des colonies isolées sur le MG

Zone	Echantillon	Nombre d'isolats	Forme	Couleur	Transparence	Consistance
3	Sol	3	Bombé	Blanchâtre	Opaque	CNV
		1	Plate	Beige	Opaque	CNV
		2	Convexe	Beige	Translucide	Sèche
		2	Bombé	Jaunâtre	Opaque	CNV
2	Sol	2	Convexe	Conexe	Opaque	CNV
	Eau	4				

CNV (crémeuse non visqueuse)

D'après nos résultats, nous remarquons que nous avons obtenu une faible diversité morphologique sur chaque milieu de culture à partir des différents échantillons étudiés. Cette variabilité pourrait être due au changement de composition chimique des milieux de culture.

Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par (Sanal, 1999). Cet auteur rapporte que l'aspect morphologique des microorganismes isolés dans le même milieu de culture est différent en élévation, bord et la taille. Ces microorganismes produisent une pigmentation crémeuse ayant une couleur jaune au rouge. La plus part des isolats ont également différentes formes, cocci, filamenteuse et batonnet.

2. Résultats de l'observation microscopique des isolats

Les résultats de l'observation microscopique des isolats et de la coloration de Gram sont représentés sur le tableau 9.

Tableau 9 : Forme cellulaire et type du Gram des Isolats.

zone	Echantillon	Forme	Gram	Nombre d'isolats
1	Sol	Coccobacille	Négatif	7
		Cocci	Positif	5
			Négatif	9
2	Sol	Cocci	Positif	8
			Négatif	4
		Coccobacille	Négatif	7
	Eau	Cocci	Négatif	7
		Coccobacille	Négatif	5
3	Sol	Cocci	Positif	7
			Négative	3
		Coccobacille	Négatif	26

Les résultats de l'observation microscopique indiquent qu'une grande partie de nos isolats sont des coccobacilles. Par ailleurs, les résultats de la coloration de Gram montrent que la majorité d'entre eux sont des cellules Gram négatif (Figure 16).

Dû au manque de moyens, nous avons été contraint de nous contenter de l'étude morphologique des colonies et de l'observation microscopique des celles après coloration de Gram. Une meilleure étude aurait nécessité :

- La recherche de la présence de capsule et de spore ;
- L'examen du métabolisme microbien de chaque isolat ;
- L'analyse des lipides typiques membranaires (Kharroub, 2007);
- L'étude de la sensibilité vis-à-vis des agents anti-microbiens ;

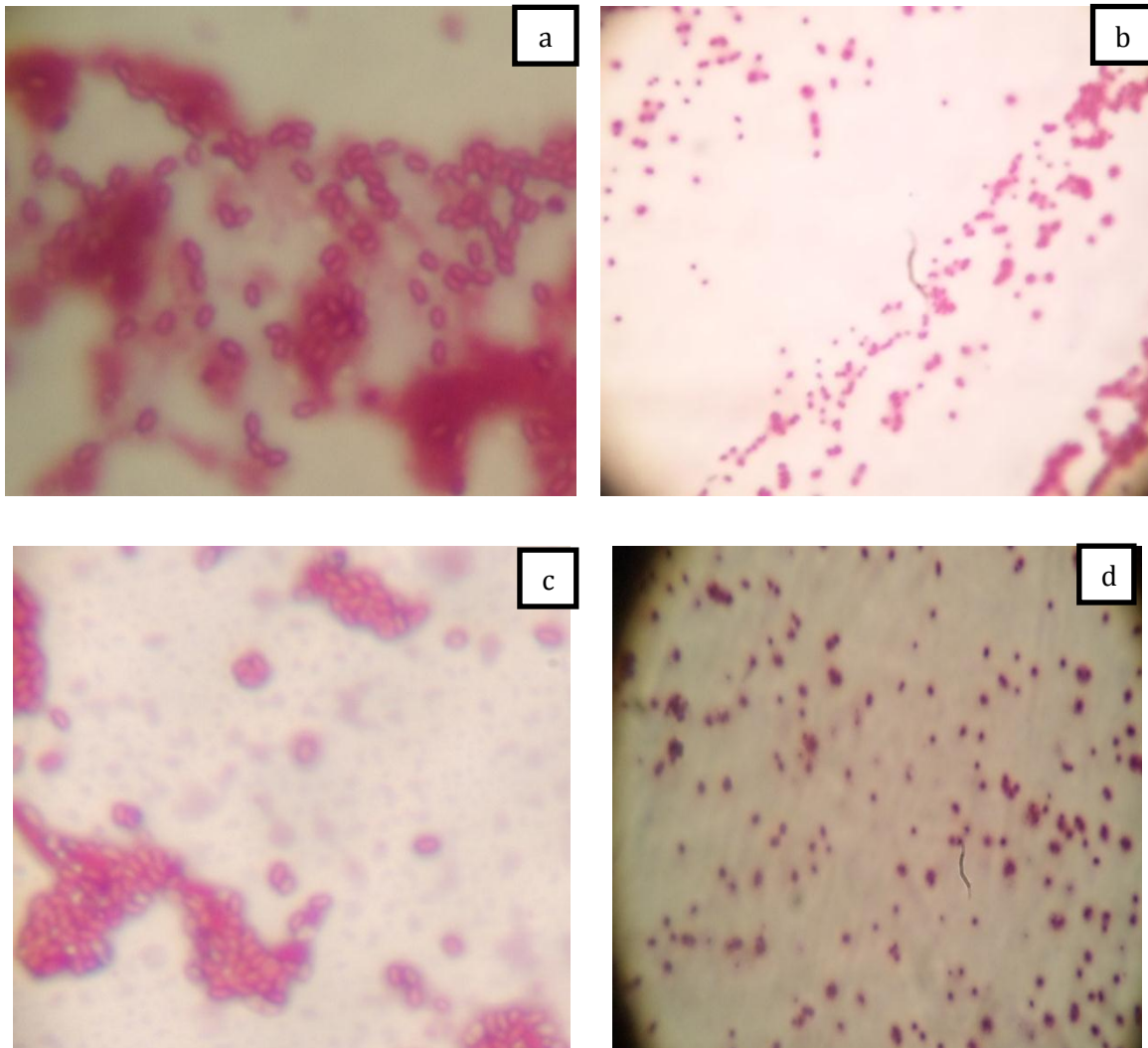


Figure 16 : Photographie d'une observation microscopique (Gx100) après coloration de Gram des isolats : (a) Souche ZC1-A, isolée de la Zone1, (b) Souche RS2-2, isolée de la Zone 2 ; (c) KM2-B isolé de la zone 3, (d) RS2-3 isolé de la zone 2

