

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم

Mémoire présenté dans le cadre de l'arrêté ministériel 1275
en vue de l'obtention du diplôme de Master
et diplôme startup – diplôme brevet

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Biologie moléculaire des microorganismes

N° d'ordre :
N° de série :

Intitulé :

**Caractérisation des bactéries halophiles isolées depuis la
Sebkha de Ain Yagout-Batna pour la fabrication d'une crème
solaire à base d'ectoïne.**

Présenté par : SANOGO Hali

Le 22/06/2023

Jury d'évaluation

Présidente du jury : Mme BENKAHOUL Malika (MCA - UFM, Constantine 1)

Encadrante : Mme MERIANE Ilhem (MAA - UFM, Constantine 1)

Examinatrice : Mme BOUBEKRI Karima (MCA - UFM, Constantine 1)

Entrepreneuriat : Mme BENSOUICI Aicha (Pr - UFM, Constantine 1)

Secteur socioéconomique : Mme SALHI Ouided (Directrice - Technopôle de Constantine)

Année universitaire
2022 - 2023

Remerciements

Avant tout, **Louange à ALLAH, le tout miséricordieux, le très miséricordieux**, qui m'a donné la santé, la patience, le courage et la force d'accomplir ce modeste travail.

J'adresse mes plus vifs remerciements à **Mlle MERIANE ILHEM**, une des personnes les plus gentilles et sincères que j'ai pu côtoyer, pour son encadrement de qualité, le temps qu'elle m'a consacré, ses encouragements, son aide immense, sa patience, ses précieux conseils aussi bien dans le domaine professionnel que dans la vie en générale, qui m'a permis de mener à bien ce travail et d'être satisfait de moi-même. Merci sincèrement madame, du plus profond de mon cœur.

Je tiens par la suite à remercier de tout cœur **Mme BENKAHOUL MALIKA**, la meilleure dans son domaine, de m'avoir fait honneur en acceptant d'être la présidente du jury de ce travail. Et par la même occasion, je remercie aussi **Mme BOUBEKRI KARIMA**, l'une des meilleures professeures de l'université de Constantine 1, d'avoir accepté d'examiner et d'évaluer ce travail.

Je remercie aussi les ingénieurs du labo 9 (**Mme LEILA**), 14 (**Mme MOUNIA**), 16 (**Mme NAJETTE**) et de la microscopie (**Mme SAMIA**) de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, d'avoir contribué au bon déroulement de ce travail, en étant très gentilles avec moi et en se mettant à ma disponibilité.

Mon remerciement à **Mme MEGHNOUS WISSEM**, pour son aide précieuse, au bon déroulement de la partie pratique de ce travail.

Également je remercie chaleureusement mon ami et professeur le **Dr BOULAHROUF Khaled**, pour son aide immense et conseil dans la rédaction du Business Model Canvas (BMC) de ce travail.

Un très grand merci à tous mes professeurs de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et plus précisément ceux et celles du Département de Microbiologie, qui m'ont appris tout ce que je sais aujourd'hui dans le domaine de la microbiologie. Comme le dit un adage chinois « Le professeur ouvre la porte mais c'est à l'élève de marcher à travers ». Je vous dis donc merci pour ces portes que vous m'avez ouvertes, ainsi que pour les connaissances que vous m'avez transmises. Merci du fond du cœur chers professeur(e)s, vous êtes les meilleur(e)s et je ne vous oublierai jamais.

Mes sincères remerciements vont à l'encontre de tous les personnels administratifs de la Faculté, plus précisément du Département de Microbiologie. Et j'en profite pour remercier particulièrement **Mme ABDELLAZIZ WIDED**, Cheffe de Département de la Microbiologie pour toute son aide et sa disponibilité.

Et enfin, j'adresse un remerciement chaleureux à tout ce qui ont contribué de près ou de loin, directement ou indirectement, à l'élaboration de ce travail, les mots ne suffisent pas, merci infiniment.

Dédicaces

Je dédie ce mémoire :

À mes très chers parents **MAMADOU** et **FANTA**, mon frère **ISSIAKA** et mes grandes sœurs **ZEÏNABOU** et **ALIMATA**, vous êtes ma fierté, mes amours, et la raison pour laquelle je me bats tous les jours. Ce travail est pour vous, c'est un moyen pour moi de vous rendre fier de moi car il a été possible en partie grâce au soutien, l'amour et à la motivation que vous m'avez donné et également aux prières et bénédictions que vous avez faites pour moi.

À Mlle **OUATTARA FATOUMATA BOUSSÉ**, pour le soutien moral inconditionnel, la positivité, la rassurance et la motivation que tu m'as donnée depuis le début de ce travail jusqu'à son achèvement. Ce travail est aussi la tienne et j'espère que tu en es fière.

À mon frère d'une autre mère, **TRAORE LASSINA**, en témoignage de l'amitié sincère et de la fraternité qui nous unit, je te dédie ce travail et je te souhaite une vie pleine de santé, de succès et de bonheur.

À mes amis et frères Maliens de la cité universitaire Zouaghi Slimane 1 : **ISMAÏLA, HAMADOUN, SOUMANA, YACOUBA, MAHAMAR IDRISSE, MAMADOU...**

À mes amis et frères d'autres nationalités de la cité universitaire Zouaghi Slimane 1 : **DJIBRIL, HAMZA, HASSAN, EMMANUEL, MAÏGA, BACHIR...**

À mes chères amies et sœurs étudiantes Maliennes à Constantine : **HABIBATOU, N'GOURÉ, DIAHARA, SADIO...**

À tous mes collègues de la spécialité Biologie Moléculaire des Microorganismes : **INES, RIHAB, KHAWLA, SOULEF, LINA, AYA, RAOUANE, ZINA, FEHD**, ainsi qu'à toute ma promotion de la spécialité, vous êtes les meilleures, les deux années passées ensemble me marqueront à vie et vous serez à jamais dans mon cœur. J'espère que ce mémoire vous rendra fier de moi.

À mes compatriotes de la spécialité : **ADAMA** et **FANTA** ainsi qu'à ma Nigérienne préférée **OUSSEINA**.

À mes tous mes ami(e)s et ainsi qu'à tous mes proches.

Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction 1

Revue bibliographique

Chapitre 1 : Environnements salins et hypersalins

1/ Généralités	3
2/ Types d'environnements hypersalins.....	3
2.1/ Environnement thalassohalins.....	4
2.2/ Environnement athalassohalins	4
3/ Notions de Sebkhass.....	7
4/ Origines des environnements hypersalins.....	8
4.1/ Environnement hypersalin d'origine océanique.....	8
4.2/ Environnement hypersalin d'origine continentale	8
5/ Caractéristiques physico-chimiques des environnements hypersalins	8
5.1/ pH.....	8
5.2/ Température	8
5.3/ Oxygène	9

Chapitre 2 : Micro-organismes halophiles

1/ Définition 10

2/ Habitat.....	10
3/ Diversité des microorganismes halophiles	11
3.1/ Diversité phylogénétique	11
3.1.1/ Domaine Archaea	12
3.1.2/ Domaine Bacteria	12
3.1.3/ Domaine Eucarya	13
4/ Caractéristiques physico-chimiques de croissance des microorganismes halophiles.....	14
5/ Production de pigments par les microorganismes halophiles.....	15
6/ Adaptation moléculaire des microorganismes halophiles au stress salins.....	15
6.1/ Accumulation de KCl (Salt-in)	15
6.2/ Production d'osmoprotecteurs (Salt-out).....	16
6.2.1/ Les solutés zwitterioniques.....	17
6.2.2/ Les solutés non chargés	17
6.2.3/ Les solutés anioniques.....	17
7/ Applications industrielles	23

Matériel et méthodes

1/ Échantillonnage	24
2/ Isolement, purification et conservations des bactéries halophiles	24
2.1/ Milieux de culture utilisés.....	24
2.2/ Isolement	25
2.3/ Dénombrement des colonies	25
2.4/ Purification et conservation des bactéries halophiles.....	26
3/ Identification.....	26
3.1/ Examen macroscopique	26
3.2/ Examen microscopique	27

3.2.1/ Observation à l'état frais	27
3.2.2/ Observation après coloration de Gram	27
3.2.2.1/ Préparation du frottis	27
3.2.2.2/ Coloration	27
3.2.2.3/ Observation microscopique	27
3.3/ Tests d'identification biochimique.....	28
3.3.1/ Recherche de la catalase	28
3.3.2/ Recherche de l'oxydase.....	28
3.3.3/ Usage de la galerie classique pour l'étude de différents types de métabolismes	29
3.3.3.1/ Métabolisme glucidique.....	29
3.3.3.1.1/ Citrate de Simmons	29
3.3.3.1.2/ Mannitol-mobilité	29
3.3.3.1.3/ Test ONPG.....	30
3.3.3.1.4/ Réaction sur gélose TSI	30
3.3.3.2/ Métabolisme protéique	31
3.3.3.2.1/ Recherche des décarboxylases (ADH, ODC, LDC)	31
3.3.3.2.2/ Métabolisme de l'urée.....	32
3.3.4/ Usage de la galerie API 20NE.....	33
4/ Tests enzymatiques	36

Résultats et discussion

1/ Isolement.....	37
2/ Dénombrement.....	38
3/ Purification.....	39
4/ Identification	41
4.1/ Identification macroscopique	41

4.2/ Identification microscopique.....	43
4.3/ Tests biochimiques.....	46
4.4/ Galerie API 20 NE.....	48
5/ Tests enzymatiques.....	52
Conclusion et perspectives.....	56
Références bibliographiques.....	57
Annexes	
Résumés	
Business Model Canvas (BMC)	

Liste des abréviations

ADH : Arginine dihydrolase

API 20NE : Analytical profile index 20 Non entérobactérie

ARNr : Acide ribonucléique ribosomal

CaSO₄ : Sulfate de calcium

H : Hydrogène

HCl : Chlorure d'hydrogène

KCl : Chlorure de potassium

LDC : Lysine décarboxylase

M : Molaire

MgCl₂ : Chlorure de magnésium

MgSO₄ : Sulfate de magnésium

Na : Sodium

NaCl : Chlorure de sodium

NaOH : Hydroxyde de sodium

Nit : Nitrate

ODC : Ornithine décarboxylase

ONPG : Ortho-nitrophenyl-β-Galactosidase

PCR : Polymerase Chain Reaction

pH : Potentiel hydrogène

TSI : Triple Sugar Iron

UV : Ultra-Violet

Liste des tableaux

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques de quelques environnements hypersalins	9
Tableau 2 : Taxonomie des principaux microorganismes halophiles.....	13
Tableau 3 : Conditions de croissance nécessaire pour les microorganismes halophiles	14
Tableau 4 : Solutés zwitterioniques accumulés dans les cellules des microorganismes halotolérants et halophiles.....	18
Tableau 5 : Solutés non chargés accumulés dans les microorganismes halotolérants et halophiles	19
Tableau 6 : Solutés anioniques (carboxylates) accumulés dans les microorganismes halotolérants et halophiles	20
Tableau 7 : Solutés anioniques (phosphate et Sulfate) accumulés dans les microorganismes halotolérants et halophiles.....	21
Tableau 8 : Résultats de dénombrement des colonies halophiles sur le milieu M1 après 21 jours d'incubation.....	38
Tableau 9 : Résultats de dénombrement des colonies halophiles sur le milieu M2 après 21 jours d'incubation.....	39
Tableau 10 : Résultats de dénombrement des colonies halophiles sur le milieu M3 après 21 jours d'incubation.....	39
Tableau 11 : Résultats de l'observation macroscopique des souches de bactéries halophiles isolées de la Sebkhah de Ain Yagout sélectionnées	42
Tableau 12 : Description microscopique des 20 souches halophiles isolées de la Sebkhah de Ain Yagout et sélectionnées.....	44
Tableau 13 : Résultats des tests biochimiques réalisés sur les souches bactériennes halophiles isolées de la Sebkhah de Ain Yagout.....	46
Tableau 14 : Résultats de l'ensemencement des galeries API 20NE avec les 20 bactéries halophiles sélectionnées.....	49
Tableau 15 : Résultats des tests enzymatiques des 20 souches halophiles isolées de la Sebkhah de Ain Yagout et sélectionnées.....	52

Liste des figures

Figure 1 : Photographies représentant trois écosystèmes thalassohalins	5
Figure 2 : Photographies représentant trois écosystèmes athalassohalins	6
Figure 3 : Photographies représentant deux Sebkhass en Algérie : Sebkhass d'Oran à gauche et Sebkhass entre Batna et Ain Mila à droite	7
Figure 4 : L'arbre phylogénétique universel de la vie, basée sur les séquences des gènes des petites sous-unités d'ARNr, et de la distribution des organismes halophiles encadrés en bleu dans l'arbre. Les groupes marqués d'un cadre bleu contiennent au moins un représentant halophile (par exemple les Bacteroidetes, dont <i>Salinibacter ruber</i> est le seul membre halophile décrit à ce jour) ; d'autres groupes, tels que les Halobacteriales, sont entièrement composés d'halophiles	11
Figure 5 : Structures chimiques de quelques solutés compatibles produits par des microorganismes halophiles et halotolérants.....	22
Figure 6 : Photographie représentant le site d'échantillonnage (Sebkhass de Ain Yagout)	24
Figure 7 : Photographie des milieux de culture utilisées pour l'isolement des bactéries halophiles	25
Figure 8 : Photographie du compteur de colonies	25
Figure 9 : Photographie représentant les tests biochimiques réalisés sur des souches halophiles isolées de la Sebkhass de Ain Yagout (Usage de la galerie classique).....	32
Figure 10 : Photographie de la galerie API 20NE avant ensemencement (tests conventionnels : de NO ₃ à PNPG)	34
Figure 11 : Photographie de l'ampoule AUX Medium (à gauche) et de la galerie API 20NE avant ensemencement (test d'assimilation : de GLU à PAC) (à droite)	34
Figure 12 : Photographies représentant des colonies issues de l'ensemencement de l'échantillon mère : sur le milieu M1 (A), sur le milieu M2 (B), et sur le milieu M3 (C).....	37
Figure 13 : Photographies représentant des colonies issues de l'ensemencement des dilutions 10 ⁻² et 10 ⁻³ sur le milieu M3.....	38
Figure 14 : Photographie de neuf souches halophiles (1, 2, 3, 9, 10, 11, 17, 18, 19) isolées de la Sebkhass de Ain Yagout après purification	40
Figure 15 : Photographies de l'observation microscopique après coloration de Gram de quelques bactéries halophiles.....	43

Figure 16 : Répartition des bactéries halophiles selon le type de Gram.....	45
Figure 17 : Répartition des bactéries halophiles selon les différentes formes cellulaires	45
Figure 18 : Résultats des tests biochimiques classiques de quelques souches halophiles isolées de la Sebkha de Ain Yagout.....	47
Figure 19 : Résultats de l'ensemencement de la galerie API 20NE avec 5 souches de bactéries halophiles (1, 2, 3, 4 et 9) isolées de la Sebkha de Ain Yagout	50
Figure 20 : Pourcentage des genres des bactéries halophiles isolées de la Sebkha de Ain Yagout.....	51
Figure 21 : Résultats des tests enzymatiques de quelques souches halophiles isolées de la Sebkha de Ain Yagout.....	53
Figure 22 : Résultats de l'activité enzymatique des souches halophiles isolées et sélectionnées.....	53
Figure 23 : Répartitions des activités enzymatiques selon la nature du substrat dégradé par les bactéries halophiles isolées de la Sebkha de Ain Yagout.....	54

Introduction

La diversité de la vie fait toute la beauté de la terre mère. Les variations des formes de vie sur terre sont extraordinaires, que ça soit chez les êtres humains, les animaux, les plantes ou les microorganismes. Les divers habitats créés par les activités géologiques font la richesse de la terre. Parmi ces habitats, certains sont des environnements extrêmes caractérisés par des conditions hors normes. Certains microorganismes sont capables de se développer dans ces environnements à cause de leur grande adaptabilité, comme dans les lacs d'eaux salés, les sources thermales, les lacs de soude, les eaux de mine acides, etc. Ces groupes spécifiques de microorganismes sont appelés les extrêmophiles (**Kanekar et al., 2012**).

Les extrêmophiles sont divisés en plusieurs groupes en fonction du type d'environnement dans lequel ils vivent à savoir les thermophiles, les psychrophiles, les basophiles et les halophiles etc. (**Daoud et Ben Ali, 2020**).

Aimant le sel et vivant dans les environnements hypersalins, les halophiles sont constitués principalement de microorganismes eucaryotes et procaryotes possédant la capacité d'équilibrer la pression osmotique de l'environnement et de faire face aux effets dénaturants des sels comme la co-aggregation des protéines induites par le sel. Ainsi ils survivent et prospèrent dans les milieux limitant la croissance de la plupart des autres microorganismes (**Kanekar et al., 2012**).

Les microorganismes halophiles sont des divers groupes d'organismes qui croissent dans les environnements salins extrêmes. Selon leurs besoins en concentration de sel, ils sont repartis en quatre classes qui sont : les halotolérants (0-5% NaCl), les légèrement halophiles (2-5% NaCl), les halophiles modérés (5-20% NaCl), et les halophiles extrêmes (20-30% NaCl). Les halotolérants peuvent également vivre en présence et en absence de fortes concentrations de sel (**Kanekar et al., 2012**).

Les microorganismes halophiles connaissent de nos jours de nombreuses applications biotechnologiques car ce sont des sources potentielles de nouvelles molécules qui sont : les substances osmotiquement actives (solutés compatibles), les enzymes, les protéines, les lipides et les exo-polysaccharides (**Oren, 2002**).

L'objectif de ce travail est d'isoler, de purifier et de caractériser les souches bactériennes halophiles à partir de la Sebkhha de Ain Yagout-Batna.

Ce travail est ainsi réparti en quatre parties :

- Une première partie consacrée aux données bibliographiques relatives à l'halophilie et qui est divisée en deux chapitres (environnements hypersalins et microorganismes halophiles).

Introduction

- Une deuxième partie qui traite le matériel et les méthodes utilisés pour l'élaboration de ce travail. Les résultats obtenus ainsi que leurs discussions constituent la troisième partie.
- Enfin ce travail se clôturera par une dernière partie qui est la conclusion et des perspectives.

Ces différentes parties représentent la première partie de notre projet intitulé fabrication d'une crème solaire à base d'ectoïne synthétisé à partir d'une bactérie halophile.

**Revue
bibliographique**

Chapitre 1

Environnements salins et hypersalins

1/ Généralités

Les environnements extrêmes sont des écosystèmes dans lesquels les conditions physico-chimiques sont éloignées de celles trouvées habituellement sur terre (températures comprises entre 10°C et 40°C, pH quasi neutre et faible concentration de sels) (**Daoud et Ben Ali, 2020**).

Parmi ces environnements extrêmes, nous avons les milieux salins et hypersalins. Ils sont retrouvés sur tous les continents et dans de nombreux pays (**Litchfield et Gillevet, 2002**). Ils sont caractérisés par la présence de flore, de faune et de microorganismes spécifiques (**Gocheva et al., 2021**).

Biologiquement, on distingue deux grands types d'écosystèmes dans lesquels le facteur sel interagit avec les populations microbiennes qui sont : le sol et l'eau (**Gocheva et al., 2021**).

Un sol est considéré comme salin quand il contient plus de 0.2% de sels solubles. La gamme de salinité que l'on peut trouver dans les sols est très large et une microflore complexe se développe dans la plupart de ces gammes (**Gocheva et al., 2021**). Les sels solubles majeurs dans le sol sont des cations Na^+ (sodium), Ca^{2+} (calcium), Mg^{2+} (magnésium) et K^+ (potassium), et des anions Cl^- (chlorure), SO_4^{2-} (sulfate), HCO_3^- (bicarbonate), CO_3^- (carbonate) et NO_3^- (nitrate) (**Yan et al., 2015**).

Les eaux salines sont mieux étudiées et connues que les sols salins. Les lacs sont considérés comme salins quand ils ont une salinité supérieure à 0.3% (**Gocheva et al., 2021**). Les mers et les océans contiennent à peu près 3.5% de sels et sont appelés des écosystèmes salins. Ces milieux sont appelés hypersalins quand la teneur en sels dissous dépasse 3.5% (**Daoud et Ben Ali, 2020**).

Les milieux aquatiques hypersalins, qui ont une salinité plus grande que celle de l'eau de mer, sont plus stables que les milieux terrestres hypersalins (**Caton et al., 2004**).

2/ Types d'environnements hypersalins

Les environnements hypersalins peuvent être divisés en :

- Thalassiques : qui sont naturellement présents et associés aux océans.
- Athalassiques : qui sont les lacs intérieurs sans lien avec une source marine (**Paul et Mormille, 2017**).

2.1/ Environnement thalassohalins

Les environnements thalassohalins sont des écosystèmes ayant pour origine l'eau de mer et contiennent du chlorure de sodium (NaCl) comme sels prédominants (**Litchfield et Gillevet, 2002**). Le grand lac salé en Californie aux Etats-Unis est un exemple d'environnements thalassohalins.