III. Identifications phylogénétique de quelques souches

L'ADN total de quelques isolats a été extrait, puis les gènes de l'ARNr 16S, dont la longueur est de 1500 paires de bases, ont été amplifiés par PCR. Les fragments d'ADN obtenus ont été séquencés, puis analysés et identifiés à l'aide de la banque de données d'EzTaxon, du site : www.ezbiocloud.net.

Les Résultats ainsi obtenus sont présentés dans le tableau (9).

Tableau 10 : Résultats de l'identification phylogénétique de quelques souches isolées à partir des échantillons de sol

Code de l'Isolat	Echantillon	Zone	Nom de l'espèce (EZ Taxon)	Pourcentage d'Homologie	Longueur de la séquence séquencée (pb)
KM-1	1	3	<i>Halomonas elongata</i> DSM 2581(T)	99.64%	857
KM1-5	2	3	<i>Halomonas elongata</i> DSM 2581(T)	100%	598
KM1-C	2	3	<i>Halomonas elongata</i> DSM 2581(T)	100%	349
KM2-C	3	3	<i>Halomonas elongata</i> DSM 2581(T)	99.07%	344
RS2-A	2	2	<i>Halomonas boliviensis</i> LC1 (T)	94.10%	507
ZC2- Z	2	1	<i>Chromohalobacter israelensis</i> ATCC43985 (T)	89.43%	649
KM2-7	3	3	<i>Halomonas elongata</i> DSM 2581(T)	100%	882

KM2-2	3	3	<i>Halomonas eurihalina</i> ATTC49336 (T)	84,13%	339
KM2-F	3	3	<i>Chromohalobacter israelensis</i> ATCC43985 (T)	100%	351
KM2-L	3	3	<i>Halomonas elongata</i> DSM 2581(T)	100%	534
RS2-1	2	2	<i>Halomonas elongata</i> DSM 2581(T)	99,33%	462
RS3-d	2	2	<i>Halomonas elongata</i> DSM 2581(T)	100%	359
ZC2-621	2	1	<i>Chromohalobacter israelensis</i> ATCC43985 (T)	100%	494

D'après les résultats de l'identification phylogénétique, les isolats appartiennent au phylum *Proteobacteria*, plus précisément à la famille *Halomonadaceae*, au genre *Halomonas* pour (*H.elongata*, *H.boliviensis*, *H. Eurihalina*)(Garrity *et al.*, 2005 in Garrity *et al.*, 2007) et au genre *Chromohalobacter*(*C. israelensis*)(Ventosa 2005 in Garrity *et al.*, 2007).

La majorité des souches du genre *Halomona* sont été isolées à partir de milieux hypersalins aquatiques que de sols hypersalins (Ventosa *et al.*, 2007 in Dion *et al.*, 2007). Les échantillons des sites étudiés sont riches également en genre *Halomonas*.

Nous avons pu, grâce aux résultats de l'étude morphologique et phylogénétique déterminer les différents types de colonies présentes au niveau des différents milieux de cultures ceci seulement pour les souches qui on montré une homologie supérieure à 97%.

Les *Halomonas* sont des halophiles, bacilles à gram négatif. Toutes ces espèces croissent dans toutes les concentrations en NaCl, de 0,2% à 25%, dépendant sur le milieu de culture utilisé. Les colonies formées par ces espèces ont une couleur blanche à jaune (Vreeland, 1997 in Balows *et al.*, 2013).

Les *Chromohalobacter* sont des bacilles à gram négatif. Ils ont une croissance optimale de 8% à 10% de NaCl, mais peuvent croître jusqu'à 30%. Les colonies formées par ces espèces ont une couleur crème à jaune (Ventosa, 2005 in Garrity *et al.*, 2007).

Les espèces appartenant à ces deux genres ont montré une variété des morphologies des colonies selon le milieu de culture utilisé dans notre étude :

✓ ***Halomonas elongata* DCM 2581 (T):**

Sur le milieu MSH sa colonie était ponctiforme, circulaire, régulière, translucide. Sa surface était lisse, brillante avec une couleur beige (KM1-5).

Par contre, sur GN, sa colonie est : convexe régulière, translucide, lisse, crémeuse non visqueuse et blanchâtre (KM-1).

Sur le milieu MG, sa colonie se présentait bombée, régulière, opaque au centre et contour translucide, lisse, crémeuse non visqueuse et blanchâtre (KM2-7).

✓ ***Halomonas boliviensis* LC1 (T):**

Sur le milieu MSH, la colonie de cette espèce était circulaire à contour régulier, bombée, à surface lisse, opaque, brillante, crémeuse visqueuse, de couleur blanchâtre (RS2-A).

✓ ***Halomonas eurihalina* ATTC4 9336 (T) :**

La colonie d'*Halomonas eurihalina* dans un milieu MSH a un aspect circulaire, punctiforme, lisse brillante translucide, rouge brique et à bord régulier.