Ces environnements ont une composition de sel similaire à celle de l'eau de mer : les ions sodium et chlorure sont les ions dominants, et le pH est proche de la neutralité ou légèrement alcalin. Pendant l'évaporation, certains changements ont lieu dans la composition ionique à cause de la précipitation du gypse ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) et d'autres minéraux après que leur solubilité soit dépassée (**Oren, 2002**). La précipitation de NaCl entraîne une variation de la composition ionique et une augmentation relative des ions K^+ et Mg^{2+} (**Daoud et Ben Ali, 2020**). Comme on le trouve dans les bassins de cristallisation des sels, les saumures thalassohalines saturés en NaCl, présentent souvent une coloration rouge vif en raison du grand nombre de micro-organismes pigmentés qu'elles abritent (**Oren, 2002**).

Des exemples d'écosystèmes thalassohalins sont représentés dans la **figure 1**.

2.2/ Environnement athalassohalins

Les environnements athalassohalins sont ceux qui ont des sources autres que l'eau de mer et qui contiennent des apports d'ions différents. Les écosystèmes athalassohalins sont dominées par la présence du potassium, du magnésium ou du sodium. La mer Morte, les lacs de soude alcalins d'Egypte (par exemple, Wadi El Natroun), les lacs de soude de l'Antarctique ainsi que le Big Soda et le Mono Lake en Californie sont des exemples d'environnements athalassohalins (**Litchfield et Gillevet, 2002**).

L'exemple parfait d'un écosystème hypersalin athalassohalin est la mer Morte, un lac dans lequel la concentration des cations divalents Mg^{2+} et Ca^{2+} (1.89 M et 0.45 M respectivement) dépasse celle des cations monovalents Na^+ et K^+ (1.56 M et 0.2 M respectivement), et dans lequel le pH est relativement bas (environ 6.0) (**Oren, 2002**).

Dans ces écosystèmes, les anions monovalent Cl^- et Br^- représentent plus de 99.9% des anions totaux (**Daoud et Ben Ali, 2020**).

La **figure 2** représente des exemples d'environnements athalassohalins.



Figure 1 : Photographies représentant trois écosystèmes thalassohalins.

A : Marais salants de Costa Blanca en Espagne. B : Marais salants San Francisco aux USA. C : Le Grand lac salé en Californie aux États-Unis.

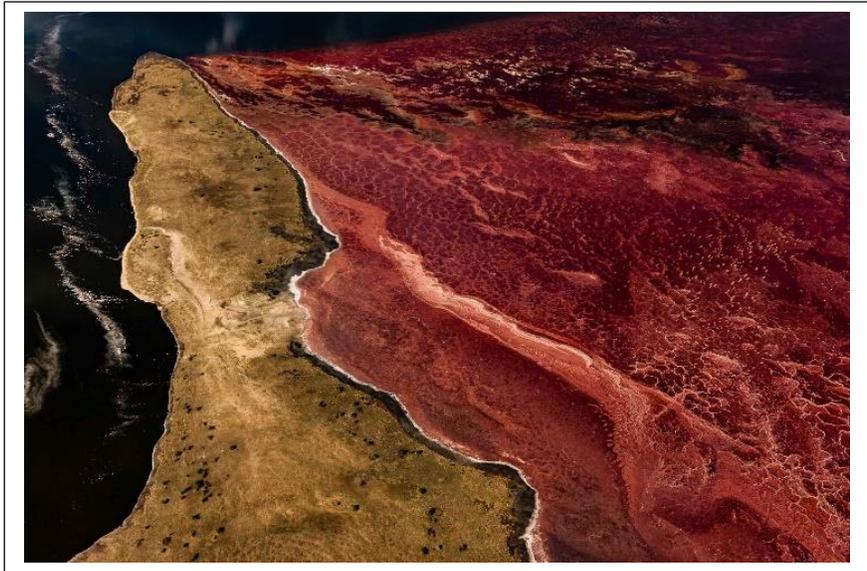
A et B : https://www.researchgate.net/figure/Figure-n-2-Photos-des-plans-thalassohalins-Marais-salants-de-Costa-Blanca-en-Espagne_fig1_321599017

C : https://www.larousse.fr/encyclopedie/images/Grand_Lac_Sal%C3%A9/1314282



A

B



C

Figure 2 : Photographies représentant trois écosystèmes athalassohalins.

A : Mer morte en Asie. B : Mono Lake en Californie aux États-Unis et C : Lac Magadi du Kenya.

A : <https://www.istockphoto.com/fr/photos/mer-morte>

B : <https://www.istockphoto.com/photos/mono-lake>

C : <https://www.yannarthusbertrandphoto.com/fr/produit/magadi-12/>

En Algérie, de nombreux termes locaux sont utilisés pour désigner les lacs salés tels que les Sebkhass, Chotts (**Demnati et al., 2020**).

3/ Notions de Sebkhass

Le mot Sebkhass vient de l'arabe et désigne une dépression fermée occupée momentanément par un lac salé. Elle est caractérisée par une abondance de sels solubles concentrés à la surface qui entrave toute végétation (**Chamekh et al., 2019**).

Les sols de Sebkhass sont beaucoup plus présents dans les zones arides ou semi-arides. De nombreuses études ont décrit les sols de Sebkhass comme des dépôts salins de sable mélangé avec du limon et de l'argile. Les événements environnementaux comme le vent, la température et les activités biologiques sont les facteurs qui favorisent la formation des sols de Sebkhass. Quand l'évaporation devient plus importante que les précipitations, cela crée une concentration de différents types de sels dans la nappe phréatique proche de la surface, ce qui va conduire au phénomène de précipitation dans la partie supérieure du profil sédimentaire formant le sol de Sebkhass (**Hafhouf et al., 2022**).



Figure 3 : Photographies représentant deux Sebkhass en Algérie : Sebkhass d'Oran à gauche et Sebkhass entre Batna et Ain Mila à droite.

Sebkhass d'Oran : <http://wikimapia.org/6767092/fr/La-Grande-Sebkha>

Sebkhass entre Batna et Ain Mila : <http://paysagesdekabylie.over-blog.com/article-les-lacs-sales-de-sebkha-entre-batna-et-ain-m-lila-107395422.html>

4/ Origines des environnements hypersalins

Les environnements hypersalins peuvent avoir deux origines :

4.1/ Environnement hypersalin d'origine océanique

Pendant les temps géologiques, certains milieux ont été séparés des océans. Ils représentent donc des systèmes fermés dans lesquels l'évaporation de l'eau entraîne une concentration lente de sel jusqu'à saturation. La majorité de ces environnements sont des reliefs plats dans les zones arides ou semi-arides, proches des océans, comme par exemple les marais salants, les sebkhas et les lagunes. Dans ces milieux, les échanges avec la mer sont lents et l'évaporation de l'eau est rapide (**Daoud et Ben Ali, 2020**).

4.2/ Environnement hypersalin d'origine continentale

Ces derniers proviennent de la dissolution des sels associés aux roches et aux couches géologiques provoquée par les eaux de pluie et de ruissellement. Les sels de ces milieux sont aussi concentrés par évaporation, mais ses eaux sont accumulées dans les étangs étanches. Ainsi la composition chimique de chaque lac salé est unique. C'est l'exemple du Grand Lac Salé dans l'Utah (États-Unis) et la mer Morte à la frontière de la Palestine et de la Jordanie qui ont des concentrations en sels totaux dissous supérieurs à 300 g/L (**Daoud et Ben Ali, 2020**).

5/ Caractéristiques physico-chimiques des environnements hypersalins

5.1/ pH

D'une façon générale, une hypothèse permettant d'expliquer les valeurs de pH dans ces milieux a été proposé en **1986** par **Grant et Ross** et cette hypothèse est que : le pH final du milieu est influencé par la précipitation du calcium sous forme de carbonate de calcium (CaCO_3) et celle du magnésium sous la forme de sépiolite ($\text{Mg}_2\text{Si}_6\text{O}_{15}(\text{OH})_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) car la précipitation du magnésium produit des ions H^+ et la précipitation du carbonate supprime l'alcalinité du milieu (**Khallef, 2019**).

5.2/ Température

La plupart des espèces microbiennes et végétales des écosystèmes salins sont des mésophiles ou thermotolérants.

5.3/ Oxygène

Les environnements hypersalés sont des milieux anoxiques excepté la surface des eaux, parce que les températures élevées et les fortes salinités limitent la solubilisation de l’oxygène et forment des milieux favorables à la multiplication d’une flore anaérobie. Le brassage des eaux de surface par le vent permet l’aération et ainsi la disponibilité de l’oxygène pour les microorganismes aérobies, algues ou cyanobactéries des couches superficielles (**Khallef, 2019**).

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques de quelques environnements hypersalins (Boutaiba et al., 2011).

Propriétés physico-chimiques		Ecosystèmes hypersalins						
		Saline Solaire (Puerto Rico)	Grand Lac Salé (États-Unis)	Lac Assal (Djibouti)	Mer Morte	Wadi El Natroun (Egypte)	Lac Salé d’El-Golea (Algérie)	Site Sidi Ameur (Algérie) - Eau
pH		nd	7.7	nd	7.8	11	9.0	7.4
Anions et cations	Na ⁺	65.4	105	77.8	40.1	142	107	67.1
	K ⁺	5.2	6.7	5.4	7.6	2.3	nd	0.17
	Mg ²⁺	20.1	11.1	8.0	44.0	n.d	0.3	3.0
	Ca ²⁺	0.2	0.3	14.6	78.2	n.d	0.4	0.51
	Cl ⁻	144	181	164	225	155	198	111
	SO ₄ ²⁻	1.9	27	2.3	0.44	22.6	n.d	2.1
	HCO ₃	n.d.	0.72	n.d.	0.26	67	n.d.	0.19
Salinité (S/m)		254	333	277	340	394	296	200

nd : non-déterminé. S/m : Siemens par mètre.

Chapitre 2

Micro-organismes halophiles

1/ Définition

Les microorganismes halophiles sont des organismes qui aiment le sel et qui vivent dans les environnements hypersalins. Ils sont procaryotes ou eucaryotes et ont le pouvoir d'équilibrer la pression osmotique du milieu pour résister aux effets dénaturants des sels (**DasSarma et Arora, 2001**).

Ils sont classés en trois grands groupes selon leurs exigences en sels (**Amal et al., 2019, DasSarma et Arora, 2001**) :

- **Légèrement halophiles** : se développent entre 0,2-0,85 mol/l (2-5% de NaCl)
- **Modérément halophiles** : se développent entre 0,85-3,4 mol/l (5-20% de NaCl)
- **Extrêmement halophiles** : se développent entre 3,4-5,1 mol/l (20-30% de NaCl)

Les microorganismes qui se développent dans des concentrations de sels comprises entre 0-0,85 mol/l (0-5% de NaCl) sont considérés comme **halotolérants** (**Amal et al., 2019**). Ils peuvent vivre en présence et en absence de sels (**DasSarma et Arora, 2001**).

Les non-halophiles prolifèrent optimalement à moins de 0,2 mol/l (2% de NaCl) (**DasSarma et Arora, 2001**).

2/ Habitat

Les microorganismes halophiles ont été trouvés dans divers habitats salins et hypersalins qui sont caractérisés par une teneur élevée de sels (NaCl, KCl, MgSO₄, CaSO₄ et MgCl₂) tels que les lacs de soude, les écosystèmes thalassohalins et athalassohalins, la mer Morte, les sources carbonatées, les lacs salés, les sols alcalins, les mines de sels de Khewra en Asie (Pakistan) (**Sarwar et al., 2015 ; Daoud et Ben Ali, 2020**), les saumures extrêmement alcalines du wadi Natrun en Egypte et le lac Magadi au Kenya (**Kanekar et al., 2012**).

Ils peuvent aussi être trouvés dans d'autres milieux salins et hypersalins tels que les produits alimentaires salés (poissons par exemple) ainsi que les peaux d'animaux traités par le sel pour leur conservation (**Sarwar et al., 2015**).

3/ Diversité des microorganismes halophiles

Les organismes des trois domaines de la vie se sont adaptés pour croître dans les milieux hypersalins mais dès que la concentration du sel augmente, la diversité totale des groupes physiologiques diminue (McGenity et al., 2000).

3.1/ Diversité phylogénétique

Les microorganismes halophiles et halotolérants appartiennent aux trois domaines de la vie : Archaea, Bacteria et Eucarya (Figure 4) (Oren, 2002). Ces microorganismes sont classés selon des méthodes de chimiotaxonomie, d'analyse de séquences multilocus, de taxonomie numérique, de génomique comparative et de protéomique en :

- ❖ Microorganismes légèrement halophiles : représentés par les bactéries et les eucaryotes.
- ❖ Microorganismes modérément halophiles : représentés par les bactéries et les eucaryotes.
- ❖ Microorganismes halophiles extrêmes : représentés par les archées (Sarwar et al., 2015).

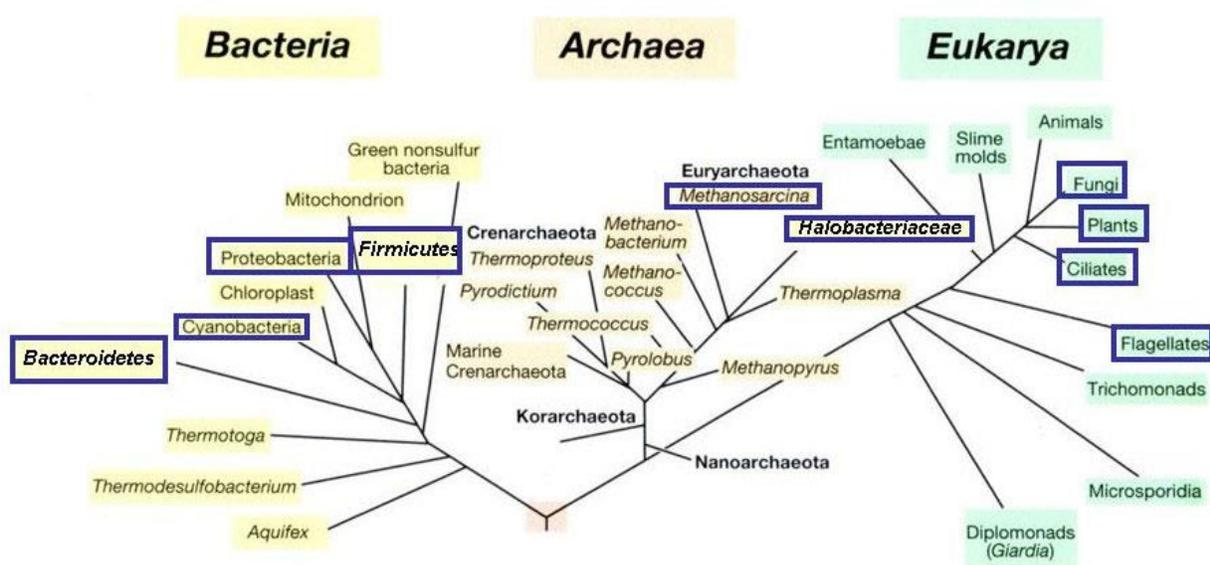


Figure 4 : L'arbre phylogénétique universel de la vie, basée sur les séquences des gènes des petites sous-unités d'ARNr, et de la distribution des organismes halophiles encadrés en bleu dans l'arbre. Les groupes marqués d'un cadre bleu contiennent au moins un représentant halophile (par exemple les Bacteroidetes, dont *Salinibacter ruber* est le seul membre halophile décrit à ce jour) ; d'autres groupes, tels que les Halobacterales, sont entièrement composés d'halophiles (Oren, 2008).

3.1.1/ Domaine Archaea

Jusqu'en 2015, tous les membres des haloarchaea étaient classés dans la classe des Halobacteria qui étaient divisée en un ordre unique, celui des **Halobacteriales** et une seule famille, celle des **Halobacteriaceae** (Kumar et Tiwari, 2019).

Récemment, les signatures protéiques conservées et les signatures d'insertions et de délétions conservées ont été ajoutés comme nouveaux marqueurs phylogénétiques pour la classification des Haloarchées. Et selon cette classification, la classe des Halobacteria, du phylum Euryarchaeota est divisée en trois ordres qui sont : l'ordre des Halobacteriales, Haloferacales et Natrialbales (Kumar et Tiwari, 2019).

- L'ordre des **Halobacteriales** contient trois familles : **Halobacteriaceae** (12 genres, 36 espèces), **Haloarculaceae** (8 genres, 30 espèces) et **Halococcaceae** (1 genre et 9 espèces).
- L'ordre des **Haloferacales** contient deux familles : **Halorubraceae** (7 genres et 50 espèces) et **Haloferacaceae** (8 genres et 37 espèces).
- L'ordre des **Natrialbales** contient une seule famille qui est la famille des **Natrialbaceae** (12 genres et 54 espèces).

Également deux familles de méthanogènes, Methanosarcinaceae et Methanocalculaceae, contiennent des genres d'archées halophiles. De nombreuses études menées dans les environnements hypersalins ont permis d'identifier des genres méthanogènes halophiles habitant ces environnements, notamment *Methanolohalobium*, *Methanohalophilus*, *Methanosalum*, *Methanocalculus* et *Methanosarcina* (Bueno de Mesquita et al., 2021).

Les membres des **Halobacteriaceae** sont aérobies ou anaérobies facultatifs et généralement pigmentés en rouge tandis que les méthanogènes tirent leur énergie d'amines méthylés dans des conditions d'anaérobies (Ak et Biswas, 2017).

3.1.2/ Domaine Bacteria

Plusieurs microorganismes halophiles et halotolérants appartenant au domaine bacteria ont été répartis dans un grand nombre de sous-groupes phylogénétiques (Oren, 2002). Les bactéries modérément ou extrêmement halophiles isolées de divers environnements appartiennent aux espèces incluses dans les phylums suivants : **Proteobacteria**, **Firmicutes**, **Actinobacteria**, **Spirochaetes**, **Bacteroidetes**, **Thermotogae**, **Cyanobacteria** et **Tenericutes**. Les espèces appartenant à ces phylums constituent un assemblage de microorganismes hétérogènes aux

activités physico-chimiques et aux variations morphologiques diverses. Dans l’embranchement des **Proteobacteria**, la classe des Gammaproteobacteria contient le plus grand nombre de genres modérément halophiles et les genres de la famille **Halomonadaceae** sont les mieux étudiés et les plus importants (Ak et Biswas, 2017).

Dans la lignée des bactéries à Gram positif (Firmicutes), on trouve des halophiles aussi bien aérobies (*Bacillus* et organismes apparentes) que anaérobies. Il existe même un ordre contenant uniquement des microorganismes anaérobies halophiles, c’est l’ordre des **Halanaerobiales**. Cet ordre est composé de deux familles qui sont : les **Halanaerobiaceae** et les **Halobacteroidaceae** (Oren, 2002).

3.1.3/ Domaine Eucarya

Dans le domaine Eucarya, les microorganismes halophiles sont rares. En fait, l’algue verte *Dunaliella* est le seul microorganisme eucaryote d’importance, presque omniprésente dans les milieux très salés. Cette algue est le principal ou le seul producteur primaire dans la mer Morte et de nombreux autres lacs et étangs hypersalins (Oren, 2002).

Tableau 2 : Taxonomie des principaux microorganismes halophiles (Kanekar et al., 2012).

	Domaines	Familles	Types de Gram	Genres représentatifs
Prokaryotes	Eubacteria	Halomonadaceae	Gram positive	<i>Halobacillus</i> <i>Marinococcus</i> <i>Salinococcus</i> <i>Nesterenkonia</i> <i>Tetragenococcus</i>
			Gram négative	<i>Halomonas</i> <i>Paracoccus</i> <i>Salinivibrio</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Arhodomonas</i>
	Archaea	Halobacteriaceae	Gram variable	<i>Haloferax</i> <i>Natronomonas</i> <i>Halobacterium</i> <i>Haloarcula</i> <i>Natrialba</i>

4/ Caractéristiques physico-chimiques de croissance des microorganismes halophiles

Les environnements hypersalins sont des milieux typiquement extrêmes, dans lesquels la concentration élevée de sel n'est pas le seul facteur environnemental en mesure de limiter la prolifération des microorganismes. En effet l'oxygène, la température et le pH sont aussi des paramètres qui agissent sur leur croissance. Les microorganismes halophiles vivent généralement dans les environnements qui présentent de faibles concentrations d'oxygène selon la zone géographique, des basses ou hautes températures et une forte alcalinité. D'autres facteurs peuvent également influencer leur croissance comme la pression, la faible disponibilité des nutriments, le rayonnement solaire ou la présence de métaux lourds et d'autres composés toxiques (Ventosa, 2006). Bien évidemment, la concentration en ions du milieu a un impact majeur sur leur croissance. Les microorganismes halophiles sont dits polyextrêmophiles lorsqu'ils sont tolérants à plusieurs facteurs extrêmes comme le pH, la salinité et la température (Dutta et Bandopadhyay, 2022).

Tableau 3 : Conditions de croissance nécessaire pour les microorganismes halophiles (Chandel et Kumari, 2019).