Cette espèce a présenté une homologie de 84,13% avec la souche KM2-2. Cette valeur est inférieure au seuil de 97% qui est retenu pour définir le genre et l'espèce sur la base des séquences des gènes des ARNr 16S (Sobral, 2012). Ces gènes devront être séquencés à nouveau pour confirmer ou infirmer cette identification.

✓ ***Chromohalobacter israelensis* ATCC4 3985:**

Cette espèce présentait sur le milieu MG des colonies circulaires, régulières, lisses, beiges, plates à convexe (KM2-F).

Sur le milieu MSH cette colonie est punctiforme, régulière, bombée, circulaire, translucide, lisse, rosâtre (ZG1-6).

Les travaux de (Kharroub *et al.*, 2007) ont été effectués sur un environnement hypersalin, sebkha de Ezzemoul situé dans la région de Oum El-Bouaghi. Cette étude reposait sur l'identification moléculaire des archées et bactéries. Une nouvelle espèce archéenne a été isolée *Halorubrum ezzemoulense*, et une nouvelle espèce bactérienne *Salicola salis*.

Bien que nous n'ayons pas utilisé les mêmes milieux de cultures, les mêmes sites de prélèvement, et nous n'ayons pas suivi la même démarche expérimentale, nous n'ayons pas eu d'isoler des archées, ni des bactéries halophiles appartenant à d'autre phylum comme les *Firmicutes* ou les *Bactéroïdètes*...ect.

L'objectif de ce travail a été, en grande partie atteint, bien que certains paramètres et certaines techniques que nous avons aimé employer, n'aient pu être utilisés.

Conclusion

Les milieux salés situés dans les régions de Djelfa (Zone 1 et Zone 2) et de Laghouat (Zone 3), et qui ont fait l'objet de cette étude, constituent un milieu naturel vierge dont la diversité en microorganismes halophiles n'a pas été étudiée. L'objectif de ce travail était d'isoler le maximum de ces microorganismes et d'en identifier phylogénétiquement quelques isolats.

L'utilisation de 4 différents milieux de cultures avec des pourcentages différents en NaCl, nous ont permis d'isoler 88 isolats. Ces derniers ont été récupérés à partir des échantillons de sol et d'eau salée collectés au niveau des trois zones d'étude.

L'étude morphologique des colonies des 86 isolats nous a permis de constater une faible variabilité morphologique en utilisant le même milieu de culture. La morphologie pouvant changer d'un milieu à une autre pour la même espèce. Ceci dépendrait de la composition des milieux de culture. L'observation microscopique des isolats après coloration de Gram, nous a permis de constater que 39% d'isolats sont des coccobacilles à gram négatif, 17% sont des cocci à gram positif et 44% sont des cocci à gram négatif.

L'analyse phylogénétique nous a permis d'identifier les souches bactériennes suivantes :

- *Halomonas elongata*,
- *Halomonas boliviensis*
- *Chromohalobacter israelensis*.

Ces dernières sont des bacilles à gram négatif appartenant à la famille *Halomonadaceae*, au phylum *Proteobacteria*. Les gènes des ARNr 16S de ces isolats présentaient des homologies de séquences supérieures à 97%. Ainsi, leur affiliation taxonomique est certaine.

Les gènes des ARNr 16S de *Halomonas eurihalina*, isolée de la zone 3, et *Chromohalobacter israelensis* isolée de la zone 1, présentaient des taux d'homologie inférieurs au seuil établi pour définir une espèce, phylogénétiquement parlant. Ceci pourrait être dû à la longueur des gènes séquencés pour chaque isolat, 339 pb et 649 pb, respectivement. Sachant que le gène de cet ARN présente une longueur de 1500 pb, les longueurs des séquences étudiées peuvent être insuffisantes pour trancher avec certitude quant à l'appartenance taxonomique de ces isolats.

La qualité des séquences d'ADN après amplification par PCR peuvent également influencer les résultats. En effet, les séquences peuvent présenter certaines régions incomplètes, rendant ainsi une bonne identification difficile.

Afin de compléter ce travail, il serait judicieux d'envisager, notamment pour les isolats qui n'ont pas été identifiées:

- Etude des caractéristiques biochimiques des isolats ;
- Etude de leur profil de résistance aux agents antibactériens ;
- Identification phylogénétique des autres isolats ;
- Etude de leur intérêt biotechnologique.

***Références
bibliographiques***

- Anton, J., Oren, A., Benlloch, S., Rodriguez-Valera, F., Amann, R., et Rossello-Mora, R., 2002.** *Salinibacter ruber* gen. nov., sp. nov., a novel, extremely halophilic member of the Bacteria from saltern crystallizer ponds. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol 52, Pp485–491.
- Arora, R., Bell, E.M., 2012.** Biotechnological applications of extremophiles : Promise and prospects *in* Bell, E., 2012. *Life at Extremes: Environments, Organisms, and Strategies for Survival*. Pp554.
- Atlas, R.M., 2004.** *Handbook of Microbiological media*, 3rd ed.
- Ayad R, 2012.** Screening d'activités hydrolytiques extracellulaires chez des microorganismes halophiles aérobies isolés d'environnements hypersalins de l'Est algérien. Université Mentouri - Constantine.
- Bell, E.M., et Callaghan, T.V., 2012.** What are extreme environments and what lives in them? *in* Bell, E., 2012. *Life at Extremes: Environments, Organisms, and Strategies for Survival*. Pp554.
- Bolhuis, A., Kwan, D., et Thomas, J.R., 2008.** Halophilic adaptations of proteins *in* Siddiqui, K.S., et Thomas, T., 2008. *Protein adaptation in extremophiles*. Pp250.
- Bonete, M.J., et Martinez-Espinosa, R.M., 2011.** Enzymes from halophilic archaea : Open questions *in* Ventosa A, Oren A et Ma Y, 2011. *Halophiles and Hypersaline Environments: Current Research and Future Trends*. Pp387.
- Boutaiba S., Hacene H., Bidle K. A. and Maupin-Furlow J. A. 2011.** Microbial diversity of the hypersaline Sidi Ameur and Himalatt Salt Lakes of the Algerian Sahara. *J. Arid. Environ.*, 75: Pp909-916.
- Bowers K.J, Mesbah N.M et Wiegel J, 2009.** Biodiversity of poly-extremophilic *Bacteria*: Does combining the extremes of high salt, alkaline pH and elevated temperature approach a physico-chemical boundary for life? *Saline Systems*, 5.9.
- Brocks, J.J., et Summons, R.E., 2005.** Sedimentary hydrocarbons, biomarkers for early life *in* Schlesinger, W.H., 2005. *Biogeochemistry*, vol 8. Pp702.

- Copeland, A., O'Connor, Lucas, K., Alla Lapidus, A., Berry, K.W., Detter, J.C., Del Rio, T.G., Hammon, N., Dalin, E., Tice, H., Pit-luck, S., Bruce, D., Goodwin, L., Han, C., Tapia, R., Saund-ers, E., Schmutz, J., Brettin, T., Larimer, F., Land, M., Hauser, L., Vargas, C., Nieto, J.J., Kyrpides, N.C., Ivanova, N., Göker, M., Klenk, H.P., Csonka, L.N., et Woyke, T., 2011.** Complete genome sequence of the halophilic and highly halotolerant *Chromohalobacter salexigens* type strain (1H11T). *Standards in Genomic Sciences*, 5:Pp379-388.
- Cuadros-Orellana, S., Pohlschroder, M., Grossman, M.J., et Durrant, L.R., 2012.** Biodegradation of aromatic compounds by a halophilic archaeon isolated from the dead sea. *Chemical engineering transactions*, 27,Pp13-18.
- Dassarma P, Coker J, Huse V, Dassarma S, 2010.** Halophiles, *Industrial Applications. Encyclopedia of Industrial Biotechnology.*
- Dassarma, S., et Arora, P., 2001.** Halophiles. *Encyclopedia of life sciences.*
- Dassarma, S., et Dassarma, P., 2012.** Halophiles. *Encyclopedia of life sciences. John Wiley and Sons, Ltd : Chichester.*
- De la Haba, R., Sanchez-porro, C., et Ventosa, A., 2011.** Taxonomy, phylogeny, and biotechnological interest of the family *Halomonadaceae* in Ventosa A, Oren A et Ma Y, 2011. *Halophiles and Hypersaline Environments: Current Research and Future Trends.* Pp387.
- De la Haba, R., Sanchez-porro, C., Marquez, M.C., et Ventosa A, 2011.** Taxonomy of halophiles in Horikoshi, K., Antranikian, G., Bull, A.T., Robb, F.T., et Stetter, K.O., 2011, *Extremophiles Handbook*, Pp1246.
- Enache, M., et Kamekura, M., 2010.** Hydrolytic enzymes of halophilic microorganisms and their economic values. *Rom.Journal Biochem.*, 47, 1, Pp47-59.
- Enache, M., Popescu, G., Itoh, T., et Kamekura, M., 2012.** Halopholic microorganisms from man-made and natural hypersaline environments : physiology, ecology, and biotecnological potential in Stan-Lotter, H., et Fendrihan, S., 2012. *Adaption of Microbial Life to Environmental Extremes: Novel Research Results and application.* Pp284.
- Garcia, L., 2002.** La vie dans les milieux extremes in Michaud, Y., 2006. *Qu'est-ce que la diversité de la vie?* Pp408.

- Gargaud, M., 2011.** Encyclopedia of Astrobiology, Vol 1. Halophile. P1853.
- Garrett, R.H., et Grisham, C.M., 2000.** Biochimie. Les transports membranaires. Pp1292.
- Garrity, G., in Garrity, G., Brenner, D.J., Krieg, N.R., et Staley, J.R., 2007.** Bergey's manual of systematic bacteriology : vol 2 : the proteobacteria. Pp 1134.
- Garrity, GM. Bell JA., Lilburn T. 2005.** Oceanospirillales ord. nov. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn, vol. 2, part B, pp. 316–319. Edited by D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley & G. M. Garrity. New York: Springer.
- Glazer A.N, Nikaido H, 2007.** Microbial biotechnology : Fundamentals of applied microbiology. 2nd ed. Microbial diversity. Pp537.
- Horikoshi, K., et Bull, A.T., 2011.** Prologue : Definition, categories, distribution, origin and evolution, pioneering studies, and emerging fields of extremophiles *in* Horikoshi, K., Antranikian, G., Bull, A.T., Robb, F.T., et Stetter, K.O., 2011, Extremophiles Handbook, Pp1246.
- Javor, B., 2012.** Hypersaline environments : Microbiology and biogeochemistry.
- Kanekar, P.P., Kanekar, S.P., Kelkar, A.S., et Dhakephalkar, P.K., 2012.** Halophiles-Taxonomy, diversity, physiology and applications *in* Satyanarayana, T., Johri, B.N., et ý Prakash, A., 2012. Microorganisms in Environmental Management: Microbes and Environment. Pp819.
- Kharroub K, 2007.** Identification et étude moléculaire des bactéries et des archéobactéries aérobies halophiles de la sebkha Ezzemoul (Ain M'Lila). Université Mentouri - Constantine.
- Krasner, R.I., 2010.** The Microbial Challenge: Science, Disease, and Public Health., 2nd ed. The microbial world. Pp476.
- Kunte, H.J., 2004.** Osmoregulated solute transport in halophilic bacteria *in* Ventosa, A, 2013. Halophilic microorganisms. Pp350.
- Kunte, H.J., Truper, H.G., et Stan-lotter., 2012.** Halophilic microorganisms *in* Horneck, G., et Baumstark-Khan, C., 2012. Astrobiology: The Quest for the Conditions of Life. Pp411.
- Kushner, D.J., 1993.** Growth and nutrition of halophilic bacteria *in* Vreeland, R.H., et Hochstein, L.I., 1993. The Biology of Halophilic Bacteria. Pp336.