Paramètres	Conditions	Exemples de microorganisme
Sels	La plupart des halophiles ont besoin d'environ 23%	<i>Haloarchae hispanica</i>
Température	Entre 37 et 40 °C	Les espèces de <i>Bacillus</i>
Croissance anaérobique	Quelques souches sont capables de croissance fermentaire et utilisent le nitrate comme source d'électron	<i>Halococcus</i>
pH	Non alkaliphile ; pH 7.5 Alkaliphile ; pH 8.50 à 9	<i>Bacillus cereus</i>
Substrats	Les milieux avec une source de carbone simple comme le glucose ou le glycérol	<i>Halomonas, Halobacterium</i>

5/ Production de pigments par les microorganismes halophiles

Souvent, la prolifération extensive de microorganismes pigmentés dans les bassins de cristallisation comme les salines solaires leurs donnent une couleur rouge (**Sarwar et al., 2015**). Effectivement certains microorganismes halophiles sont pigmentés et sont trouvés généralement dans le domaine des Archaea. C'est l'exemple des Halobacteriales dont la plupart des représentants sont rouge-orange vif, dû à un contenu élevé de pigments caroténoïdes C-50 (α -bactériorubérine et dérivés) dans leur membrane cellulaire. Le rôle de ces pigments caroténoïdes chez *Halobacterium salinarium* est la protection contre les rayons UV et la photoréactivation (**Dworkin et al., 2006 ; Oren, 2002**). L'espèce *Halobacterium salinarium* contient également deux autres pigments, la bactériorhodopsine et l'halorhodopsine (pigments violet). Ces deux pigments ont été découverts pour la première fois chez cette espèce (**Dworkin et al., 2006**).

6/ Adaptation moléculaire des microorganismes halophiles au stress salins

Les microorganismes halophiles utilisent plusieurs mécanismes et stratégies pour résister à la forte pression osmotique exercée par l'environnement hautement salin où ils habitent. Etant donné que les membranes biologiques sont perméables à l'eau, ces microorganismes doivent maintenir leur cytoplasme isoosmotique avec leur environnement. Ceci est possible en maintenant une pression osmotique élevée et une faible concentration de Na^+ à l'intérieur du cytoplasme. Les ions sodiums sont alors transportés hors du cytoplasme autant que possible en utilisant des mécanismes de transport puissants, généralement basés sur des antiports Na^+/H^+ pour expulser les ions sodiums de l'intérieur de la cellule (**Oren, 2002**).

Les microorganismes halophiles utilisent l'un des deux mécanismes d'adaptations suivants pour se protéger contre la dessiccation :

6.1/ Accumulation de KCl (Salt-in)

Une des stratégies consiste à accumuler des ions K^+ et Cl^- pour maintenir l'équilibre osmotique (**Oren, 2002**). Cette stratégie nécessite une forte adaptation de la machinerie enzymatique intracellulaire, car les protéines doivent conserver correctement leur conformation et leur activité en présence de haute teneur en sel. Le protéome de ces organismes est très acide, et la plupart de ces protéines se dénaturent dans un milieu faiblement salé. De ce fait de tels microorganismes "à forte teneur en sel" sont incapables de survivre dans des milieux à faible concentration de sel (**Oren, 2008**). Ce mode d'adaptation osmotique coûte relativement peu d'énergie (**Oren, 2002**).

Cependant, cette stratégie n'est pas largement rependue parmi les différents groupes phylogénétiques des halophiles (**Oren, 2008**).

Les archées halophiles aérobies de l'ordre des Halobacteriales accumulent du KCl à des concentrations aussi élevées que la concentration de NaCl dans leur environnement (**Oren, 2002**). Dans le domaine des bactéries, cette stratégie de "Salt-in" a été premièrement décrit chez l'ordre des Halanaerobiales (Firmicutes), qui est constitué par des bactéries fermentaires anaérobies ou homoacétogènes (produisant de l'acétate par fermentation) (**Oren, 2002**).

Récemment, la stratégie a été identifiée chez la bactérie aérobie *Salinibacter ruber* (Bacteroidetes) (**Oren, 2008**).

6.2/ Production d'osmoprotecteurs (Salt-out)

La deuxième stratégie d'adaptation osmotique consiste à assurer l'équilibre osmotique en excluant autant que possible les sels du cytoplasme tout en accumulant des solutés organiques appelés également solutés compatibles ou osmoprotecteurs. Plusieurs composés sont utilisés pour cela, allant du glycérol et d'autres sucres alcools, des acides aminés, et des dérivés tels que la glycine bêtaïne et l'ectoïne (2-méthyl-1,4,5,6-tétrahydropyrimidine-4-acide carboxylique) et son dérivé le 5-hydroxy ectoïne, aux sucres simples tels que le saccharose et le tréhalose. L'utilisation de cette stratégie, ne nécessite pas des adaptations spécifiques de la machinerie enzymatique intracellulaire comme dans le cas d'accumulation de KCl. Toutefois, la production de ces osmoprotecteurs est coûteuse d'énergie (**Oren, 2002**).

Les microorganismes qui accumulent des solutés compatibles pour assurer l'équilibre osmotique sont généralement trouvés dans :

- Le domaine Bacteria dans l'embranchement des Cyanobacteria, Proteobacteria et des Firmicutes.
- Le domaine Archaea dans la famille des Mathanosarcina (**Oren, 2008**).

Il existe en général trois catégories chimiques d'osmolytes organiques qui sont : les solutés zwitterioniques, les solutés non chargés et les solutés anioniques (**Kanekar et al., 2012, Jadhav et al., 2018**).

6.2.1/ Les solutés zwitterioniques

De nature neutre, les solutés zwitterioniques sont des dérivés d'acides aminés. Ils sont synthétisés comme produit intermédiaire dans le métabolisme cellulaire. Ce sont des molécules dipolaires (avec des charges positives et négatives séparées dans l'espace) et sont exclues de l'enveloppe d'hydratation des macromolécules (**Jadhav et al., 2018**). Plusieurs cellules bactériennes et archaïques produisent et accumulent des solutés zwitterioniques comme solutés compatibles (**tableau 4**) (**Kanekar et al., 2012**).

6.2.2/ Les solutés non chargés

Les solutés non chargés sont des molécules polaires dépourvues de charges. Ils ont été identifiés chez de nombreuses bactéries, archées et eucaryotes halophiles. Il s'agit de glucides et d'acides aminés/dipeptides (**tableau 5**) (**Kanekar et al., 2012**).

6.2.3/ Les solutés anioniques

Le groupe le plus diversifié d'osmolytes des microorganismes halophiles et halotolérants est celui des solutés anioniques. Ce sont des formes modifiées d'osmolytes organiques que l'on trouve chez les microorganismes moins tolérants au sel. Dans la plupart des cas, une charge négative est acquise par les osmolytes organiques non chargés grâce à l'acquisition d'un groupe carboxylate, sulfate ou phosphate. Les solutés ainsi chargés négativement peuvent équilibrer un taux élevé de K⁺ intracellulaire et contrecarrer la pression osmotique (**tableau 6 et 7**) (**Jadhav et al., 2018, Kanekar et al., 2012**).

Tableau 4 : Solutés zwitterioniques accumulés dans les cellules des microorganismes halotolérants et halophiles (Kaneekar et al., 2012).

Nature du soluté zwitterionique	Microorganismes halophiles et halotolérants producteurs
Bétaïne	<i>Thioalkalivibrio versutus</i> <i>Actinopolyspora halophila</i> <i>Halorhodospira halochloris</i> <i>Methanohalophilus portulcalensis</i> FDF1 <i>Methanosarcina thermophila</i> <i>Synechococcus sp. DUN 52</i>
Ectoïne	<i>Sporosarcina pasteurii</i> <i>Brevibacterium epidermidis</i> <i>Thioalkalimicrobium aerophilum</i> <i>Vibrio cholerae</i> et <i>V. costicola</i> <i>Chromohalobacter israelensis</i> et <i>C. salexigens</i> <i>Halorhodospira halochloris</i> <i>Halomonas elongate</i> et <i>H. variabilis</i> <i>Methylarcula marina</i> et <i>M. terricola</i> <i>Methylophaga alcalica</i> et <i>M. natronic</i>
Hydroxyectoïne	<i>Halomonas elongata</i> <i>Nocardiopsis halophila</i>
N-γ-acétyl-diamino-butyrates	<i>Halomonas elongata</i> CHR63
N-ε-acétyl-β-lysine	<i>Methanosarcina thermophila</i> <i>Methanothermococcus thermolithotrophicus</i> <i>Methanosarcina mazei</i> Gö1 <i>Methanohalophilus portulcalensis</i> FDF1 <i>Methanohalophilus Z7302</i>
β-glutamine	<i>Methanohalophilus portulcalensis</i> FDF1

Tableau 5 : Solutés non chargés accumulés dans les microorganismes halotolérants et halophiles (Kanekar et al., 2012).

Nature des solutés non chargés	Microorganismes halophiles et halotolérants producteurs
α-Glucosylglycérol	Cyanobactéries marine et d'eau douce : <i>Synechocystis</i> sp. <i>Microcystis firma</i> Eubactéries phototrophes : <i>Rhodovulum sulfidophilum</i> , <i>Pseudomonas mendocina</i> , <i>P. pseudoalcaligenes</i> , <i>Stenotrophomonas</i>
α-Mannosylglyceramide	<i>Rhodothermus marinus</i> (<i>R.obamensis</i>)
Tréhalose	<i>Actinopolyspora halophila</i> <i>Chromohalobacter israelensis</i> <i>Desulfovibrio halophilus</i> <i>Rhodothermus obamensis</i> <i>Natrialba magadii</i>
Sucrose	Divers cyanobactéries (<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 <i>Anabaena</i> spp) et protéobactéries
N-α-carbamoyl-L-glutamine 1-amide	<i>Ectothiorhodospira mobilis</i> (<i>marismortui</i>)
N-acétylglutaminyl-glutamine amide	<i>Sinorhizobium meliloti</i> <i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 Bactéries sulfureuses pourpres

Tableau 6 : Solutés anioniques (carboxylates) accumulés dans les microorganismes halotolérants et halophiles (Kanekar et al., 2012).

Nature des solutés anioniques		Microorganismes halophiles et halotolérants producteurs
Carboxylates	L- α -glutamate	<i>Halomonas elongata</i> <i>Methanohalophilus portucalensis</i> - FDF1 <i>Halobacterium</i> sp. NRC-1 <i>Halobacterium salinarum</i>
	β -Glutamate	<i>Methanothermococcus thermolithotrophicus</i> <i>Methanocaldococcus jannaschii</i> <i>Methanotorris igneus</i> <i>Nocardiopsis halophila</i>
	Hydroxybutyrate	<i>Photobacterium profundum</i>
	Poly- β -hydroxy butyrate	<i>Photobacterium profundum</i> <i>Methylarcula marina</i> <i>Methylarcula terricola</i>
	α -Glucosylglycerate	<i>Agmenellum quadruplicatum</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Methanohalophilus portucalensis</i> FDF1
	α -Mannosylglycerate	<i>Methanothermus fervidus</i> <i>Pyrococcus efurius</i> <i>Rhodothermus marinus</i> (<i>R. obamensis</i>)

Tableau 7 : Solutés anioniques (phosphate et Sulfate) accumulés dans les microorganismes halotolérants et halophiles (Kanekar et al., 2012).

Nature des solutés anioniques		Microorganismes halophiles et halotolérants producteurs
Phosphate	α -Diglycerol phosphate	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>
	Di-myo-inositol-1, 1'-phosphate	<i>Archaeoglobus fulgidus</i> <i>Methanotorris igneus</i> <i>Pyrococcus furiosus</i> et <i>P. woesei</i> <i>Pyrodictium occultum</i> <i>Thermotoga maritima</i> <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> H <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> Marburg.
	Mannosyl-di-myo-inositol-1, 1'-phosphate	<i>Thermotoga maritima</i> <i>Thermotoga neapolitana</i>
	Cyclic – 2, 3-diphosphoglycerate	<i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i> <i>Methanopyrus kandleri</i> <i>Methanothermus fervidus</i>
Sulfate	Sulfotrèhalose	<i>Natronococcus occultus</i> <i>Natronobacterium</i> sp.

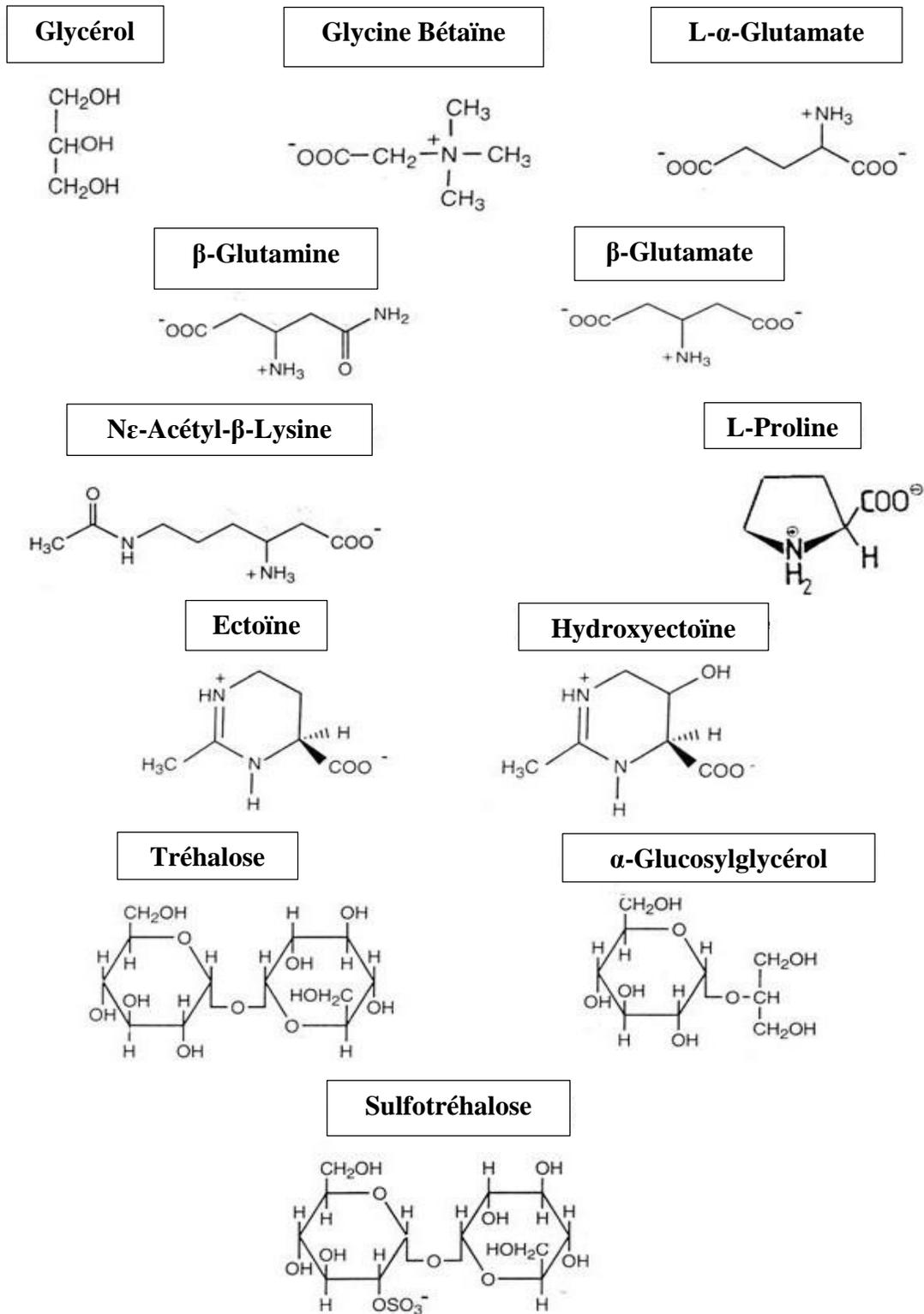


Figure 5 : Structures chimiques de quelques solutés compatibles produits par des microorganismes halophiles et halotolérants (Oren, 2008).

7/ Applications industrielles

Les solutés compatibles ont été employés par les industries pour des applications biotechnologiques. Parmi lesquelles nous avons :

- Cryoprotecteur en thérapeutique : maintenir la viabilité des produits en les protégeant contre le froid.
- Dans les produits cosmétiques et pharmaceutiques : c'est l'exemple de l'ectoïne, utilisé dans la cosmétique, car c'est une molécule capable de protéger la peau humaine contre l'action des UV afin de prévenir les dommages cellulaires. Et aussi de la bétaine, qui est utilisé au stade initial de la cirrhose comme traitement.
- L'amélioration de la PCR : les molécules d'ADN riche en GC% nécessitent une température de fusion plus élevée. Et l'ajout de molécule qui augmente la thermostabilité s'est avéré utile pour l'amplification par PCR. Plusieurs osmolytes améliorent l'amplification par PCR des molécules d'ADN riche en GC.
- La stabilisation des protéines et des acides nucléiques : grâce à leur propriété de pouvoir interagir avec les molécules intracellulaires, ces molécules sont exploitées dans la biotechnologie pour protéger les protéines et les acides nucléiques contre la dessiccation.
- La génération d'une résistance au stress des microorganismes non halotolérants (**Jadhav et al., 2018**).

Matériel et Méthodes

1/ Échantillonnage

L'échantillon du sol salin a été prélevé le 12 Février 2023 à partir de la Sebka de Ain Yagout qui est localisée dans la commune de Ain Yagout (Wilaya de Batna) (**figure 6**). Elle est située à 35 km au nord-est du chef-lieu de la ville de Batna et à 84 km au sud-ouest de la ville de Constantine. Le prélèvement s'est déroulé dans une zone située à 30 m de l'autoroute. Les 5 premiers centimètres du sol salin ont été écartés puis 100g ont été prélevés et mis dans une boîte en plastique neuve et stérile en utilisant une spatule métallique stérile. L'échantillon de sol a été ensuite conservé au réfrigérateur à une température de 4°C jusqu'à son utilisation.



Figure 6 : Photographie représentant le site d'échantillonnage (Sebka de Ain Yagout).

2/ Isolement, purification et conservations des bactéries halophiles

2.1/ Milieux de culture utilisés

Il est connu que les bactéries halophiles ont des exigences variables en matière de nutriment. De ce fait trois différents milieux de culture ont été préparés et utilisés afin de les isoler (**figure 7**). La composition de ces milieux de culture est mentionnée en **annexe**. Les milieux ont été ensuite stérilisés à l'autoclave.

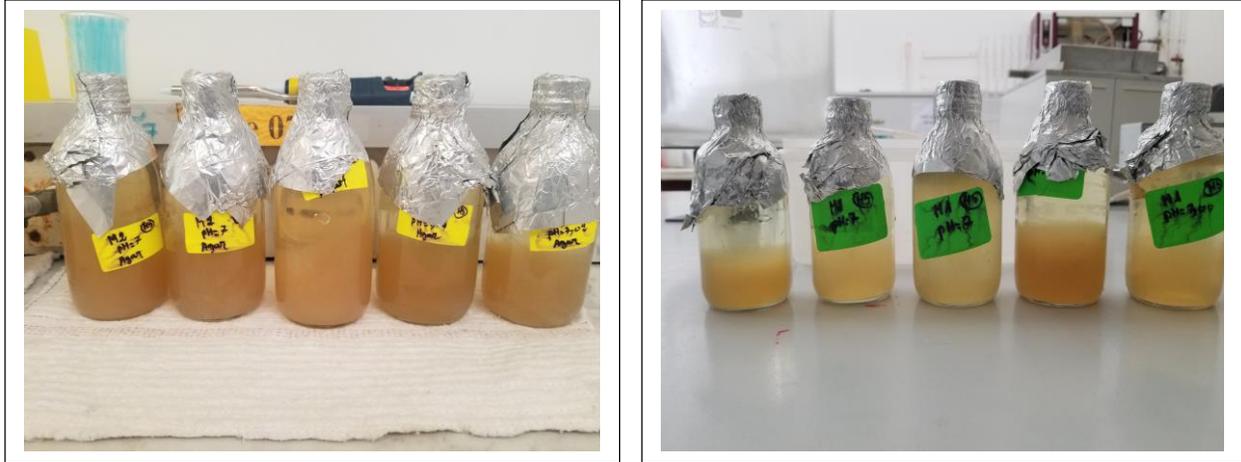


Figure 7 : Photographie des milieux de culture utilisées pour l'isolement des bactéries halophiles.

2.2/ Isolement

La solution mère a été préparée en pesant et puis en transférant 1g de sol salin dans 9 ml d'eau physiologique stérile ce qui permet d'obtenir une dilution de 10^{-1} . Ensuite en utilisant cette suspension mère, deux autres dilutions décimales ont été réalisées (10^{-2} et 10^{-3}). Le tout a été vigoureusement agité en utilisant un agitateur vortex, jusqu'à homogénéisation complète des suspensions.

L'isolement a été ensuite effectué en étalant 0,1 ml de la solution mère et de ses dilutions (10^{-2} et 10^{-3}) sur des boites de Pétri contenant les trois milieux de cultures et incubés à 37°C pendant 7 jours à 3 semaines.

2.3/ Dénombrement des colonies

À partir de chaque boite, le dénombrement a été effectué en utilisant un compteur de colonies (figure 8).



Figure 8 : Photographie du compteur de colonies.

2.4/ Purification et conservation des bactéries halophiles

La purification des bactéries halophiles a été réalisée par repiquage. Chaque colonie a été repiquée sur le même milieu sur lequel elle s'est développée. Cette opération a été répétée plusieurs fois afin d'avoir des colonies pures.

De chaque milieu, des colonies d'aspects différentes ont été prélevées, purifiées et incubées à 37°C. Les souches pures ont été ensuite conservées sur gélose inclinée contenant le même milieu d'isolement à 4°C pendant trois mois.

3/ Identification

L'identification des bactéries est un processus assez complexe car elle nécessite la réalisation de plusieurs analyses et tests, allant des examens macroscopiques et microscopiques aux tests d'identification biochimique, physiologique et enzymatique.

3.1/ Examen macroscopique

L'examen macroscopique des colonies est le premier examen réalisé après l'étape de la purification. L'apparence des colonies dépend de plusieurs facteurs à savoir le milieu utilisé, ainsi que la durée et la température de l'incubation. Il n'est décrit convenablement qu'avec des colonies bien isolées.

Dans la description des colonies on s'est basé sur les caractères suivants :

- Le diamètre de la colonie.
- La forme de la colonie : circulaire, ovoïde etc.
- Le contour : dentelé, déchiqueté, régulier et irrégulier etc.
- Le relief ou la surface de la colonie : bombée, demi-bombée, plate, surélevée, ombiliquée etc.
- L'aspect de la colonie : lisse ou rugueux.
- La consistance : crémeuse, sèche, grasse ou muqueuse. Elle est décelée au moment du prélèvement par l'outil de prélèvement (anse de platine).
- La couleur (pigmentation) de la colonie : jaune, rouge, orange, violette, beige etc.
- La présence d'un pigment diffusible dans la gélose.

3.2/ Examen microscopique

Deux types d'examen microscopique ont été réalisés : l'observation à l'état frais et l'observation après coloration de Gram (**Galisteo et al., 2019**).

3.2.1/ Observation à l'état frais

Elle consiste à déposer entre lame et lamelle une goutte de la suspension de la bactérie halophile afin de pouvoir observer la forme, le mode de regroupement et la mobilité des cellules bactériennes. L'observation a été réalisée à l'aide d'un microscope optique à l'objectif x40.

3.2.2/ Observation après coloration de Gram

La coloration de Gram est une coloration de base en bactériologie. Elle permet de différencier deux groupes principaux de bactéries : les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif.

Pour bien accomplir la méthode, il faut suivre les 4 étapes principales suivantes :

3.2.2.1/ Préparation du frottis

À l'aide d'une pipette Pasteur, une goutte de la suspension bactérienne a été déposée sur une lame neuve et propre puis étalée par des mouvements circulaires ou de va et vient sur toute la surface de la lame. Après un séchage à l'air libre, la lame a été tenue par une pince stérile et flambée par des passages répétitifs à travers la flamme bleue du bec Bunsen. Le frottis est ainsi fixé.

3.2.2.2/ Coloration

- ❖ **Coloration primaire** : sur frottis fixé, la lame a été recouverte de violet de Gentiane pendant 1 minute. Puis le violet de Gentiane a été jeté.
- ❖ **Mordantage** : la lame a été recouverte de Lugol pendant 1 minute. Puis le Lugol a été jeté.
- ❖ **Décoloration** : la lame a été décolorée à l'alcool jusqu'à ce qu'elle soit claire. Puis rincée avec de l'eau distillée.
- ❖ **Coloration secondaire** : la lame a été recouverte de Fuchsine pendant 30 secondes à 1 minute puis rincée à l'eau distillée et séchée entre deux feuilles de papier filtre.

3.2.2.3/ Observation microscopique

L'observation s'est réalisée après la mise d'une goutte d'huile d'immersion sur le frottis, à l'objectif x100. Ainsi, les bactéries à Gram positif apparaîtront colorées en violet et les bactéries à Gram négatif en rose.

3.3/ Tests d'identification biochimique

3.3.1/ Recherche de la catalase

➤ Principe

La catalase est une enzyme qui permet d'éliminer le peroxyde d'hydrogène, qui est un composé très toxique chez les bactéries, en eau et en oxygène. Ainsi ce test permet de mettre en évidence la présence de la catalase chez une espèce bactérienne.

➤ Méthode

Une goutte d'eau oxygénée (H_2O_2) a été déposée aseptiquement sur une lame neuve et propre. Ensuite une colonie pure de bactérie halophile a été prélevée et émulsionnée dans la goutte à l'aide d'une anse de platine préalablement stérilisée et refroidie (Yin et al., 2022).

➤ Lecture

La formation immédiate de bulle d'air indique une réaction positive, ce qui signifie que la bactérie est catalase positive et dans le cas contraire, la bactérie est considérée comme catalase négative.

3.3.2/ Recherche de l'oxydase

➤ Principe

Ce test permet de détecter l'enzyme cytochrome oxydase chez les bactéries. L'oxydase est une enzyme qui catalyse une réaction d'oxydo-réduction dans laquelle une molécule de dioxygène (O_2) est utilisée comme accepteur d'électron.

➤ Méthode

À l'aide d'une anse de platine préalablement stérilisée et refroidie, une colonie bactérienne halophile pure a été prélevée et déposée sur un disque oxydase (Yin et al., 2022).

➤ Lecture

Une coloration violette immédiate signifie une réaction positive. Et si le disque reste incolore alors la réaction est considérée négative.

3.3.3/ Usage de la galerie classique pour l'étude de différents types de métabolismes

La galerie classique est un ensemble de tests réalisés pour permettre une identification des bactéries. Les divers tests réalisés concernent le métabolisme glucidique et le métabolisme protéique (Galisteo et al., 2019).

3.3.3.1/ Métabolisme glucidique

3.3.3.1.1/ Citrate de Simmons

➤ Principe

Le milieu citrate de Simmons est utilisé pour mettre en évidence les bactéries qui utilisent le citrate comme source de carbone. En effet, les bactéries possédant seulement la citrate perméase peuvent croître sur ce milieu.

➤ Méthode

L'ensemencement a été réalisé par des stries serrées à l'aide d'une anse de platine préalablement stérilisée et refroidie en utilisant une suspension bactérienne dense préparée avec des colonies jeunes. Le tube a été ensuite incubé à 37°C. L'examen s'est fait jusqu'au 5^{ème} jour d'incubation (Galisteo et al., 2019).

➤ Lecture

Une réaction positive est traduite par une croissance avec virage de la couleur du vert au bleu intense dans la pente, ce qui démontre que la bactérie utilise le citrate comme unique source de carbone. Par contre si la couleur du milieu reste inchangée et avec croissance de la bactérie, cela signifie que la bactérie est citrate négative.

3.3.3.1.2/ Mannitol-mobilité

➤ Principe

Ce milieu permet à la fois de mettre en évidence la fermentation du mannitol et de déceler la mobilité de la bactérie à identifier.

➤ Méthode

Ce milieu a été ensemencé par piqure centrale à partir de la suspension bactérienne en utilisant une pipette Pasteur boutonnée préalablement flambée et refroidie puis incubé à 37°C pendant 5 jours.

➤ **Lecture**

Une réaction est considérée positive pour le mannitol, s'il y a virage du milieu du rouge vers le jaune. Elle est considérée comme négative si le milieu reste rouge.

La mobilité est caractérisée par la diffusion de la bactérie à partir du centre du milieu gélosé.

3.3.3.1.3/ Test ONPG

➤ **Principe**

Ce test a pour but de rechercher une enzyme clé du métabolisme du lactose : la β -galactosidase qui est capable d'hydrolyser le lactose en glucose et galactose. Cette enzyme a la particularité d'hydrolyser tous les analogues du lactose. De ce fait l'ONPG (l'Ortho Nitro Phényl Galactopyranoside) qui est un analogue du lactose est utilisé. L'hydrolyse de l'ONPG par la β -galactosidase donne du galactose et de l'orthonitrophénol (ONP), un composé de couleur jaune.

➤ **Méthode**

Un disque ONPG a été placé aseptiquement dans une suspension bactérienne jeune réalisée dans un tube et incubé à 37°C pendant 5 jours.

➤ **Lecture**

Une coloration jaune indique un résultat positif.

3.3.3.1.4/ Réaction sur gélose TSI

➤ **Principe**

C'est un milieu qui permet de démontrer la capacité fermentative d'une bactérie. Ce milieu permet en effet de mettre en évidence la fermentation du glucose avec ou sans production de gaz, du lactose et/ou du saccharose ainsi que la réduction du sulfate en sulfure.

➤ **Méthode**

Le milieu TSI a été ensemencé par des stries serrés à la surface (pente) de la gélose et par piqueur centrale dans le culot puis incubé à 37°C pendant 5 jours (**Galisteo et al., 2019**).

➤ Lecture

Différentes interprétations sont possibles :

- **Pour la pente, si la couleur est :**
 - Jaune : il y'a fermentation du lactose et/ou du saccharose (résultat positif).
 - Inchangée : il n'y a une absence de fermentation du lactose et/ou du saccharose (résultat négatif).
- **Pour le culot, si la couleur est :**
 - Jaune : il y'a une fermentation du glucose (résultat positif).
 - Inchangé : il y'a une absence d'une fermentation du glucose (résultat négatif).
 - Noire : formation de sulfure d'hydrogène.
- S'il y a présence de bulles d'air ou des fissures : il y'a formation de gaz à partir du glucose.

3.3.3.2/ Métabolisme protéique

3.3.3.2.1/ Recherche des décarboxylases (ADH, ODC, LDC)

➤ Principe

Ce test est utilisé pour la mise en évidence des enzymes de décarboxylation d'acides aminés qui sont : l'arginine, la lysine et l'ornithine.

➤ Méthode

Le test a été réalisé dans trois tubes, contenant chacun un des 3 acides aminés dissous dans un bouillon MOELLER (glucose-peptone). Les trois tubes ainsi qu'un tube témoin (sans acide aminé) ont été inoculés, isolés de l'air par une couche de vaseline stérile, et incubés pendant 5 jours à 37°C et examinés quotidiennement (**Galisteo et al., 2019**).

➤ Lecture

Les bactéries métabolisent d'abord le glucose, le milieu est alors acidifié et vire au jaune grâce à un indicateur de pH. Si les acides aminés sont à leur tour décarboxylés, le milieu est alors alcalinisé et devient violet pourpre. Dans le cas contraire, il reste jaune comme le tube témoin.

3.3.3.2.2/ Métabolisme de l'urée

➤ Principe

Ce test a été réalisé pour mettre en évidence l'enzyme uréase chez la bactérie à identifier. L'uréase est une enzyme synthétisée par les bactéries afin d'utiliser l'urée comme seule source d'azote.

➤ Méthode

Un tube contenant le bouillon urée indole a été inoculé avec 0,5 ml d'une suspension bactérienne jeune et incubé à 37°C pendant 5 jours (Galisteo *et al.*, 2019).

➤ Lecture

Une réaction positive se traduit par un changement de couleur du milieu, du jaune vers le rouge violacé.

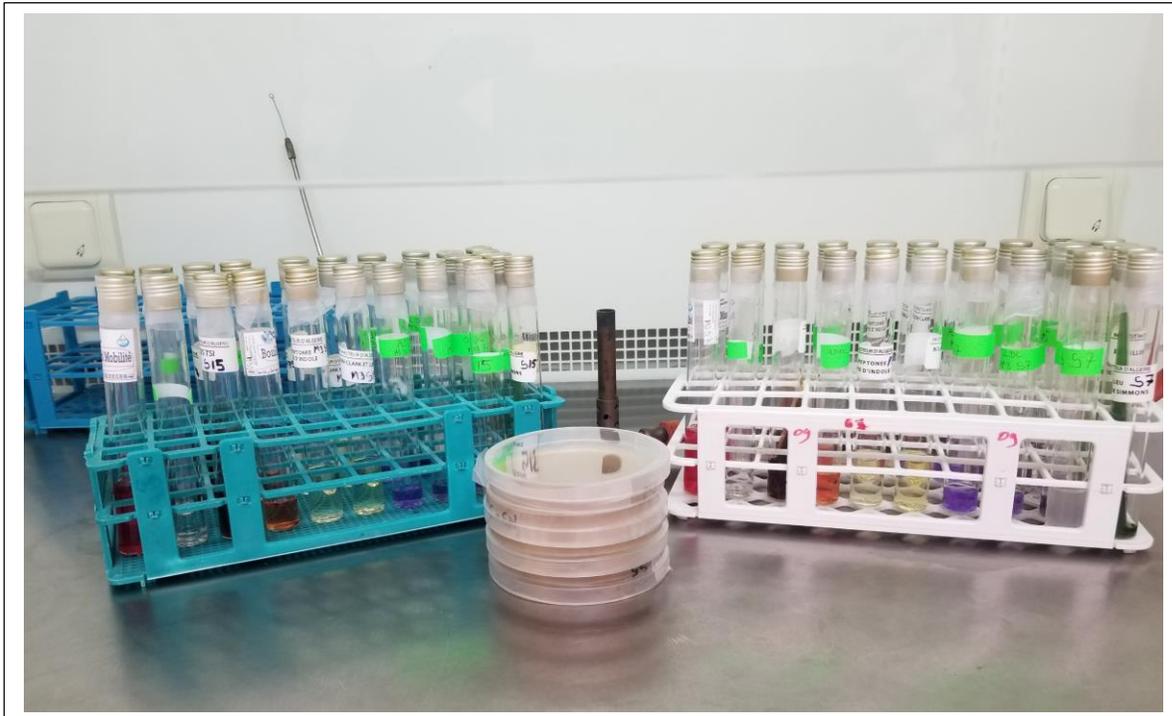


Figure 9 : Photographie représentant les tests biochimiques réalisés sur des souches halophiles isolées de la Sebkhha de Ain Yagout (Usage de la galerie classique).

3.3.4/ Usage de la galerie API 20NE

➤ Principe

La galerie API 20NE est composée de 20 micro-tubes contenant des milieux et substrats déshydratés. Ce sont des tests rapides (8 tests conventionnels et 12 tests d'assimilations) conseillés pour l'identification des bactéries halophiles. Une suspension bactérienne saline (0,85%) est utilisée pour inoculer les tests dits conventionnels. Ainsi, les réactions se traduisent par des virages de couleur spontanés ou révélés en y ajoutant des réactifs. Quant aux tests d'assimilation, un milieu minimum préalablement ensemencé avec la suspension bactérienne est utilisé, et les bactéries prolifèrent uniquement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant (**Castro et al., 2018**).

➤ Méthode

Le mode d'emploi de la galerie API 20NE est comme suit :

- **Préparation de la galerie :** Pour bien accomplir cette étape il faut :
 - Remplir les alvéoles avec de l'eau distillée pour créer une atmosphère humide.
 - Inscrire les références de la souche bactérienne halophile sur la languette latérale de la boîte.
 - Déposer la galerie dans sa boîte d'incubation.
- **Préparation de l'inoculum**

Une suspension bactérienne a été préparée dans de l'eau physiologique stérile (à 0,85% de NaCl). La turbidité de la suspension bactérienne a été mesurée avec un spectrophotomètre réglé à 625 nm et la valeur lue doit être comprise entre 0.08 à 0.1 ce qui correspond à une opacité de 0.5 MacFarland et une concentration de 1.5×10^8 UFC/ml. L'opacité a été ajustée soit par l'ajout de l'eau physiologique stérile, si la suspension est dense, ou par l'ajout de la colonie bactérienne halophile si la suspension est diluée.

- **Inoculation de la galerie**

Elle comprenait deux parties :

1^{ère} partie

Pour les tests du NO₃ à PNPG (**figure 10**), seules les tubes des tests ont été uniquement remplis avec la suspension bactérienne en évitant la formation de bulles (et non pas les cupules).

Pour les tests **GLU**, **ADH**, **URE**, les tubes ont été remplis avec la suspension et les cupules avec de l'huile de paraffine ou de vaseline afin de créer une anaérobiose.



Figure 10 : Photographie de la galerie API 20NE avant ensemencement (tests conventionnels : de NO₃ à PNPG).

2^{ème} partie

200 µl (4 à 8 gouttes) de la suspension bactérienne précédente ont été transférés, dans une ampoule AUX Medium à l'aide d'une micropipette puis homogénéisée avec un agitateur Vortex. À partir de cette suspension, **les tubes et les cupules** des tests **GLU** à **PAC** ont été remplis avec une micropipette en veillant à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe, mais jamais concave et en évitant la formation de bulle d'air (**figure 11**).



Figure 11 : Photographie de l'ampoule AUX Medium (à gauche) et de la galerie API 20NE avant ensemencement (test d'assimilation : de GLU à PAC) (à droite).

- **Incubation**

Une fois la galerie API 20NE estensemencée la boîte d'incubation est fermée et placée dans l'étuve à 37° C.

- **Lecture et interprétation des résultats**

La lecture s'est réalisée après 24h d'incubation, et puis après 48h d'incubation.

- **Lecture après l'ajout des réactifs**

- Les réactifs Nit 1 et Nit 2 ont été ajoutés dans la cupule du test NO₃. Après 5 min, une réaction positive se traduit par un virage au rouge ou au rose. Une réaction est considérée comme négative si le milieu devient jaune. Pour confirmer la négativité de la réaction, de la poudre de zinc a été ajoutée dans le milieu, si le milieu devient rouge, la réaction est donc négative et dans le cas où le milieu reste jaune, la réaction est considérée comme positive.
- Le réactif de KOVACS a été ajouté dans la cupule du test TRP. Si le milieu devient rose immédiatement, la réaction est considérée comme positive.

- **Lecture directe (sans ajout de réactifs)**

- Pour GLU, si le milieu devient jaune, la réaction est considérée comme positive mais par contre s'il devient bleu ou vert, elle est négative.
- Pour ADH et URE, une réaction positive se traduit par un virage à l'orange, le rouge ou la rose alors qu'une réaction négative se traduit par une couleur jaune.
- Pour ESC, les couleurs gris, marron, noir signifient une réaction positive et une couleur jaune signifie une réaction négative.
- Pour GEL, une réaction positive se traduit par la diffusion du pigment noir dans le tube du test.
- Pour le PNPG, la réaction est considérée comme positive s'il y'a un virage du milieu vers le jaune.
- Pour les tests allant de GLUC à PAC, le trouble caractérise la réaction positive et la transparence caractérise la réaction négative.

4/ Tests enzymatiques

➤ Principe

Les tests enzymatiques ont pour but de mettre en évidence la production d'une enzyme spécifique par une bactérie donnée.

➤ Méthode

Un milieu de base additionnée de 1% de substrat : L-asparagine, L-glutamine, chitine et tyrosine pour a été utilisé pour l'étude des enzymes : **L-asparaginase**, **L-glutaminase**, **chitinase** et la **tyrosinase** respectivement. La composition de ce milieu de base est mentionnée dans l'**annexe 2**. Le rouge de phénol a été utilisé comme indicateur de pH dans les deux milieux utilisés pour la recherche et la mise en évidence de la L-asparaginase et de la L-glutaminase.

Les différents milieux ont ensuite été ensemencés par une strie longitudinale de la bactérie halophile pure et incubés à 37 °C pendant 24h à 7 jours.

➤ Lecture

Pour la recherche de la **chitinase**, une réaction positive se traduit par l'apparition d'une auréole clair autour de la strie et l'absence d'auréole indique une réaction négative.

Pour la recherche de la **tyrosinase**, un résultat positif se traduit par une auréole marron ou noir autour de la strie. L'absence d'auréole est un résultat négatif.

En ce qui concerne la **L-glutaminase** et La **L-asparaginase**, la réaction est considérée comme positive s'il y a virage de la couleur du milieu, du rouge vers le violet. Dans le cas d'une absence de virage de couleur du milieu, la réaction est considérée comme négative.

Résultats et discussion

1/ Isolement

Notre choix s'est porté sur la Sebkha de Ain Yagout-Batna, car aucune étude n'a été réalisée sur l'isolement, l'identification et la caractérisation des bactéries halophiles à partir de cet écosystème d'après nos recherches bibliographiques, ce qui rend notre étude originale par rapport au site d'échantillonnage. Les résultats de l'isolement des colonies bactériennes contenues dans 1g d'échantillon du sol salin de la Sebkha d'Ain Yagout sur les trois différents milieux M1, M2 et M3 sont mentionnés dans les **figures 12 et 13**.