- Larsen, H.**, Ecology of hypersaline environments *in* Nissenbaum, A., 2011. Developments in sedimentology 28. Hypersaline brines and evaporitic environments. Pp269.
- Le Borgne S, Paniagua D et Vazquez-Duhalt R, 2008.** Biodegradation of organic pollutants by halophilic bacteria and archaea. Journal of molecular microbiology and biotechnology, 15:Pp74–92.
- Litchfield, C.D., et Oren, A., 2001.** Polar lipids and pigments as biomarkers for the study of the microbial community structure of solar salterns *in* Melack, J.M., Jellison, R., et Herbst, D., 2013. Saline Lakes: Publications from the 7th International Conference on Salt. Pp188.
- Ma, Y., Galinski, E.A., Grant, W.D., Oren, A., et Ventosa, A., 2010.** Halophiles 2010 : Life in saline environments. Applied and environmental microbiology, nov Pp6971-6981.
- Madigan, T.M., Martinko, J.M., Stahl, D.A., et Clark, D.P., 2012.** Brock biology of microorganisms. 3^{ème} ed. Pp1155.
- Maturrano, L., Santos, F., Rossello-Mora, R., et Anton, J., 2006.** Microbial Diversity in Maras Salterns, a Hypersaline Environment in the Peruvian Andes. Applied and environmental microbiology, Pp 3887-3895.
- McGenity T.J, Gemmell R.T, Grant W.D et Stan-Lotter H 2000.** Origins of halophilic microorganisms in ancient salt deposits. Environmental Microbiology, 2(3), Pp243-250.
- Mcgenity, T.J., et Oren, A., 2012.** Hypersaline Environments *in* Bell, E., 2012. Life at Extremes: Environments, Organisms, and Strategies for Survival. Pp554.
- microorganisms. Saline systems, 1:5.
- Munn, C., 2011.** Marine Microbiology Ecology and Applications. 2nd ed. Metabolic Diversity and Ecophysiology. Pp320.
- Neifar, M., Maktouf, S., Ghorbel, R.E., Jaouani, A., et Cherif, A., 2015.** Extremophiles as source of novel bioactive compounds with industrial potential *in* Gupta, V.K., 2015. Biotechnology of Bioactive Compounds: Sources and Applications. Pp736.
- northwest of Iran. African Journal of Biotechnology Vol. 10(12), Pp2282-2289.
- Ollivier, B., Patel, B.K.C., et Garcia, J.L., 2012.** Anaerobes from extreme environments *in* Seckbach, J., 2012. Cellular origin and life in extreme habitats. Journey to Diverse Microbial Worlds: Adaptation to Exotic Environments. Pp410.

- Oren A, 2008.** Microbial life at high salt concentrations : phylogenetic and metabolic diversity. *Saline system*, 4:2.
- Oren A, 2012.** Taxonomy of the family Halobacteriaceae: a paradigm for changing concepts in prokaryote systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62, Pp263–271.
- Oren A, 2013.** Life at high salt concentrations, intracellular KCl concentrations, and acidic proteomes. *Frontiers in microbiology*, 00315.
- Oren A., 2002.** Adaptation of halophilic archaea to life at high salt concentrations *in* Lauchli, A., et Lutttge., 2007. *Salinity: Environment -Plants - Molecules*. Pp552.
- Oren, A., 1988.** The microbial ecology of the dead sea *in* Marshall, K.C., 2013. *Advances in Microbial Ecology*, Vol 10. Pp474.
- Oren, A., 1993.** Ecology of extremely halophilic microorganisms *in* Vreeland R.H et Hochstein L.I, 1993. *The Biology of Halophilic Bacteria*. Pp336.
- Oren, A., 1999.** Halophilic microorganisms _ An overview *in* Oren, A., 1999. *Microbiology and Biogeochemistry of Hypersaline Environments*. Pp384.
- Oren, A., 2006.** Cellular origin and life in extreme habitats. *Halophilic Microorganisms and their Environments. Hypersaline environments and their biota. Great salt lake, Utah*. Pp575.
- Oren, A., 2006.** Life at high salt concentrations *in* Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K., et Stackebrandt, E., 2006. *The Prokaryotes: Vol. 2: Ecophysiology and Biochemistry*. 3^{ed} ed. Pp1107.
- Oren, A., 2006.** The order *Haloanaerobiales* *in* Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K., et Stackebrandt, E., 2006. *The Prokaryotes: Vol. 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*. 3^{ed} ed. Pp1140.
- Oren, A., 2012.** Approaches toward the study of halophilic microorganisms in their natural environments : Who are they and what are they doing? *in* Vreeland R.H, 2012. *Advances in understanding the biology of halophilic Microorganisms*. Pp244.
- Oren, A., 2013.** The bioenergetic basis for the decrease in metabolic diversity at increasing salt concentrations : implications for the functioning of salt lake ecosystems *in* Melack, J.M., Jellison, R., et Herbst, D., 2013. *Saline Lakes: Publications from the 7th International Conference on Salt*. Pp188.

- Oren, A., Gurevich, P., Azachi, M., et Henis, Y., 1993.** Microbial degradation of pollutants at high salt concentrations *in* Rosenberg, E., 1993. Microorganisms to Combat Pollution. Pp280.
- Peyton, B.M., Mormile, M.R., Alva, V., Oie, C., Roberto, F., Apel, W.A., et Oren, A., 2004.** Biotransformation of Toxic Organic and Inorganic Contaminants by Halophilic Bacteria *in* Ventosa, A, 2013. Halophilic microorganisms. Pp350.
- Purohit M K., Raval, V H., Singh , SP. 2013.** Haloalkaliphilic Bacteria: Molecular Diversity and Biotechnological Applications. *Geomicrobiology and Biogeochemistry* , 39 :61-79.
- Purohit, M.K., Raval, V.H., et Singh, S.P., 2013.** Haloalkaliphilic bacteria : Molecular diversity and biotechnological applications *in* Parmar, N., et Singh, A., 2013. *Geomicrobiology and biogeochemistry*. Pp302.
- Rad, F.A, Aksoz, N., et Hejazi, M.A., 2011.** Effect of salinity on cell growth and β carotene production in *Dunaliella* sp. isolates from Urmia Lake *in*
- Ramos-Cormenzana, A., 1991.** Halophilic organisms and the environment *in* Rodriguez-Valera, F., 2012. General and applied aspects of halophilic microorganisms. Pp402.
- Rath, C.C., Mohanta, H.S., et Dash, S.K., 2009.** Extremophiles as Novel cell factories *in* Mishra, C.S.K., 2009. *Biotechnology Applications*. Pp376.
- Roberts, M.F., 2005.** Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic
- Rodriguez-Valera, F., 1993.** Introduction to saline environments *in* Vreeland, R.H., et Hochstein, L.I., 1993. *The Biology of Halophilic Bacteria*. Pp336.
- Sanal, Z. 1999.** Microbial Diversity in Euaporite Brines. Doctor of Philosophy at the University of Leicester Department of Microbiology and Immunology University of Leicester. 333 pages.
- Schneegurt MA. 2012.** Chapitre 2. Media and Conditions for the Growth of Halophilic and Halotolerant Bacteria and Archae. *In* *Advances in Understanding the Biology of Halophilic Microorganisms* sell H. Vreeland . 35-58 pages.
- Seckbach, J., et Oren, A., 2007.** Oxygenic photosynthetic microorganisms in extreme environments : possibilities and limitations *in* Seckbach, J., 2007. *Cellular origin, life in extreme habitats and astrobiology. Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments*. Pp814.

- Singh, O.V., 2012.** Extremophiles: Sustainable Resources and Biotechnological Implications. Pp456.
- Sobral, D. 2012.** De l'usage du polymorphisme de répétitions en tandem pour l'étude des populations bactériennes : mise au point et validation d'un système de génotypage automatisé utilisant la technique de MLVA. Agricultural sciences. Université Paris Sud - Paris XI, 204 Pages.
- Spring S, Ludwig W, Marquez M.C, Ventosa A et Schleifer K.H, 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, Pp492-496.
- Stan-Lotter, H., et Fendrihan, S., 2013.** Survival strategies of halophilic oligotrophic and desiccation resistant prokaryotes in Seckbach, J., Oren, A., et Stan-lotter, H., 2013. Cellular origin, life in extreme habitats and astrobiology. Polyextremophiles: Life Under Multiple Forms of Stress. Pp634.
- Tapilatu, Y.H., Grossi, V., Acquaviva, M., Militon, C., Bertrand, J.C., et Cuny, P., 2010.** Isolation of hydrocarbon degrading extremely halophilic archaea from an uncontaminated hypersaline pond (Camargue, France). Extremophiles 14:Pp225–231.
- Tardy-Jacquenod C, Magot M, Patel B.K.C, Matheron R et Caumette P, 1998.** *Desulfotomaculum halophilum* sp. nov., a halophili sulfate-reducing bacterium isolated from oil production facilities. International Journal of Systematic Bacteriology, 48,Pp333-338.
- Tomioka, H., Kamo, N., Fujikawa, K., et Sasabe, H., 1992.** Absorbance change of a C-50 carotenoid, bacterioruberin related to Cl⁻ translocation in a Cl⁻ pump, halorhodopsin in Rigaud, J.L., 1992. Structures and functions of retinal proteins. Pp437.
- Torsvik, V., et Ovreas, L., 2008.** Microbial diversity, life strategies, and adaptation to life in extreme soils in Dion, P., et Nautiyal, C.S., 2007. Soil biology. Microbiology of Extreme Soils. Pp369.
- Ventosa A et Arahal D.R, 2002.** Physico-chemical characteristics of hypersaline environments and their biodiversity. Encyclopedia of life support systems.

- Ventosa, A. 2005.** Genus III. *Chromohalobacter* Ventosa, Gutierrez, García and Ruiz-Berraquero 1989, 384VP emend. Arahal, García, Ludwig, Schleifer and Ventosa 2001a, 1446. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol. 2, part B, pp. 316–319. Edited by D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley & G. M. Garrity. New York: Springer.
- Ventosa, A., 2006.** Unusual microorganisms from unusual habitats : hypersaline environments in Logan, N.A., Lappin-scott, H.M., et Oyston, P.C.F, 2006. Prokaryotic diversity : Mechanisms and significance, Pp302.
- Ventosa, A., in** Garrity, G., Brenner, D.J., Krieg, N.R., et Staley, J.R., 2007. *Bergey's manual of systematic bacteriology : vol 2 : the proteobacteria*. Pp 1134.
- Ventosa, A., Mellado, E., Sanchez-porro, C., et Marquez, M.C., 2007.** Halophilic and Halotolerant microorganisms from soils in Dion, P., et Nautiyal, C.S., 2007. Soil biology. *Microbiology of Extreme Soils*. Pp369.
- Ventosa, A., Sanchez-Porro, C., Martin, S., et Mellado, E., 2006.** Halophilic archaea and bacteria as a source of extracellular hydrolytic enzymes in Cimerman, N.G., Oren, A., et Plemenitas, A., 2006. Cellular origin, life in extreme habitats and astrobiology. *Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya*, Pp576.
- Vreeland, R.H., 1997.** The family Halomonadaceae in Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., et Schleifer., 2013. *The Prokaryotes, 2^{ème} ed. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. Pp1155.
- Wharton, D.A., 2002.** Life at the Limits: Organisms in Extreme Environments. More tough choices. Pp307.