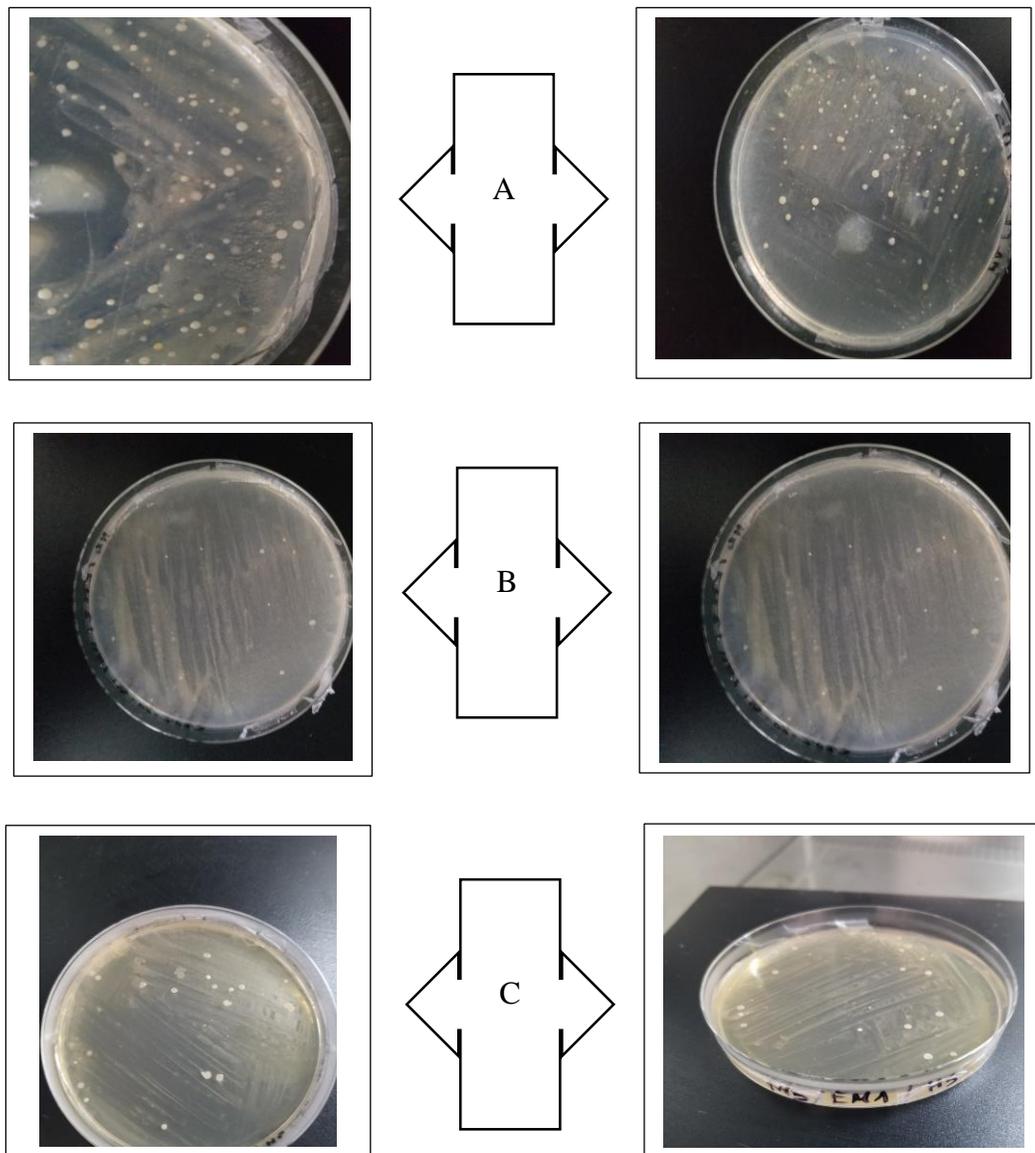


Figure 12 : Photographies représentant des colonies issues de l'ensemencement de l'échantillon mère : sur le milieu M1 (A), sur le milieu M2 (B), et sur le milieu M3 (C).

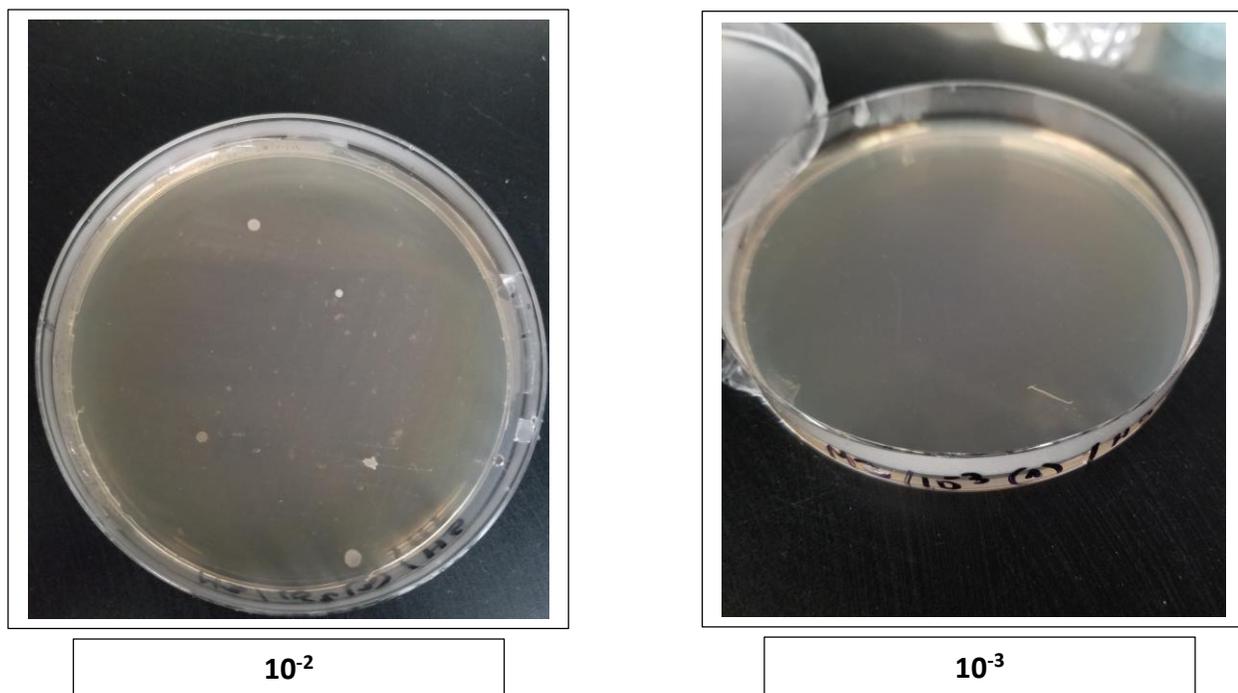


Figure 13 : Photographies représentant des colonies issues de l'ensemencement des dilutions 10^{-2} et 10^{-3} sur le milieu M3.

Les colonies ont montré différents aspects cultureux (formes, couleurs etc.) présentant ainsi une grande diversité des bactéries halophiles dans un même environnement.

2/ Dénombrement

Les résultats du dénombrement des colonies contenues dans 1g d'échantillon du sol salin du sebkha d'Ain Yagout sur les trois différents milieux M1, M2 et M3 sont mentionnés dans les tableaux 8, 9 et 10.

Tableau 8 : Résultats de dénombrement des colonies halophiles sur le milieu M1 après 21 jours d'incubation.

Dilution	Échantillon mère (10^{-1})			10^{-2}			10^{-3}		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Boîtes	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Nombre de colonies (exprimé en Unité Formant Colonie)	229	219	224	14	18	16	1	1	1
	224			16			1		

Résultats et discussion

Tableau 9 : Résultats de dénombrement des colonies halophiles sur le milieu M2 après 21 jours d'incubation.

Dilution	Échantillon mère (10^{-1})			10^{-2}			10^{-3}		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Boîtes	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Nombre de colonies (exprimé en Unité Formant Colonie)	8	13	15	0	2	1	0	0	0
	12			1			0		

Tableau 10 : Résultats de dénombrement des colonies halophiles sur le milieu M3 après 21 jours d'incubation.

Dilution	Échantillon mère (10^{-1})			10^{-2}			10^{-3}		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Boîtes	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Nombre de colonies (exprimé en Unité Formant Colonie)	23	30	26	3	2	5	0	0	0
	26			3			0		

Le milieu M1 a permis d'isoler le plus grand nombre de bactéries halophiles à partir de l'échantillon mère avec une moyenne de 224 de colonies de bactéries halophiles, ensuite suit le milieu M3 avec une moyenne d'à peu près de 26 colonies de bactéries halophiles. Le milieu M2 a permis par contre l'isolement d'une moyenne de 12 colonies bactéries halophiles.

Pour la dilution 10^{-2} , sur le milieu M1, 16 bactéries halophiles en moyenne ont pu se développer. Une unique colonie de bactérie halophile s'est développée sur le milieu M2. Ce nombre s'est triplé pour avoir trois colonies sur le milieu M3.

Concernant la dilution 10^{-3} seulement sur le milieu M1, une seule colonie bactérienne a pu croître en moyenne.

D'après ces résultats, on constate que le milieu M1 s'est révélé plus efficace pour l'isolement de nos bactéries halophiles, ensuite vient le milieu M3. Le milieu M2 par contre a donné le plus faible nombre de bactéries halophiles. De ce fait, notre choix s'est porté sur l'étude des bactéries halophiles issues des milieux M1 et M3.

3/ Purification

La purification est une étape indispensable avant d'identifier une bactérie. Elle permet d'obtenir des colonies bien séparées et isolées ce qui permet une identification, précise et correcte de la

Résultats et discussion

bactérie. Les photos ci-dessous montrent les résultats de la purification de quelques souches de nos bactéries halophiles isolées de la Sebkhha d'Ain Yagout sur les deux milieux de culture M1 et M3.

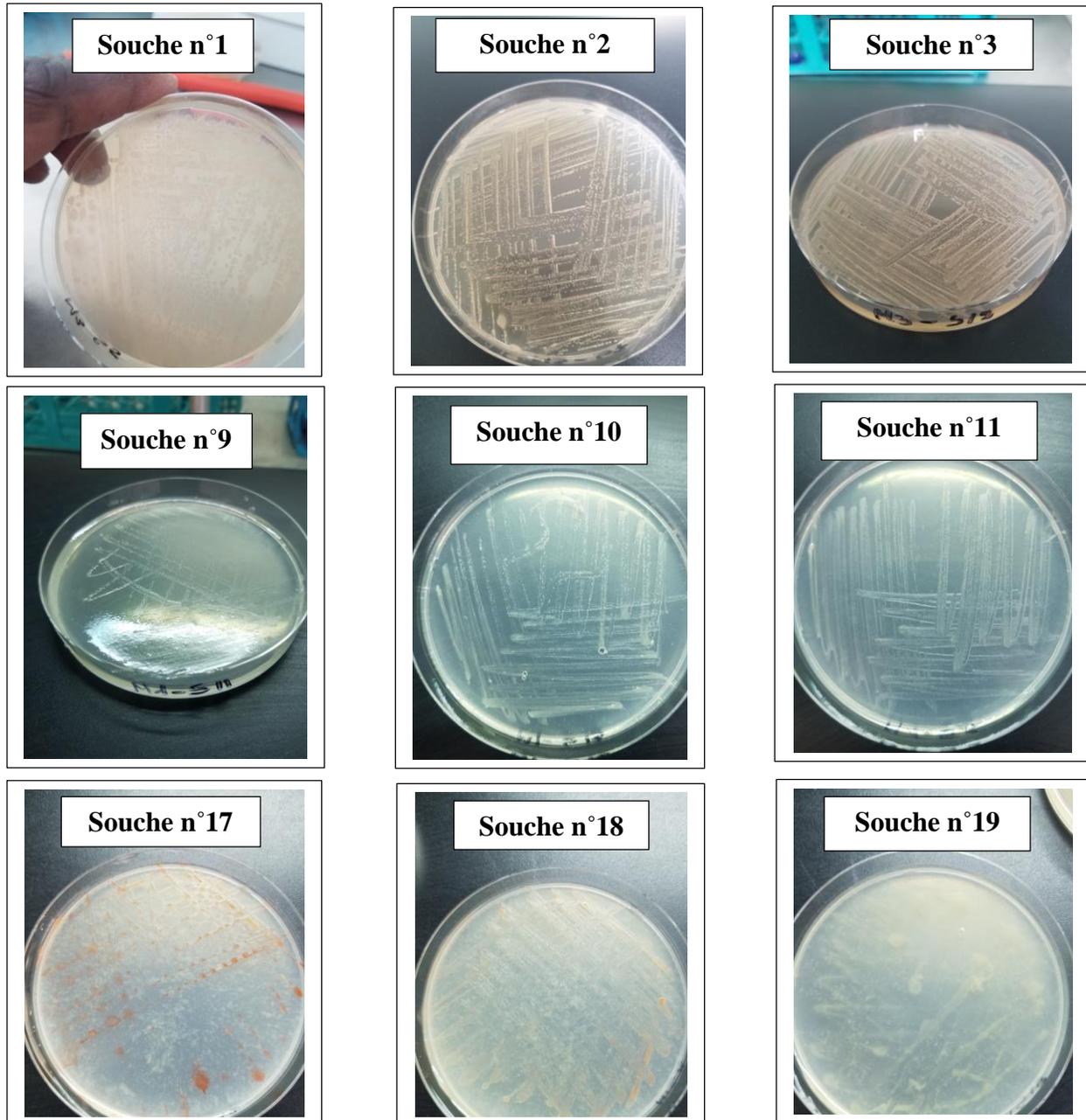


Figure 14 : Photographie de neuf souches halophiles (1, 2, 3, 9, 10, 11, 17, 18, 19) isolées de la Sebkhha de Ain Yagout après purification.

4/ Identification

4.1/ Identification macroscopique

Le résultat de l'examen macroscopique des bactéries halophiles isolées et sélectionnées de la Sebkhah de Ain-Yagout-Batna est mentionné dans le **tableau 11**.

La majorité des colonies ont une forme circulaire et un contour régulier. La plupart d'entre elles sont punctiformes. La couleur dominante des colonies est le beige (8 parmi les 20 bactéries halophiles).

Il est important de noter que les bactéries pigmentées (jaunes, oranges et rouges) ne se sont développées que sur le milieu M1, ce qui pourra être expliqué par la différence des composants des milieux. Probablement, le milieu M1 contient un ou des composants qui favorisent la prolifération des bactéries pigmentées et que les autres milieux n'en contiennent pas.

Tableau 11 : Résultats de l'observation macroscopique des souches de bactéries halophiles isolées de la Sebka de Ain Yagout et sélectionnées.

N° Souche	Diamètre	Forme	Contour	Aspect	Consistance	Surface	Couleur
1	1 à 3 mm	Pléomorphe	Échinulé	Lisse	Crémeuse	Plate	Beige
2	>1mm	Circulaire	Régulier	Lisse	Crémeuse	Plate	Beige
3	>1mm	Circulaire	Régulier	/	/	Semi-bombée	Beige
4	1 à 2 mm	Ovoïde	Irrégulier	Lisse	Crémeuse	Bombée	Beige
5	>1mm	Circulaire	Régulier	Lisse	Crémeuse	Plate	Marron
6	>1mm	Circulaire	Régulier	Lisse	Crémeuse	Plate	Beige
7	1 à 3 mm	Circulaire	Irrégulier	Lisse	Crémeuse	Plate	Beige gris
8	>1mm	Circulaire	Régulier	Lisse	Crémeuse	Plate	Marron
9	>1 à 1 mm	Ovoïde	Irrégulier	Lisse	Crémeuse	Plate	Beige
10	>1mm	Circulaire	Régulier	Lisse	Crémeuse	Plate	Beige
11	>1mm	Circulaire	Régulier	Lisse	Sèche	Plate	Beige clair
12	>1 à <4mm	Circulaire	Régulier	Lisse	Peu crémeuse	Plate à bombée	Orange clair
13	>1 à 2mm	/	Régulier	Lisse	Peu crémeuse	Plate	Orange
14	4 à 5 mm	/	Régulier	Lisse	Crémeuse	Plate	Orange clair
15	4, 5, 6 mm	Circulaire	Régulier	Lisse	Crémeuse	Plate	Rouge
16	>1 à 3 mm	Circulaire	Régulier	Lisse	Crémeuse	Plate	Orange clair
17	1 à 5 mm	Ovoïde	Régulier	Lisse	Crémeuse	Plate	Rouge clair
18	>1mm	Circulaire	Régulier	Lisse	Crémeuse	Plate	Rouge clair
19	>1mm	/	/	Lisse	Sèche	Plate	Jaune
20	>1 à 4 mm	Circulaire	Régulier	/	/	Plate	Rouge clair

4.2/ Identification microscopique

Les résultats des observations microscopiques réalisées à l'état frais et après coloration de Gram des bactéries halophiles sont mentionnés dans le **tableau 12** et la **figure 15**.

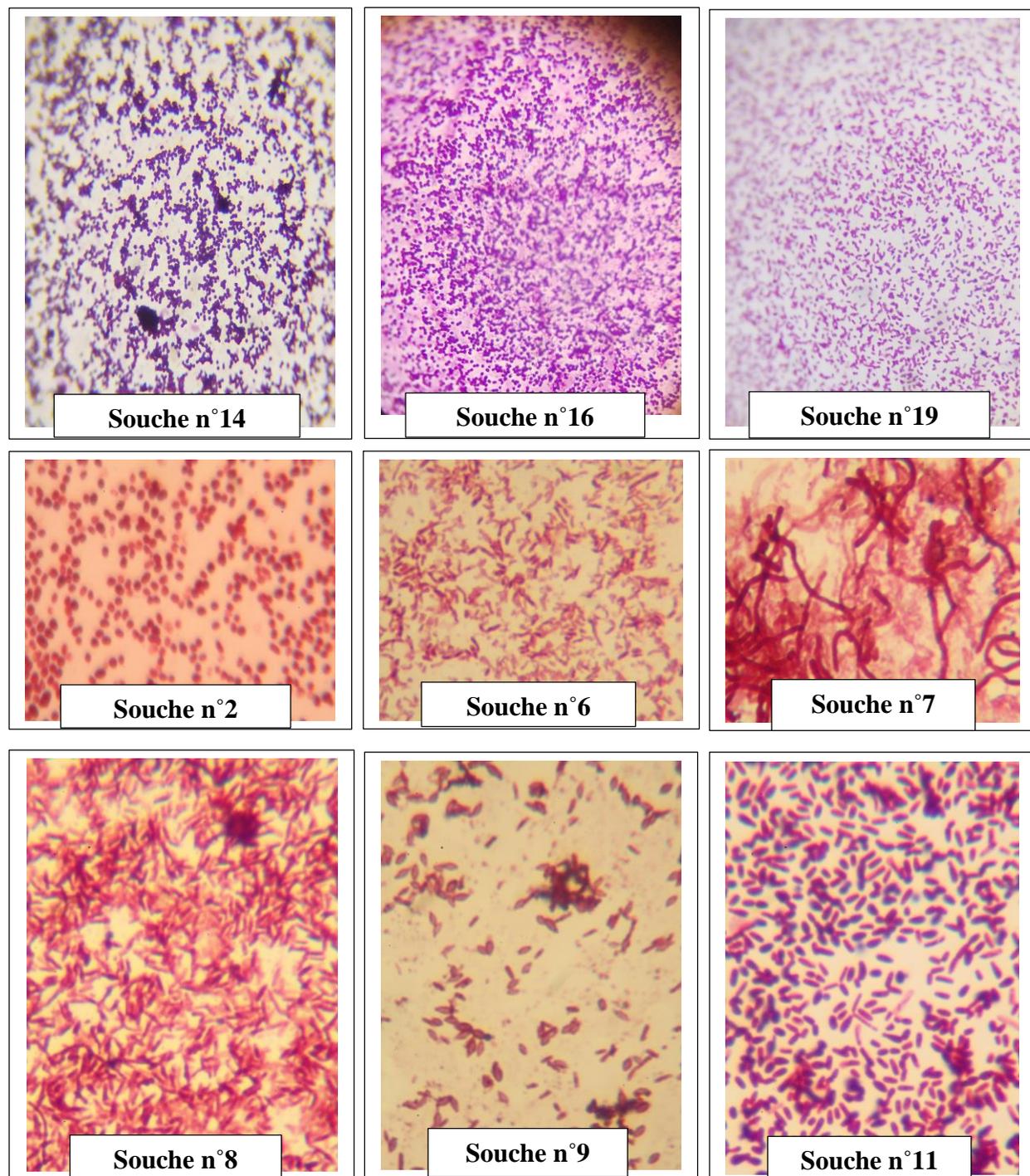


Figure 15 : Photographies de l'observation microscopique après coloration de Gram de quelques bactéries halophiles.

Résultats et discussion

Tableau 12 : Description microscopique des 20 souches halophiles isolées de la Sebkha de Ain Yagout et sélectionnées.

Numéro de la souche	Description microscopique à l'état frais	Description microscopique après coloration de Gram
1	Longs filaments fins de tailles différentes qui se fragmentent en bacilles, mobiles	Gram +
2	Coques ovoïdes, isolés ou rassemblés en diplocoques ou en petit amas (3 à 4 cellules), très mobiles	Gram -
3	Coques ovoïdes, isolés ou en diplocoques, mobiles	Gram +
4	Bacilles droits, parfois isolés ou rassemblés en amas, très peu mobiles	Gram -
5	Longs bacilles fins, droits, parfois incurvés, très peu mobiles	Gram -
6	Bacilles longs, fins, de taille variable, parfois rassemblés en chainettes ou en diplobacilles, mobiles	Gram -
7	Très longs filaments, épais, incurvés, ressemblant à des verres de terre, immobiles	Gram +
8	Bacilles droits, parfois rassemblés en amas, de différentes tailles, mobiles	Gram -
9	Bacilles droits et fusiformes, parfois rassemblés en amas, mobiles	Gram +
10	Bâtonnets isolés, parfois incurvés, de tailles différentes, rassemblés en palissade ou rarement en deux, mobiles	Gram -
11	Bacilles droits, de différentes tailles et épaisseurs, parfois présence de longs filaments qui se chevauchent, immobiles	Gram -
12	Coques isolés, en deux, en chainettes, en amas, immobiles	Gram +
13	Coques isolés ou rassemblés en amas ou en chainettes, immobiles	Gram +
14	Coques isolés ou rassemblés en amas, immobiles	Gram +
15	Coques isolés ou regroupés en amas, immobiles	Gram+
16	Coques isolés ou rassemblés en deux ou en chainettes, mobiles	Gram +
17	Coques isolés ou rassemblés en amas, immobiles	Gram +
18	Coques isolés ou en chainette, immobiles	Gram +
19	Très petits bacilles, isolés, de différentes tailles et de différentes épaisseurs, mobiles	Gram +
20	Coques isolés ou rassemblés en deux, mobiles	Gram +

Résultats et discussion

Sur l'ensemble des 20 bactéries halophiles isolées et sélectionnées, 13 bactéries (65%) ont été des bactéries à Gram positif et 7 bactéries ont été à Gram négatif (35%) (**Figure 16**).