Annexes

Annexe 01 : la composition du milieu d'enrichissement et des milieux de culture utilisés. (Atlas, 2004)

- la composition du milieu d'enrichissement pour 100ml d'eau distillée

Extrait de levure.....	1g
Casaminoacides.....	1g
NaCl.....	20g

- la composition des milieux de culture pour 1L d'eau distillée

1. la composition du milieu Gibbons (MG) :

Extrait de levure.....	10g
Casaminoacides.....	7.5g
Trisodium citrate.....	3g
KCl.....	2g
MgSO ₄ 7H ₂ O.....	20g
MnCl ₂ 4H ₂ O.....	0.36mg
FeCl ₂ 4H ₂ O.....	36mg
NaCl.....	250g
Agar.....	20g

2. la composition du milieu sélectif pour les archées :

Extrait de levure.....	5g
KCl.....	5g
MgSO ₄ 7H ₂ O.....	50g
MgCl ₂ 6H ₂ O.....	32.5g
CaCl ₂ 2H ₂ O.....	0.8g
NaBr.....	0.6g
NaHCO ₃	0.16g
Agar.....	20g

3. la composition du milieu naturel pour les halophiles :

Extrait de levure.....	10g
Casaminoacides.....	7.5g
Agar.....	20g

4. la composition du milieu gélose nutritif :

Gélose nutritif.....46g

Annexe 02 : Matériels et Produits utilisés.

1. Matériels :

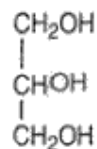
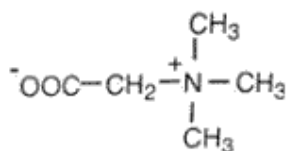
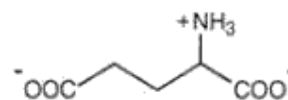
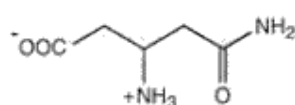
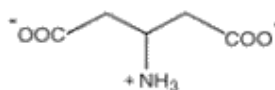
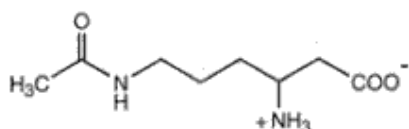
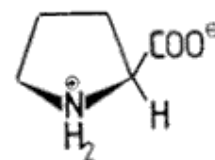
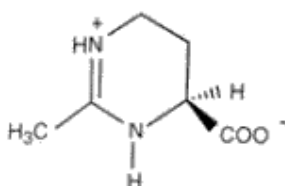
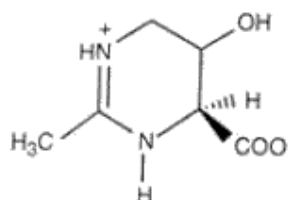
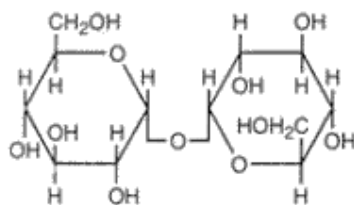
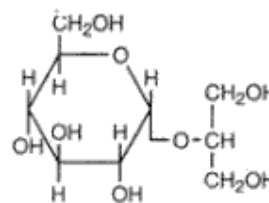
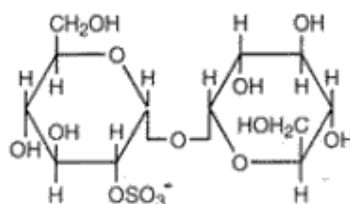
- Anse de platine
- Autoclave
- Microscope Optique (ZEISS)
- Bain marie
- Balance électronique
- Becs Benzène
- Boites Pétri
- Erlenmayer
- Etuve
- Flacons en verre stériles
- Lames et lamelles
- Parafilm
- Papier joseph
- pH
- Pipettes Pasteur
- Plaque chauffante agitatrice
- Portoirs de tubes
- Spatule
- Thermomètre
- Tubes de culture en verre stériles

2. Produits :

- Agar
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- Casaminoacides
- Ethanol (70%)
- Extrait de levure
- $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- Fuschine

- KCl
- Lugol
- Micropipettes
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- NaBr
- NaCl
- NaHCO_3
- Trisodium citrate
- Violet de gentiane

Annexe 03 : la structure chimique de quelques solutés compatibles

Glycerol**Glycine betaine****L- α -Glutamate** **β -Glutamine** **β -Glutamate****N ϵ -Acetyl- β -Lysine****L-Proline****Ectoïne****Hydroxyectoïne****Trehalose** **α -Glucosylglycerol****Sulfotrehalose**

Glossaire

Activité d'eau : un paramètre quantitative de la disponibilité en eau dans un habitat; l'activité d'eau d'une solution est un centième de son humidité relative, qui est exprimée par la valeur a_w (0,00 ... 1,00 a_w).

Aragonite : un polymorphe stable à haute température et à haute pression du Carbonate de calcium de formule CaCO_3 , avec des traces de Strontium Sr, Plomb PB, Zinc Zn. Les cristaux peuvent atteindre jusqu'à 30 cm. Elle appartient à la classe des carbonates.

Bactériocine : protéine produite par une souche bactérienne qui tue d'autres souches de bactéries étroitement apparentées.

Bactériorhodopsine : une protéine transmembranaire de 26 kDa qui porte un groupe rétinol lié à la lysine-216. Elle sert de pompe à protons à lumière-dépendante.