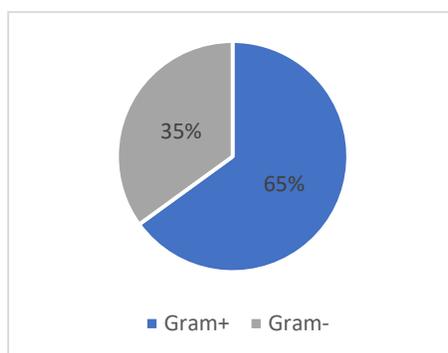


Figure 16 : Répartition des bactéries halophiles selon le type de Gram.

Pour les bactéries à Gram positif : 2 présentaient une forme bacillaire (souches n°9 et n°19) (15%), 2 présentaient une forme filamenteuse (souches n°1 et n°7) (15%), et 9 apparaissaient sous forme sphérique (souches n°3, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 et 20) (70%) (**Figure 17**).

En ce qui concerne les bactéries à Gram négatif, elles apparaissaient toutes sous forme bacillaire (85%), à l'exception de la souche n°2 qui a montré une forme sphérique (15%) (**Figure 17**).

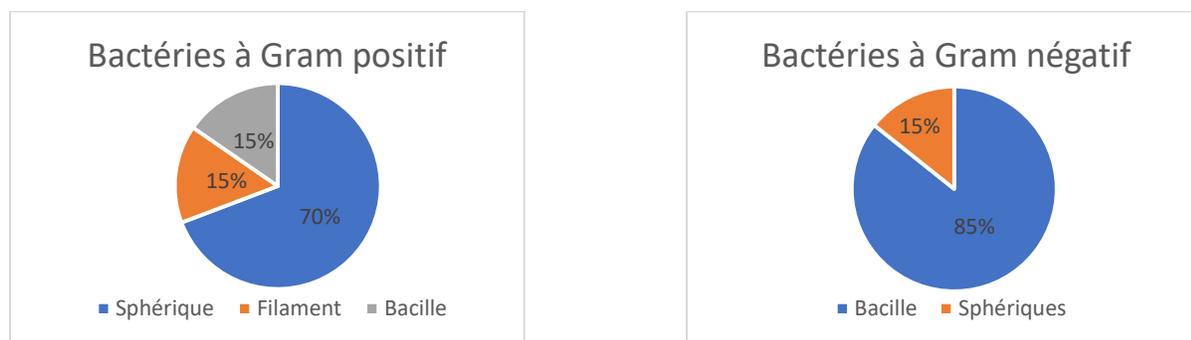


Figure 17 : Répartition des bactéries halophiles selon les différentes formes cellulaires.

D'après ces résultats, nous avons remarqué que les bactéries qui se sont développées sur le milieu M3 sont majoritairement à Gram négatif avec un ratio de 5/8 et que celles développées sur le milieu M1 sont majoritairement à Gram positif avec un ratio de 10/12. Ce qui nous permet de déduire que le milieu M3 favorise la prolifération des bactéries halophiles à Gram négatif et que le milieu M1 favorise le développement des bactéries halophiles à Gram positif.

Les bactéries pigmentées (ayant une couleur autre que le beige et la crème) sont toutes sphériques à Gram positif à l'exception de la souche 19 qui se présentait sous forme de petits bacilles.

Concernant la mobilité, 10 souches se sont révélées mobiles et 10 souches immobiles.

4.3/ Tests biochimiques

Les résultats des tests biochimiques en utilisant la galerie classique sont reportés dans le **tableau 13** et la **figure 18**.

Tableau 13 : Résultats des tests biochimiques réalisés sur les souches bactériennes halophiles isolées de la Sebkhha de Ain Yagout.

Numéro de la souche	Citrate de Simmons	Mannitol	Mobilité	ONPG	ADH	ODC	LDC	Urée	TSI				Catalase	Oxydase
									Glucose	Diholosite	H ₂ S	Gaz		
1	-	+	Très mobile	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
2	-	+	Très mobile	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
3	-	+	Très mobile	+	+	+	+	+	+/-	+/-	-	-	+	+
4	-	+	Peu mobile	-	+	-	-	+	+/-	+/-	-	-	+	+
5	-	+	Très mobile	-	+	-	-	+	+/-	+/-	-	-	+	+
6	-	-	nd	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
7	-	-	nd	-	+	-	-	-	+/-	+/-	-	-	+	+
8	-	+	Mobile	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+
9	-	-	nd	-	+	+	+	+	+/-	+	-	-	+	+
10	-	-	nd	-	+	+	+	-	+/-	+/-	-	-	+	+
11	-	-	nd	-	+	+	-	-	+/-	+/-	-	-	+	+
12	-	-	nd	-	+	-	-	+	+/-	+/-	-	-	-	+
13	-	-	nd	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+
14	-	-	nd	-	+	-	-	-	+/-	+/-	-	-	-	+
15	-	-	nd	-	+	-	-	-	+/-	+/-	-	-	-	+
16	-	-	nd	-	+	-	-	-	+/-	+/-	-	-	-	+
17	-	-	nd	+	+	-	-	+	+/-	+/-	-	-	+	+
18	-	-	nd	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
19	-	-	nd	+/-	+	-	-	-	+/-	+/-	-	-	+	+
20	-	-	nd	-	+	-	-	+	+/-	+/-	-	-	+	+

- : négatif, + : positif, +/- : résultat non clair, nd : non-déterminé.

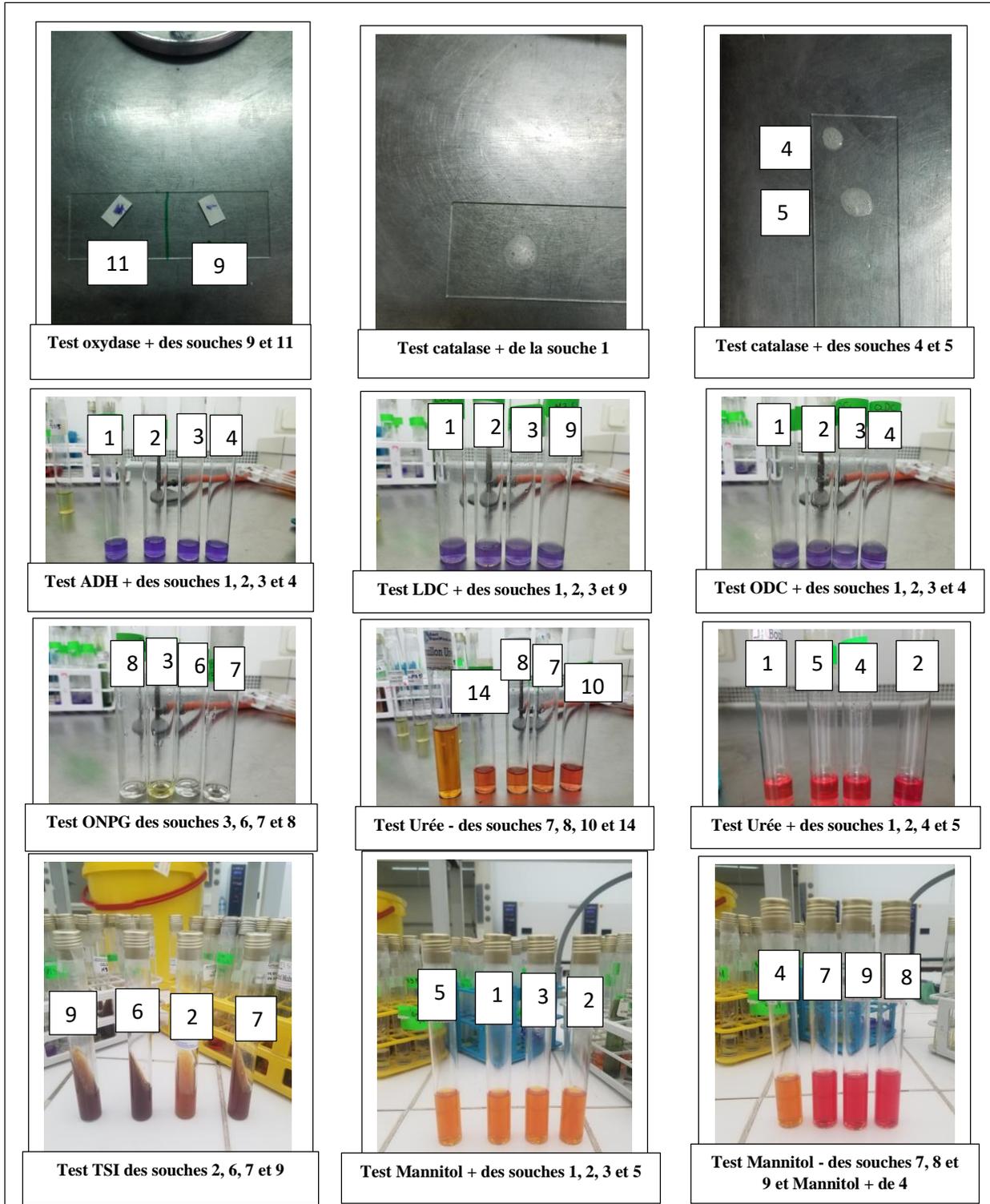


Figure 18 : Résultats des tests biochimiques classiques de quelques souches halophiles isolées de la Sebkhia de Ain Yagout.

4.4/ Galerie API 20 NE

Les résultats de la galerie API 20NE réalisée sur les bactéries halophiles isolées de la Sebkhah de Ain Yagout sont mentionnés dans le **tableau 14** et la **figure 19**.

Ces résultats montrent que 20 bactéries sont oxydases positives, 15 bactéries sont catalases positives et 5 bactéries (souche 12, 13, 14, 15 et 16) sont catalases négatives. Concernant les nitrates toutes les bactéries sont nitrate positive et 9 souches (5, 6, 7, 8, 15, 16, 17, 18 et 20) ont pu aboutir au stade nitrite.

Nos résultats se rapprochent de ceux obtenus par **BENABDALLAH (2014)**, dans son étude réalisée sur des bactéries extrêmophiles halophiles du genre *Bacillus*, isolées de la Sebkhah d'Oran, où 3 bactéries ont été dépourvues de nitrate réductase sur un total de 59 bactéries isolées, et toutes les souches étaient catalase positive et 44 souches étaient oxydase positive.

Mais par contre, sont un peu différents de ceux obtenus par **MEZANI et MEZIANI (2021)**, dont l'étude se portait sur la caractérisation des bactéries halotolérantes isolées à partir d'une Sebkhah au Nord Algérien et qui ont réussi à isoler 15 bactéries et parmi lesquelles 8 étaient oxydase positive, 13 catalase positive et 12 possédaient une nitrate réductase.

D'après les résultats de l'API 20NE, seules les souches 3, 4, 5, 7, 8, 14, 15, 17, 18, 19 et 20 sont capables d'utiliser le glucose, et les souches 1, 2, 3, 4, 9, 10, 11, 12, 13, 14 et 19 sont capables d'utiliser le citrate comme seule source de carbone et d'énergie. Dix souches (1, 3, 4, 9, 10, 11, 12, 13, 14 et 19) sont mannitol positive et douze (1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 14 et 15) sont ONPG positive. En ce qui concerne l'ADH, seulement trois souches (1, 4 et 14) sont positives. Et seulement les souches (3, 4, 11, 12, 14 et 19) sont uréase positives.

D'après les tests que nous avons réalisés et d'après les résultats obtenus, nous avons pu faire une assignation de 10 de nos souches à des genres bactériens halophiles. Mais il est très important de noter que ces assignations ne sont que des suggestions et que pour pouvoir identifier avec exactitude ces bactéries halophiles, une identification moléculaire est nécessaire (**Figure 20**).

Tableau 14 : Résultats de l'ensemencement des galeries API 20NE avec les 20 bactéries halophiles sélectionnées.

Numéro de la souche	NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLUC	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC
1	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
2	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-
3	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
4	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
5	+(N ₂)	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	+(N ₂)	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	+(N ₂)	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	+(N ₂)	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
10	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
11	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
12	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+/-
13	+	-	-	-	-	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
14	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
15	+(N ₂)	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	+(N ₂)	-	-	-	-	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	+(N ₂)	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	+(N ₂)	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
19	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+/-	+	+	+/-	+	+	-	+	+	+	-
20	+(N ₂)	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



Figure 19 : Résultats de l'ensemencement de la galerie API 20NE avec 5 souches de bactéries halophiles (1, 2, 3, 4 et 9) isolées de la Sebka de Ain Yagout.

Les souches 4, 5, 6, 8, 10 et 11 semblent appartenir au genre *Halomonas*, ce qui représente un pourcentage de 30%. La souche 9 au genre *Bacillus*, la souche 7 au genre *Streptomyces*, la souche 19 au genre *Alkalibacillus* et la souche 1 au genre *Actinoplanes* et représente chacune 5% des bactéries halophiles (**figure 20**). Les autres souches n'ont pas pu être assigner à des genres à cause de la diversité des informations obtenues. Ces bactéries représentent 50% des bactéries halophiles et pour les assigner à des genres, une identification moléculaire est indispensable.

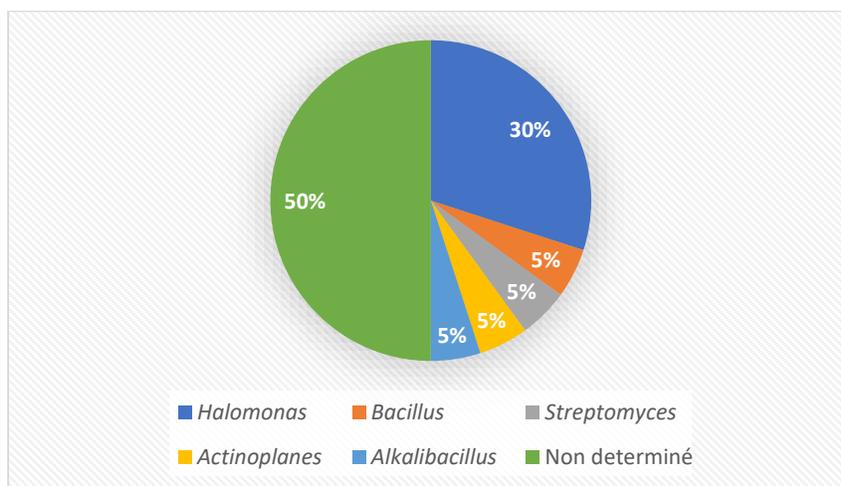


Figure 20 : Pourcentage des genres des bactéries halophiles isolées de la Sebkhha de Ain Yagout.

Il est également important de noter que ces souches assignées présentent des caractères morphologiques proches mais biochimiques variés ce qui explique bien la grande diversité des bactéries d'un même genre.

Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par **MENASRIA (2020)** qui a réussi à isoler à partir de différents milieux extrêmes salés du Nord-Est Algérien, 74 bactéries appartenant à différents genres parmi lesquelles : *Halomonas* et *Bacillus*. Et à ceux obtenus par **KHALLEF (2019)** qui a pu isoler 7 bactéries halophiles du genre *Alkalibacillus* à partir des zones humides de Ouargla. Mais ils diffèrent de ceux obtenues par **KARIMA (2007)**, qui a isolé une seule bactérie appartenant au genre *Halomonas* sur 40 bactéries halophiles, isolées de la Sebkhha d'Ezzemoul. Nos résultats ainsi que ceux trouvés par **KARIMA (2007)**, **KHALLEF (2019)** et **MENASRIA (2020)**, et, nous montrent la grande diversité des bactéries qui se trouvent dans les Sebkhhas (sol salins) de l'Algérie.

5/ Tests enzymatiques

Les résultats des tests enzymatiques réalisés sur les bactéries halophiles isolées de la Sebka de Ain Yagout sont mentionnés dans le **tableau 15** et la **figure 21**.

Tableau 15 : Résultats des tests enzymatiques des 20 souches halophiles isolées de la Sebka de Ain Yagout et sélectionnées.

Numéro de la souche	Tyrosinase	Chitinase	L-glutaminase	L-asparaginase
1	-	+	+	+
2	-	+	+	+
3	-	+	+	+
4	-	-	+	+
5	-	-	-	+
6	-	+	-	-
7	-	-	-	-
8	-	-	-	-
9	+	-	+	-
10	-	+	-	+
11	-	+	+	+
12	-	-	-	-
13	-	-	-	+
14	-	-	-	-
15	-	-	-	-
16	-	-	-	-
17	-	+	+	+
18	-	-	-	+
19	+	+	+	+
20	-	-	-	+

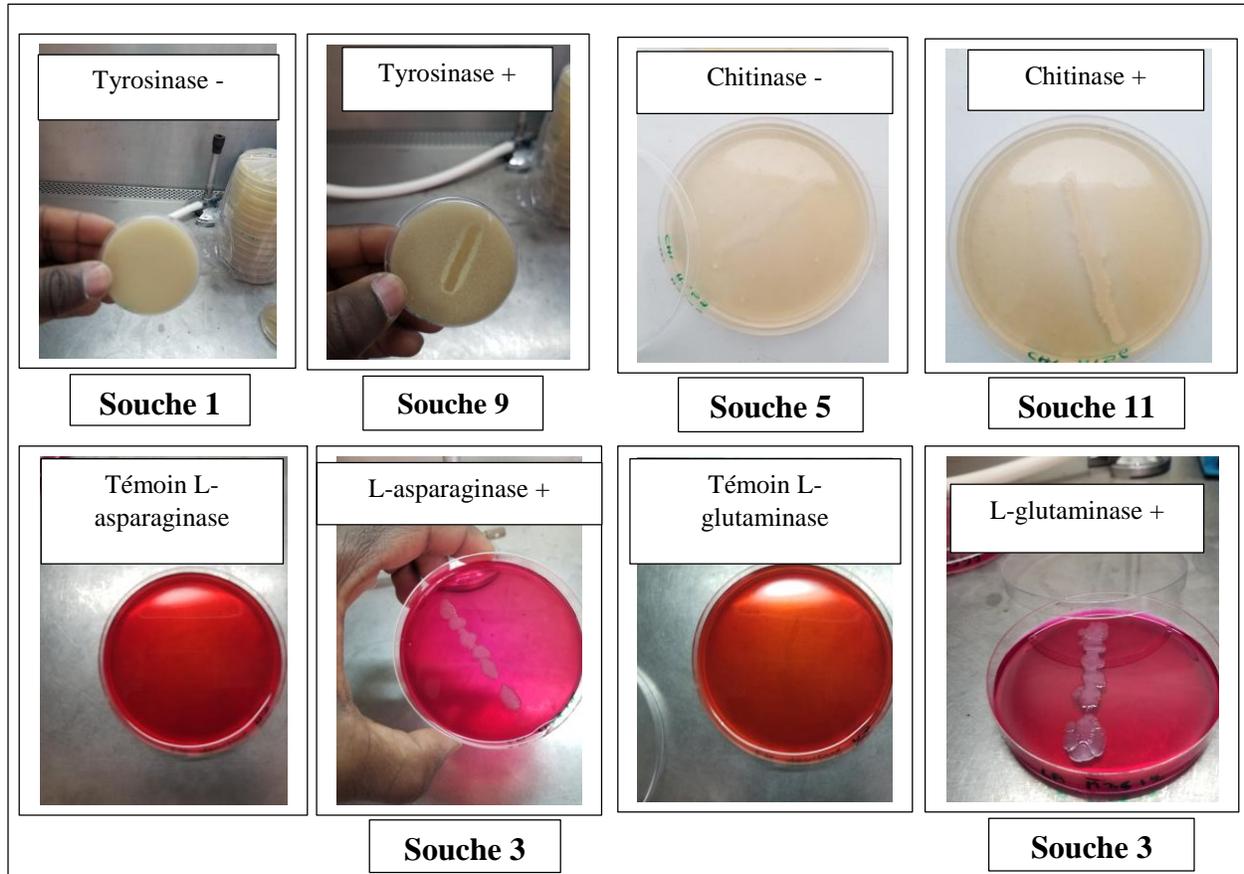


Figure 21 : Résultats des tests enzymatiques de quelques souches halophiles isolées de la Sebkhya de Ain Yagout.

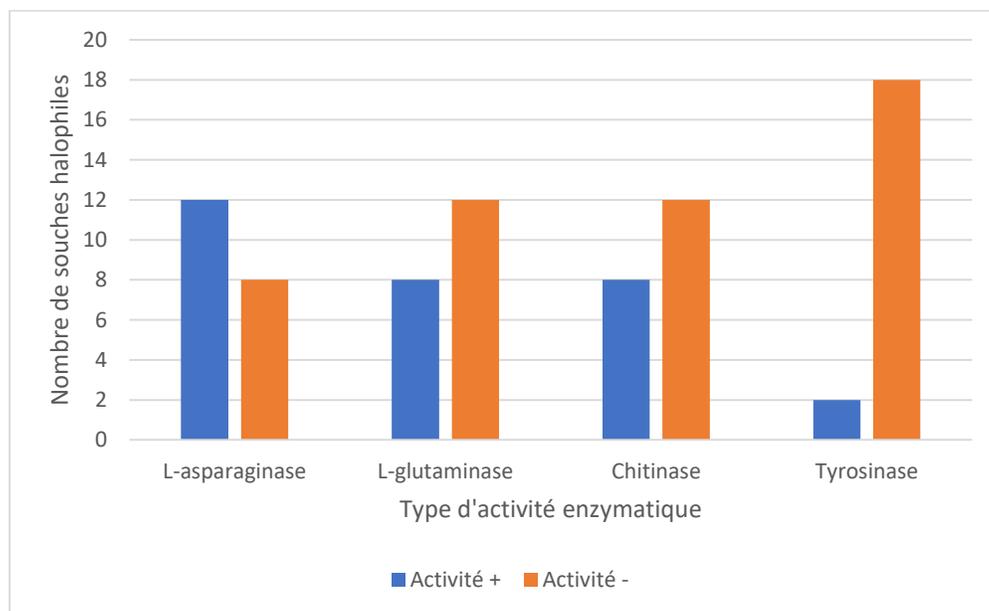


Figure 22 : Résultats de l'activité enzymatique des souches halophiles isolées et sélectionnées.

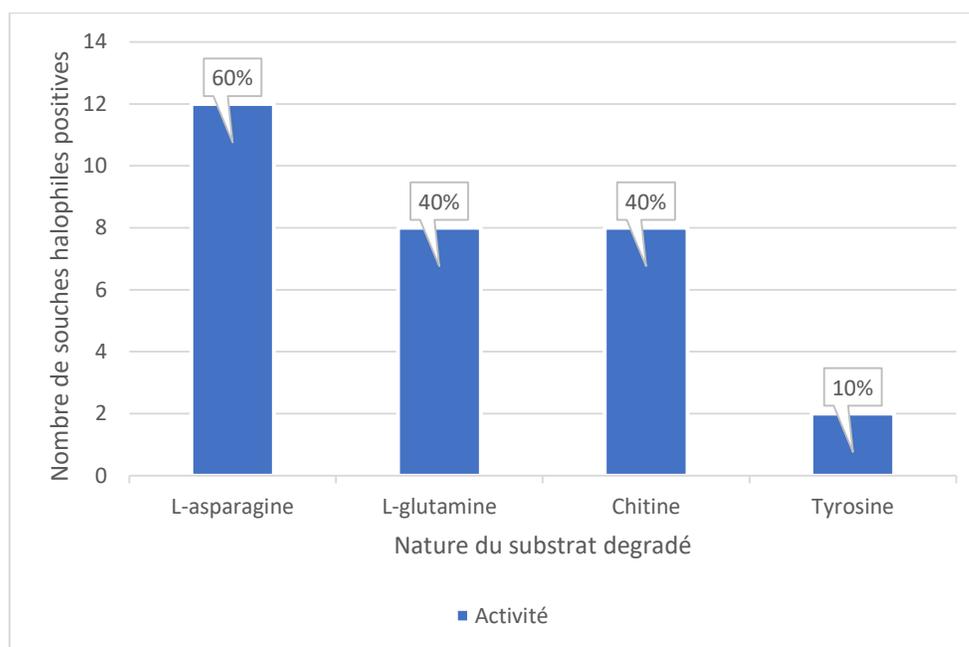


Figure 23 : Répartition des activités enzymatiques selon la nature du substrat dégradé par les bactéries halophiles isolées de la Sebkha de Ain Yagout.

D'après les résultats obtenus, douze souches (1, 2, 3, 4, 5, 10, 11, 13, 17, 18, 19 et 20) ont été capables d'hydrolyser la L-asparagine soit un pourcentage de 60%, huit souches (1, 2, 3, 6, 10, 11, 17 et 19) ont pu hydrolyser la chitine avec un pourcentage de 40%, huit souches (1, 2, 3, 4, 9, 11, 17 et 19) ont pu hydrolyser la L-glutamine (40%) et deux souches (9 et 19) ont été capables d'hydrolyser la tyrosine (10%).

L'activité enzymatique la plus produite par les souches est celle de la L-asparaginase, suivie de celle de la L-glutaminase et de la chitinase. L'activité enzymatique la moins produite est celle de la tyrosinase.

La souche 19 est dotée d'un bagage enzymatique important car elle a été capable de produire toutes les enzymes recherchées. Les souches 1, 2, 3, 11 et 17 ont été capables de produire tous les 4 enzymes à l'exception de la tyrosinase. Les souches 4, 9 et 10 ont été capable de produire deux enzymes parmi les quatre, la L-glutaminase et la L-asparaginase par la souche 4, la tyrosinase et la L-glutaminase par la souche 9, la chitinase et la L-asparaginase par la souche 10.

Les souches 5, 13, 18 et 20 n'ont pu produire qu'une seule enzyme qui est la L-asparaginase et la souche 6 n'a pu produire que de la chitinase. Les bactéries halophiles isolées restantes (7, 8, 12, 14, 15 et 16) n'ont pu produire aucune enzyme.

Pour la chitinase, nos résultats sont très différents de ceux obtenus par **Babavalian et al. (2013)**, qui après l'isolement et l'identification des bactéries modérément halophiles productrice d'enzymes hydrolytiques dans des environnements hypersalins en Iran, seulement 20 bactéries halophiles ont été chitinase positives sur un ensemble de 249 bactéries, soit un taux de 8%.

Pour la L-asparaginase et la L-glutaminase, nos résultats sont différents de ceux de **Zolfaghar et al. (2019)**, qui ont obtenue, après isolement et criblage d'enzymes extracellulaires des bactéries halophiles, 29 souches ont été capables d'hydrolyser la L-asparagine (soit un pourcentage de 26%) et 4 souches ont été capables d'hydrolyser la L-glutamine (soit un pourcentage de 3%) sur un total de 110 bactéries.

Les bactéries halophiles sont connues comme étant une source très importante d'enzymes. Leur capacité à survivre dans les environnements salins fait qu'elles sont généralement dotées d'un bagage enzymatique exceptionnel. De ce fait elles sont exploitées dans de nombreuses industries biotechnologiques pour la production d'enzymes hydrolytiques extracellulaires qui sont actives et stables à des concentrations élevées de sel. Ces organismes sont capables de produire une variété d'enzymes hydrolytiques avec des activités optimales dans une large gamme de salinité (**Babavalian et al., 2013**).

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

Parmi les extrémophiles, les bactéries halophiles, sont des groupes très importants en termes de distribution et de caractéristiques.

L'objectif principal de cette étude a été l'isolement, la purification et la caractérisation des bactéries halophiles isolées dans la Sebkha de Ain Yagout, qui représente la première partie de mon projet.

Ainsi à la lumière des résultats obtenus, nous pouvons conclure que :

- Les 20 souches halophiles isolées, sélectionnées et étudiées appartiennent à différents genres : *Halomonas* (30%), *Bacillus* (5%), *Streptomyces* (5%), *Alkalibacillus* (5%), *Actinoplanes* (5%), et 50% sont non-déterminées.
- Certaines souches sont très proches phénotypiquement mais variées en termes de caractéristiques biochimiques.
- Les souches non-assignées à des genres peuvent présenter de nouvelles souches de bactéries halophiles premièrement isolés en Algérie et pourront également montrer un grand intérêt biotechnologique.
- Les bactéries pigmentées en jaune, orange et rouge sont toutes à Gram positif et ne se sont développées que sur le milieu M1.
- L'activité enzymatique la plus produite est celle de la L-asparaginase (60%) qui a été produite par douze souches, à laquelle suit celle de la chitinase (40%) et de la L-glutaminase (40%) produites par huit souches.

En perspective pour ce travail, il est recommandé :

- D'identifier avec exactitude les souches bactériennes isolées par des méthodes moléculaires.
- D'étudier leur tolérance par rapport aux concentrations en NaCl, pour connaître leur optimum de croissance.
- De sélectionner les 6 espèces de *Halomonas* pour la production de l'ectoïne car d'après la bibliographie c'est le genre de bactérie halophile le plus producteur d'ectoïne.
- Procéder à la fermentation, l'extraction et la caractérisation de l'ectoïne
- Introduire l'ectoïne dans la fabrication de la crème solaire.

Références bibliographiques

A

- **Ak, P., Biswas, J. (2017).** Diversity and production of extracellular polysaccharide by halophilic microorganisms. *BIJ I*. <https://doi.org/10.15406/bij.2017.01.00006>.
- **Amal, A.H., El-Nawawy M.A., Ali, A.A., El-Samragy, Y.A. (2019).** Isolation and identification of halophilic bacteria producing exopolysaccharides from whey and milk permeate. *Arab Univ. Journal of Agricultural Science, Ain Shams Univ., Cairo, Egypt* 27(2), 1491-1501.

B

- **Babavalian, H., Amoozegar, M.A., Pourbabaee, A.A., Moghaddam, M.M., Shakeri, F. (2013).** Isolation and identification of moderately halophilic bacteria producing hydrolytic enzymes from the largest hypersaline playa in Iran. *Microbiology* 82, 466–474. <https://doi.org/10.1134/S0026261713040176>.
- **Benabdallah, A.M. (2014).** Screening de souches extrêmophiles halophiles du genre *Bacillus* de la Sebkhia d'Oran (caractérisation phénotypique). Mémoire de master : Microbiologie. Algérie-Tlemcen : Université de Tlemcen, p96.
- **Bueno de Mesquita, C.P., Zhou, J., Theroux, S.M., Tringe, S.G. (2021).** Methanogenesis and salt tolerance genes of a novel halophilic *Methanosarcinaceae* metagenome-assembled genome from a Former Solar Saltern. *Genes* 2021, 12, 1609. <https://doi.org/10.3390/genes12101609>.

C

- **Castillo-Carvajal, L.C., Sanz-Martín, J.L., Barragán-Huerta, B.E. (2014).** Biodegradation of organic pollutants in saline wastewater by halophilic microorganisms: a review. *Environmental Science and Pollution Research* 21, 9578–9588. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3036-z>.
- **Castro, D.J., Cerezo, I., Sampedro, I., Martínez-Checa, F. (2018).** *Roseovarius ramblicola* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from saline soil in Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68, 1851–1856. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002744>.

Références bibliographiques

- **Caton, T.M., Witte, L.R., Ngyuen, H.D., Buchheim, J.A., Buchheim, M.A., Schneegurt, M.A. (2004).** Halotolerant aerobic heterotrophic bacteria from the Great Salt Plains of Oklahoma. *Microbial Ecology* 48, 449–462. <https://doi.org/10.1007/s00248-004-0211-7>.
- **Chamekh, R., Deniel, F., Donot, C., Jany, J.-L., Nodet, P., Belabid, L. (2019).** Isolation, identification and enzymatic activity of halotolerant and halophilic Fungi from the Great Sebka of Oran in Northwestern of Algeria. *Mycobiology* 47, 230–241. <https://doi.org/10.1080/12298093.2019.1623979>.
- **Chandel, H. (2019).** A review on Halophiles as the crude oil hydrocarbon degrading bacterial species 7. *Journal of Life Science*, 7 (2) : 375-386.

D

- **Daoud, L., Ben Ali, M. (2020).** Halophilic microorganisms: interesting group of extremophiles with important applications in biotechnology and environment, in: physiological and biotechnological aspects of extremophiles. *Elsevier*, pp. 51–64. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818322-9.00005-8>.
- **Demnati, F., Boubaker, Z., Allache, F., Ernoul, L. (2020).** Ecosystem services in salt lakes: An ethnobotanic case study of halophytes from Algeria. *Ecmed* 46, 35–45. <https://doi.org/10.3406/ecmed.2020.2107>.
- **DasSarma, S., Arora, P. (2001).** Halophiles. *Encyclopedia of life sciences*.
- **Dutta, B., Bandopadhyay, R. (2022).** Biotechnological potentials of halophilic microorganisms and their impact on mankind. *Journal of Basic and Applied Science* 11, 75. <https://doi.org/10.1186/s43088-022-00252-w>.
- **Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), (2006).** The Prokaryotes. *Springer New York*. <https://doi.org/10.1007/0-387-30743-5>.

E

- **Elyasifar, B., Jafari, S., Hallaj-Nezhadi, S., Chapeland-leclerc, F., Ruprich-Robert, G., Dilmaghani, A. (2019).** Isolation and identification of antibiotic-producing halophilic bacteria from Dagh Biarjmand and Haj Aligholi Salt Deserts, Iran. *Pharmaceutical Sciences* 25, 70–77. <https://doi.org/10.15171/PS.2019.11>.

G

- **Galisteo, C., Sánchez-Porro, C., De La Haba, R.R., López-Hermoso, C., Fernández, A.B., Farias, M.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. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7080241>.
- **Gocheva, Y., Angelova, M., Krumova, E. (2021).** Potential of halotolerant and halophilic fungi as a source of new extracellular enzymes and antimicrobial compounds. *Acta microbiologica bulgarica* Volume 37 (2). 57-68.

H

- **Hafhouf, I., Bahloul, O., Abbeche, K. (2022).** Effects of drying-wetting cycles on the salinity and the mechanical behavior of sebkha soils. A case study from Ain M'Lila, Algeria. *CATENA* 212, 106099. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2022.106099>.
- **Hegazy, A., El-Nawawy, M., Ali, A., El-Samragy, Y. (2019).** Isolation and identification of halophilic bacteria producing exopolysaccharides from whey and milk permeate. *Journal of Agricultural Sciences* 27, 1491–1501. <https://doi.org/10.21608/ajs.2019.12628.1030>.
- **Hermann, L., Mais, C.-N., Czech, L., Smits, S.H.J., Bange, G., Bremer, E. (2020).** The ups and downs of ectoine: structural enzymology of a major microbial stress protectant and versatile nutrient. *Biological Chemistry* 401, 1443–1468. <https://doi.org/10.1515/hsz-2020-0223>.
- **Huang, C.Y., Garcia, J.L., Patel, B.K., Cayol, J.L., Baresi, L., Mah, R.A. (2000).** *Salinivibrio costicola* subsp. *vallismortis* subsp. nov., a halotolerant facultative anaerobe from Death Valley, and emended description of *Salinivibrio costicola*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 615–622. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-2-615>.

J

- **Jadhav, K., Kushwah, B., Jadhav, I. (2018).** Insight into compatible solutes from halophiles: Exploring significant applications in biotechnology, in: Singh, J., Sharma, D., Kumar, G., Sharma, N.R. (Eds.), *Microbial bioprospecting for sustainable development. Springer Singapore*, pp. 291–307. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0053-0_16.

K

- **Kanekar, P.P., Kanekar, S.P., Kelkar, A.S., Dhakephalkar, P.K. (2012).** Halophiles – Taxonomy, diversity, physiology and applications, in: Satyanarayana, T., Johri, B.N., Anil Prakash (Eds.), *Microorganisms in environmental management. Springer Netherlands, Dordrecht*, pp. 1–34. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2229-3_1.
- **Karima, K. (2007).** Identification et étude moléculaire des bactéries et des archéobactéries aérobies halophiles de la sebkha Ezzemoul (Ain M'Lila). Thèse de doctorat : Microbiologie et biologie moléculaire. Algérie-Constantine : Université des frères mentouri de Constantine 1, p194.
- **Khallef, S. (2019).** Etude de la flore bactérienne halophile cultivable des zones humides de Ouargla. These de doctorat : Microbiologie appliquée. Algérie-Tizi ouzou : Université MOULOUD Mammeri de TIZI-OUZOU, p135
- **Kumar, V., Tiwari, S.K. (2019).** Halocin diversity among halophilic Archaea and their applications. *Springer Nature Singapore. Microbial diversity in ecosystem sustainability and biotechnological applications*, https://doi.org/10.1007/978-981-13-8315-1_16.

L

- **Litchfield, C. et Gillevet, P. (2002).** Microbial diversity and complexity in hypersaline environments: A preliminary assessment. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 28, 48–55. <https://doi.org/10.1038/sj/jim/7000175>.

Références bibliographiques

M

- **McGenity, T.J., Gemmell, R.T., Grant, W.D., Stan-Lotter, H. (2000).** Origins of halophilic microorganisms in ancient salt deposits. Minireview. *Environmental Microbiology* 2, 243–250. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2000.00105.x>.
- **Menasria, T. (2020).** Biodiversité microbienne dans les milieux extrêmes salés du Nord-Est Algérien. Thèse de Doctorat : Microbiologie appliquée. Algérie-Batna : Université Mustapha Ben Boulaid- Batna 2, 187p.
- **Mezani, L., Meziani, W. (2022).** Caractérisation des bactéries halotolérantes isolées à partir d'une sebkha au Nord Algérien. Mémoire de master : Biotechnologie microbienne. Algérie-Tizi ouzou : Université MOULOUD Mammeri de TIZI-OUZOU, p56.

O

- **Oren, A. (2002).** Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 28, 56–63.
- **Oren, A. (2008).** Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems* 4, 2. <https://doi.org/10.1186/1746-1448-4-2>.

P

- **Paul, V.G., Mormile, M.R. (2017).** A case for the protection of saline and hypersaline environments: a microbiological perspective. *FEMS Microbiology Ecology* 93. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix091>.

S

- **Sarwar, M.K., Azam, I., Iqbal, T. (2015).** Biology and Applications of Halophilic Bacteria and Archaea: A Review. *Electronic Journal of Biology*, Vol.11(3): 98-103.

V

- **Ventosa, A. (2006).** Unusual micro-organisms from unusual habitats: hypersaline environments, in: Logan, N.A., Lappin-Scott, H.M., Oyston, P.C.F. (Eds.), *Prokaryotic Diversity*. Cambridge University Press, pp. 223–254.
<https://doi.org/10.1017/CBO9780511754913.015>.

W

- **Welsh, D.T. (2000).** Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: from single cells to global climate. *FEMS Microbiology Review* 24, 263–290.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00542.x>.

Y

- **Yan, N., Marschner, P., Cao, W., Zuo, C., Qin, W. (2015).** Influence of salinity and water content on soil microorganisms. *International Soil and Water Conservation Research* 3, 316–323. <https://doi.org/10.1016/j.iswcr.2015.11.003>.
- **Yin, Y.-L., Li, F.-L., Wang, L. (2022).** *Halomonas salinarum* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from saline soil in Yingkou, China. *Archives of Microbiology* 204, 466. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-03032-3>.

Z

- **Zhang, X., Lin, Y., Chen, G.-Q. (2018).** Halophiles as Chassis for bioproduction. *Advanced Biology*. 2, 1800088. <https://doi.org/10.1002/adbi.201800088>.
- **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 Reports* 46, 3275–3286. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04787-7>.

Annexes

Milieux d'isolements des bactéries halophiles.**Milieu M1**

NaCl	175 g
CaCl₂ 2H₂O	0,1 g
MgCl₂ 6H₂O	20 g
K₂SO₄	5 g
Extrait de levure	5 g
Eau distillé	1000 mL
Agar	20 g
pH : 7	

Milieu M2

NaCl	250 g
MgSO₄ 7H₂O	20 g
KCl	5 g
CaCl₂ 2H₂O	0,2 g
Extrait de levure	5 g
Tryptone	5 g
Eau distillé	1000 mL
Agar	20 g
pH : 7	

Milieu M3

NaCl	100 g
Glucose	4 g
MgSO₄	1 mM
FeSO₄	0,0039 mM
(NH₄)₂ SO₄	15 mM
KH₂PO₄	100 mM
Eau distillé	1000 mL
Agar	20 g
pH : 7,2	

Milieu de base utilisé pour les tests enzymatiques.

NaCl	100 g
Peptone	5 g
Extrait de levure	3 g
Substrat	10 g
Eau distillé	1000 mL
Agar	30 g
pH : 7	

Les pH de ces milieux ont été ajusté grâce à une solution de 1M de **NaOH** et de **HCl**.

NaOH : 10g de NaOH dans 250mL d'eau distillée

HCl : 183,6mL d'HCl et 16,4mL d'eau distillée pour avoir 200mL d'HCl à 1M.

Résumés

Résumé

Les bactéries halophiles sont classées en plusieurs groupes en fonction de leur tolérance en sel et sont trouvées dans différents habitats appelés salins ou hypersalins. Ils survivent dans ces environnements en utilisant deux principaux stratégies qui sont le Salt-in et le Salt-out. Ces bactéries produisent de nombreuses molécules à intérêt biotechnologique.

Ainsi, notre travail qui représente la première partie de notre projet, s'est intéressé à l'étude de 20 souches bactériennes halophiles et a porté sur un isolement à partir de sebkha de Ain Yagout (BATNA), une purification ainsi qu'une identification (macroscopique, microscopique et biochimiques) et une mise en évidence de leurs capacités à produire différentes enzymes : tyrosinase, chititanase, L-glutaminase et L-asparaginase.

Nos résultats ont ainsi démontré que :

- Les 20 souches halophiles isolées, sélectionnées et étudiées appartenait à différents genres : *Halomonas* (30%), *Bacillus* (5%), *Streptomyces* (5%), *Alkalibacillus* (5%), *Actinoplanes* (5%), 50% ont été non-déterminées.
- Certaines souches ont été très proches phénotypiquement mais varié en termes de caractéristiques biochimiques.
- Les bactéries pigmentées ont été toutes à Gram positif et ne se sont développées que sur le milieu M1.
- L'activité enzymatique la plus produite a été celle de la L-asparaginase (12 souches, 60%), vient ensuite la chitinase et la L-glutaminase (8 souches, 40%) et finalement la tyrosinase (2 souches, 10%).