Béta-carotène : C'est un précurseur de la vitamine A (provitamine A), est la forme la plus répandue de carotène, c'est un pigment orange du groupe des caroténoïdes présent dans certains végétaux, Il est important pour la photosynthèse.

Bactérioruberine : Un pigment caroténoïde présent dans certaines archéobactéries halophiles aérobies qui est responsable de leurs couleurs rouge vif

Biocarburant : regroupent toutes les formes de carburants constitués de dérivés industriels tels que les gaz, alcools, éthers, huiles et esters, qu'ils obtenus après transformation de produits d'origine végétale ou animale. Ils sont assimilés à une source d'énergie renouvelable.

Hydrocarbures : sont des composés organiques ne contenant que du carbone et de l'hydrogène, associés en molécules d'une très grande diversité, de la plus simple, le méthane, constituant principale du gaz naturel, aux plus complexes qu'on trouve dans les fractions lourdes du pétrole brut.

Lagune : étendue d'eau salée et peu profonde, parfois isolée de la mer par un cordon littoral fermé.

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

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

Saumure : une eau dont la concentration en sel est supérieure à celle de l'eau de mer. il peut se former naturellement, par évaporation ou congélation de l'eau de mer, et par dissolution de roches sédimentaires formées par l'évaporation d'anciennes mers.

Solutés compatibles : sont appelés aussi osmoprotecteurs ou osmorégulateurs, qui ce sont des composés organiques solubles synthétisés par les extrêmophiles pour protéger leurs constituants cellulaires des conditions environnementales. Ils sont accumulés par les halophiles dans les milieux hypersalins qui n'interfèrent pas avec l'activité enzymatique pour rééquilibrer les pressions osmotiques.

DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) : Collection allemande de microorganismes et de cultures cellulaires est l'un des plus grands centres de ressources biologiques à travers le monde. Ses collections comprennent actuellement près de 40 000 articles, y compris environ 20 000 différentes souches bactériennes et fongiques 5000, 700 lignées cellulaires humaines et animales, 800 lignées cellulaires de plantes, des virus de plantes 1.000 et 4.800 et les antisérums, les types de l'ADN génomique bactérien différents.

ATCC (American Type Culture Collection) : est une organisation sans but lucratif dans le domaine de la biotechnologie dont la mission se concentre sur l'acquisition, l'authentification, la production, la conservation, le développement et la distribution de micro-organismes de référence standard, lignées cellulaires et autres matériaux pour la recherche dans les sciences de la vie.

Résumé

Les microorganismes sont innombrables dans la nature, ils peuvent prospérer dans des environnements extrêmes. Ils sont globalement qualifiés extrêmophiles. Parmi les environnements extrêmes on rencontre Les environnements hypersalines qui abritent une variété de microorganismes qui ont la capacité s'adapter à haute salinité. Notre travail consiste à isoler des microorganismes halophiles à partir des échantillons de sol et d'eau de deux sebkha au niveau de Djelfa et une sebkha au niveau de Laghouat, l'isolement a été effectué sur quatre milieux de culture sélectifs de salinité 20% à 25% quatre-vingts huit ont été isolé avec une dominance des coccobacilles à gram négatifs, quelques isolats qui ont été identifié par des méthodes moléculaires, identification moléculaire révèle trois *H.elongata*, *H. boliviensis* et *C.israelensis* qui ont affiliées au phylum *Proteobacteria*. leur adaptation aux fortes salinités leur confère des caractéristiques étonnantes, ce qui révèle un véritable atout biotechnologique.

Mot clé : extrêmophiles, adaptation, halophile, sebkha

Abstract

The micro-organisms are innumerable in nature, they can thrive in extreme environments. They are described overall as extrêmophiles. Among this extreme environments, we have the hypersaline environments sheltering a variety of micro-organisms which have the capacity to adapt to high salinity. Our work consists in isolating from the halophilic microorganisms starting from the samples of soil and water of two sebkha in Djelfa and a sebkha in Laghouat, isolation was carried out on four selective culture medium of salinity 20% to 25%, eighty eight were isolates with a predominance of coccobacilli with gram negative, only a few isolates were identified by molecular methods which reveals three species: *H.elongata*, *H. boliviensis* and *C.israelensis* which they are affiliated with the phylum *Proteobacteria*. Their adaptation to high salinities confers them astonishing characteristics, which reveals a true biotechnological asset.

Key words: extremophilic microorganisms, adaptation, sebkha, halophilic microorganisms.

ملخص

الكائنات الدقيقة لا تحصى في الطبيعة. اذ انها يمكن أن تعيش في البيئات القاسية. يتم تصنيفها على أنها محبة للقساوة. ضمن البيئات القاسية يوجد البيئات ذات الملوحة العالية التي تؤوي مختلف الكائنات الحية الدقيقة التي لديها القدرة على التكيف مع ارتفاع نسبة الملوحة. عملنا هو عزل الكائنات الدقيقة المحبة للملوحة من عينات التربة والماء من سبختين على مستوى الجلفة و سبخة على مستوى الاغواط. تم العزل في اربعة اوساط زرع انتقائية ذات نسبة ملوحة تقدر ب 20 الى 25 % تم عزل ثمانية و ثمانون مع اغلبية العصيات سالبة الغرام بعض العزلات تم تحديدها بالوسائل الجزيئية. التحديد الجزيئي يكشف عن ثلاثة *H. Boliviensis* , *H. elongata* , *C.israelensis* الذين ينتمون إلى اسرة *Proteobacteria*. تكيفهم مع ارتفاع نسبة الملوحة يعطيهم ميزات مذهلة. مما يكشف عن اصل التكنولوجيا الحيوية الحقيقي. كلمات مفتاحية : كائنات دقيقة محبة للقساوة, كائنات دقيقة محبة للملوحة, التكيف, سبخة.