Dans une deuxième partie qui portera sur la molécule active (ectoïne) qui constitue la molécule clé de notre projet, il faut sélectionner le genre *Halomonas* (06 souches) et procéder à la fermentation, l'extraction et la caractérisation de la molécule cible.

Mots-clés : Sebkhha de Aïn Yagout-Batna, Bactéries halophiles, Ectoïne, *Halomonas*

Abstract

Halophilic bacteria are classified into several groups according to their salt tolerance and are found in different habitats called saline or hypersaline. They survive in these environments using two main strategies: salt-in and salt-out. These bacteria produce numerous molecules of biotechnological interest.

Our work, which represents the first part of our project, focused on the study of 20 halophilic bacterial strains, involving isolation from sebkhha of Ain Yagout (BATNA), purification and identification (macroscopic, microscopic and biochemical), and the demonstration of their ability to produce various enzymes: tyrosinase, chitinase, L-glutaminase and L-asparaginase.

Our results showed that:

- The 20 halophilic strains isolated, selected and studied belong to different genera: *Halomonas* (30%), *Bacillus* (5%), *Streptomyces* (5%), *Alkalibacillus* (5%), *Actinoplanes* (5%), and 50% are undetermined.
- Some strains were very similar phenotypically, but varied in terms of biochemical characteristics.
- The pigmented bacteria (orange, red) were all Gram-positive, and grew only on M1 medium.
- The most produced enzyme was the L-asparaginase (12 strains, 60%), followed by chitinase and L-glutaminase (8 strains, 40%), and finally tyrosinase (2 strains, 10%).

In the second part, which will focus on the active molecule (ectoin) which constitutes the molecule key of our project, we will select the *Halomonas* genus (06 strains) and proceed with fermentation, extraction and characterization of the target molecule.

Keywords: Ain Yagout-Batna Sebkhha, Halophilic Bacteria, Ectoin, *Halomonas*.

ملخص

تصنف البكتيريا المحبة للملحة إلى مجموعات عديدة حسب درجة تحملها للملح وتتواجد ببيئات مختلفة مالحة أو شديدة الملوحة.

تتعاش هذه البكتيريا في تلك البيئة باستخدام استراتيجيتين هما: Salt-in و Salt-out ويمكنها إنتاج العديد من المركبات ذات أهمية بيوتكنولوجية بالغة.

في دراستنا هاته، والتي تمثل الجزء الأول من مشروعنا، قمنا بعزل 20 بكتيريا مالحة من سبحة عين ياقوت بباتنة ثم تنقيتها وتشخيصها بعدة تقنيات (دراسة المستعمرات بالعين المجردة والخلايا بالمجهر، ودراسة خصائصها البيوكيميائية و الفيزيولوجية)، كما قمنا بدراسة قدرتها على إنتاج إنزيمات مختلفة: التيروسيناز، الكيتيناز، الجلوتاميناز و الأسباراجيناز.

بينت النتائج مايلي:

- تنتمي البكتيريا المحبة للملحة لأجناس مختلفة: *Halomonas* 30%، *Bacillus* 5%، *Streptomyces* 5%، *Alkalibacillus* 5%، *Actinoplanes* 5%، بينما لم يتم تحديد جنس 10 بكتيريات (50%).

- بعض البكتيريا تتشابه شكليا وتختلف في خصائصها البيوكيميائية.

- البكتيريا الملونة (بنفسجي، برتقالي، أحمر) كانت كلها موجبة الغرام ونمت على الوسط المغذي M₁.

- الإنزيم الأكثر إنتاجا كان الأسباراجيناز (12 بكتيريا، 60%)، يتبعه إنزيم الكيتيناز والجلوتاميناز (8 بكتيريات، 40%)، أخيرا إنزيم التيروسيناز (بكتيريتين، 10%).

- في الجزء الثاني والذي سيتخصص حول مركب الإكتوين (Ectoine)، الجزئية المفتاح لمشروعنا، يتم اختيار بكتيريا *Halomonas* والقيام بتجارب التخمر، الإستخراج وتشخيص الجزئية.

الكلمات المفتاحية: سبحة عين ياقوت - باتنة، البكتيريا المحبة للملحة، مركب الإكتوين، *Halomonas*.

Business Model Canvas

Business Modèle Canvas

<p><u>Partenaires clés</u> Incubateur Agences de marketing Influenceurs Agences publicitaires</p>	<p><u>Activités clés</u> Production de la crème solaires Marketing Logistique (livraison dans les grands magasins de ventes)</p> <p><u>Ressources clés</u> Ressources humaines : employés Ressources matérielles : machines et appareils, véhicules et local Ressources financières : nous-mêmes</p>	<p><u>Propositions de valeur</u> Crème solaire : anti-cancéreuse, 100% naturel, hydratante, anti-inflammatoire et antimicrobienne</p>	<p><u>Relation Client</u> Services clients : téléphones, e-mail Réseaux sociaux Offres Promotions</p> <p><u>Canaux</u> Boutiques Vente indirecte Vente directe (notre boutique) Vente en ligne Publicité Salons et exposition</p>	<p><u>Clients</u> Marché de masse</p>
<p><u>Coûts</u> Achat et entretien de matériels Achat et aménagement du local Salaires Les autres dépenses</p>		<p><u>Revenus</u> Vente du produit Publicité des autres produits des autres entreprises</p>		

1/ Premier axe : Présentation du projet

1.1/ L'idée de projet

L'idée de ce projet est de fabriquer une crème solaire anti-cancéreuse. Elle est venue quand mon encadrante **Mme MERIANE Ilhem** m'a parlé des solutés compatibles synthétisés par les bactéries halophiles y compris l'ectoïne une molécule naturelle capable de protéger la peau contre les rayons UV du soleil. Par conséquent, suite à l'observation des données annuelles sur les cas de cancer de la peau en Algérie nous avons eu l'idée d'exploiter cette molécule dans l'industrie cosmétique afin de réduire ce chiffre alarmant de cas de cancer cutané. En effet, selon le Centre Pierre et Marie Curie (CPMC), chaque année, parmi les 30 000 cas de cancer cutané, 1005 cas sont enregistrés en Algérie due en partie à une forte exposition aux rayons UV nocifs du soleil.

Le processus de production de notre crème solaire anti-cancéreuse débutera par l'extraction de l'ectoïne à partir d'une bactérie spécifique que nous isolerons à partir d'une Sebkhia en Algérie. Ensuite, nous mènerons des recherches approfondies en laboratoire pour formuler une crème solaire efficace et sécuritaire, intégrant cette molécule protectrice.

Nous investirons dans les équipements nécessaires pour mener à bien ce projet, en veillant à respecter les normes de qualité et de sécurité les plus strictes. Une fois la phase de développement accomplie avec succès, nous prévoyons de passer à une production à grande échelle dans un contexte industriel, en collaborant avec des partenaires et des experts de l'industrie cosmétique.

L'objectif ultime de notre projet est de fournir aux consommateurs algériens une crème solaire de haute qualité, capable de prévenir les effets néfastes des rayons UV tout en réduisant le risque de cancer cutané. Nous croyons fermement que notre innovation contribuera à améliorer la santé et le bien-être des individus tout en sensibilisant davantage à l'importance de la protection solaire.

1.2/ Les valeurs proposées

Notre crème solaire se distingue par plusieurs valeurs essentielles :

- **Anti-cancéreuse** : Notre produit est spécialement formulé pour réduire le risque de cancer cutané grâce à l'incorporation de l'ectoïne, une molécule naturelle reconnue pour sa

capacité à protéger la peau contre les rayons UV nocifs du soleil. En offrant une protection efficace, nous visons à prévenir les effets néfastes du soleil sur la santé de nos utilisateurs.

- **100% naturelle** : Nous mettons un point d'honneur à utiliser des ingrédients naturels et respectueux de l'environnement dans la formulation de notre crème solaire. En privilégiant des composants issus de sources naturelles, nous nous engageons à offrir un produit sûr et respectueux de la peau, sans compromettre la santé de nos utilisateurs ni l'écosystème.
- **Hydratante** : Notre crème solaire est conçue pour fournir une hydratation optimale à la peau. En plus de la protection solaire, elle agit comme un hydratant pour prévenir la déshydratation cutanée causée par l'exposition au soleil. Notre formule vise à maintenir l'équilibre hydrique de la peau, lui procurant une sensation de confort et de douceur.
- **Anti-inflammatoire et antimicrobienne** : En intégrant des propriétés anti-inflammatoires et antimicrobiennes, notre crème solaire offre une protection supplémentaire à la peau. Elle aide à apaiser les inflammations cutanées causées par les rayons UV et contribue à maintenir une barrière protectrice contre les infections cutanées potentielles.

En valorisant les Sebkhha en Algérie, notre projet offre également une opportunité de développement économique en exploitant ces ressources naturelles à des fins industrielles. Nous croyons en l'importance de préserver et d'utiliser de manière responsable les ressources locales, tout en soutenant l'économie nationale et en favorisant la durabilité environnementale.

En combinant ces valeurs fondamentales, nous nous efforçons de proposer un produit de qualité supérieure qui répond aux besoins des consommateurs en matière de protection solaire tout en contribuant à la préservation de la santé de la peau et de l'environnement.

1.3/ Equipe de travail

L'équipe du projet est composée des membres suivants :

Ilhem MERIANE : Enseignante-chercheuse au département de Microbiologie de l'université de Constantine 1. Elle apporte son expertise dans le domaine de la microbiologie et joue un rôle clé dans la direction et la supervision du projet, s'assurant de son bon déroulement global.

Hali SANOGO : Étudiant en Master 2 de Biologie Moléculaire des Microorganismes (BMM), Hali a suivi deux formations internationales en ligne, en entrepreneuriat. La première, à l'université de Montpellier, portait sur la création d'entreprises innovantes, de l'idée à la start-up. La seconde,

à l'université de Liège, portait sur la gestion d'entreprise alternative. Hali est responsable des manipulations en laboratoire, notamment la formulation de la crème solaire, ainsi que de l'étude de marché pour évaluer le potentiel commercial du produit.

Ilhem MERIANE joue un rôle de direction et de supervision, tandis que **Hali SANOGO** est responsable de la partie pratique en laboratoire et de l'étude de marché. Ensemble, ils forment une équipe complémentaire, alliant l'expertise scientifique à la connaissance de l'entrepreneuriat, afin de mener à bien le projet dans sa globalité.

Cette répartition des rôles permet de garantir une approche multidisciplinaire et une gestion efficace des différentes facettes du projet, de la recherche scientifique à la mise sur le marché du produit final.

1.4/ Objectifs du projet

Nos objectifs pour ce projet sont les suivants :

- Devenir le principal fabricant de crème solaire anticancéreuse en Algérie : Nous visons à nous positionner en tant que leader sur le marché national de la cosmétique en proposant une crème solaire innovante et hautement efficace dans la prévention du cancer de la peau. Notre objectif est de capturer une part importante du marché local en offrant un produit de qualité supérieure et en établissant une solide réputation auprès des consommateurs.
- Expansion internationale : À plus long terme, nous avons pour ambition d'étendre notre présence au-delà des frontières de l'Algérie. Nous souhaitons exporter notre crème solaire anticancéreuse vers d'autres pays, en ciblant les marchés où la demande de produits de protection solaire est élevée. Cette expansion internationale nous permettra de devenir l'un des principaux fournisseurs mondiaux de crème solaire, en mettant en avant les propriétés uniques de notre produit.
- Sensibilisation à l'importance de la protection solaire : En plus de développer et de commercialiser notre crème solaire, nous avons pour objectif de sensibiliser le public à l'importance de la protection solaire et de la prévention du cancer de la peau. Nous envisageons de mener des campagnes d'information et d'éducation sur les risques liés à l'exposition solaire excessive et sur l'utilisation adéquate des produits de protection solaire.

Nous espérons ainsi contribuer à réduire le nombre de cas de cancer cutané en Algérie et ailleurs.

Pour atteindre ces objectifs, nous nous engageons à investir dans la recherche et le développement pour continuer à améliorer notre produit, à établir des partenariats stratégiques avec des distributeurs et des acteurs clés de l'industrie cosmétique, et à mettre en place une solide stratégie marketing pour promouvoir notre crème solaire et sensibiliser le public.

1.5/ Calendrier de réalisation du projet

Le projet est planifié selon le calendrier suivant :

Année Universitaire 2022-2023 : réalisation de la première partie

- **Échantillonnage** : Nous avons effectué la collecte d'échantillons de Sebka (sol salin) pour obtenir des sources potentielles de bactéries halophiles. Cette étape est cruciale pour la suite du projet, car elle permet d'identifier les microorganismes adaptés à notre objectif.
- **Isolement des bactéries halophiles** : Nous avons procédé à l'isolement des bactéries halophiles à partir des échantillons collectés, en utilisant des milieux de culture solide spécifiques. Cette étape vise à obtenir des cultures pures de bactéries pour les étapes ultérieures.
- **Sélection, purification et identification de la bactérie productrice** : Nous avons sélectionné les souches de bactéries halophiles les plus prometteuses et avons effectué leur purification afin d'obtenir des cultures de haute qualité. Ces étapes sont essentielles pour garantir la production de l'ectoïne, la molécule clé de notre crème solaire.

Année Universitaire 2023-2024 : réalisation des deux autres parties du projet

- **Formulation de la crème solaire** : Au cours de cette période, nous nous concentrerons sur la formulation de la crème solaire contenant l'ectoïne extraite de la bactérie sélectionnée. Nous procéderons à des essais et des ajustements pour obtenir une formule optimale en termes d'efficacité de protection solaire et de caractéristiques cosmétiques.
- **Étude du marché** : Parallèlement à la formulation de la crème, nous réaliserons une étude approfondie du marché de la cosmétique en Algérie. Cela comprendra l'évaluation de la

concurrence, l'analyse des tendances du marché, l'identification des canaux de distribution et l'établissement d'une stratégie de commercialisation.

- **Production à grande échelle** : Une fois la formule finalisée et l'étude du marché terminée, nous passerons à la production à grande échelle de notre crème solaire. Cela impliquera la mise en place d'installations de production, l'acquisition des matières premières nécessaires et l'optimisation des processus de fabrication pour répondre à la demande prévue.

Au plus tard début juin 2024, nous prévoyons d'avoir réalisé les deux tiers restants du projet, marquant ainsi sa finalisation. Cela inclut la formulation de la crème solaire, l'étude du marché et la mise en place de la production à grande échelle.

2/ Deuxième axe : Aspects innovants

2.1/ Nature des innovations

Notre crème solaire présente plusieurs aspects innovants qui la distinguent des produits existants sur le marché. Voici les principales caractéristiques innovantes de notre crème :

- **Propriétés anti-cancéreuses** : Notre crème solaire est spécialement formulée pour fournir une protection solaire maximale et prévenir les dommages causés par les rayons UV du soleil. En utilisant l'ectoïne, une molécule naturelle extraite de bactéries halophiles, ayant une propriété anti-cancéreuse qui aide à réduire les risques de développer un cancer de la peau.
- **Hydratante** : Notre crème solaire est enrichie d'ingrédients hydratants qui nourrissent la peau et préviennent la déshydratation causée par l'exposition au soleil. Cette propriété contribue à maintenir une peau saine et éclatante tout en offrant une protection solaire efficace.
- **Anti-inflammatoire** : Nous avons inclus des composés anti-inflammatoires dans notre formule pour réduire les inflammations cutanées causées par l'exposition au soleil. Cela permet de calmer la peau et de prévenir les rougeurs et les irritations.
- **Antimicrobienne** : Notre crème solaire contient également des agents antimicrobiens naturels qui aident à prévenir les infections cutanées causées par des microorganismes nocifs. Cela permet de maintenir une peau saine et protégée contre les infections.

- **Formule entièrement naturelle** : Nous mettons l'accent sur l'utilisation d'ingrédients naturels et respectueux de l'environnement dans notre formule. En évitant les substances chimiques agressives, nous offrons une alternative plus sûre et plus naturelle pour protéger la peau contre les rayons UV du soleil.

2.2/ Domaine d'innovation

Notre projet présente un domaine d'innovation unique dans plusieurs aspects :

Première en Algérie et en Afrique : Notre projet est pionnier en Algérie, voire même en Afrique, dans la fabrication d'une crème solaire anti-cancéreuse en exploitant les ressources naturelles présentes dans les Sebkhha. Nous serons les premiers à développer une crème solaire de ce type dans la région, ce qui témoigne de notre volonté d'innover et de répondre aux besoins spécifiques du marché local.

Valorisation des Sebkhha : Nous mettons en valeur les Sebkhha d'Algérie en les utilisant à des fins industrielles. Ces environnements riches en microorganismes d'importance industrielle offrent un potentiel inexploité jusqu'à présent. En extrayant des bactéries halophiles de ces sites, nous parvenons à exploiter leurs propriétés uniques pour la fabrication de notre crème solaire.

Réduction du taux de cancer : En proposant une crème solaire anti-cancéreuse, notre projet vise à contribuer activement à la réduction du taux de cancer de la peau en Algérie. En sensibilisant la population à l'importance de la protection solaire et en offrant un produit innovant qui répond à ce besoin, nous espérons jouer un rôle significatif dans la prévention de cette maladie.

Avantages pour la peau : Notre crème solaire ne se limite pas à la protection contre les rayons UV, elle offre également des avantages supplémentaires pour la peau. Grâce à sa formulation hydratante, anti-inflammatoire et antimicrobienne, elle favorise une peau saine, douce et protégée. Cela différencie notre produit des crèmes solaires traditionnelles en offrant des bienfaits globaux pour la santé de la peau.

Mesure préventive : Notre initiative vise à prévenir les effets néfastes du soleil et à sensibiliser les individus à l'importance de la protection solaire. En offrant une solution préventive, nous encourageons les personnes à adopter de bonnes habitudes dès maintenant pour préserver leur

santé à long terme. Notre projet s'adresse donc à un large public, car il s'agit d'une mesure préventive universelle.

Grâce à ces éléments d'innovation, notre projet se distingue sur le marché en offrant une approche novatrice pour la protection solaire, la valorisation des ressources naturelles locales et la promotion de la santé de la peau.

3/ Troisième axe : Analyse stratégique du marché

3.1/ Le segment du marché

Notre produit vise à cibler un large segment du marché, s'adressant à un marché de masse. La crème solaire anti-cancéreuse que nous proposons répond aux besoins de protection solaire de tous les individus, quels que soient leur âge, leur sexe ou leur type de peau. En visant un segment large, nous cherchons à toucher un maximum de consommateurs potentiels et à répondre à une demande croissante de produits de protection solaire de qualité.

3.2/ Mesure de l'intensité de la concurrence

En Algérie et même en Afrique, les principaux concurrents du marché des crèmes solaires proposent généralement des produits faciles à appliquer sur la peau, souvent composés de produits chimiques. Leur avantage réside dans leur présence établie sur le marché de la cosmétique, ce qui leur confère une base de clients fidèles et une part de marché significative.

Cependant, ces concurrents présentent également une faiblesse en termes de qualité de leurs produits par rapport à notre crème solaire. Notre produit se distingue par sa formulation naturelle et ses multiples bienfaits pour la peau, tels que sa capacité à protéger contre les rayons UV, son hydratation, ses propriétés anti-inflammatoires et antimicrobiennes. Cette différenciation de qualité constitue un avantage compétitif majeur pour notre crème solaire anti-cancéreuse.

En offrant une alternative plus naturelle et plus bénéfique pour la peau, nous sommes en mesure de répondre à une demande croissante des consommateurs pour des produits de protection solaire de meilleure qualité. Nous visons à éduquer le marché sur les risques du soleil et à promouvoir les avantages de notre crème solaire innovante, afin de gagner progressivement des parts de marché.

3.3/ La stratégie marketing

Pour la commercialisation de nos produits, nous avons élaboré une stratégie marketing qui vise à promouvoir et à développer notre présence sur le marché. Voici les différentes actions que nous prévoyons de mettre en place :

➤ **Service client**

Nous mettrons en place un service client réactif et accessible par téléphone et par e-mail. Notre équipe sera formée pour répondre aux questions, aux préoccupations et aux demandes de nos clients de manière professionnelle et efficace. Nous serons à l'écoute de leurs besoins et nous nous efforcerons de fournir un service de haute qualité pour garantir leur satisfaction.

➤ **Présence sur les réseaux sociaux**

Nous reconnaissons l'importance des réseaux sociaux dans la communication et la promotion de nos produits. Nous créerons et gérerons des pages sur les principales plateformes de réseaux sociaux, telles que Facebook, Instagram et Twitter, pour promouvoir nos produits, partager des informations utiles sur la protection solaire, et interagir avec notre communauté. Nous encouragerons les clients à partager leurs expériences avec notre crème solaire et à laisser des avis positifs, ce qui contribuera à renforcer notre image de marque.

➤ **Offres spéciales et promotions**

Nous mettrons en place des offres spéciales et des promotions attractives pour nos clients. Cela peut inclure des réductions sur les prix, des offres "achetez-en un, obtenez-en un gratuitement", des cadeaux gratuits avec l'achat de nos produits, ou d'autres incitations pour encourager les clients à essayer notre crème solaire. Ces offres spéciales contribueront à attirer de nouveaux acheteurs et à fidéliser nos clients existants.

➤ **Partenariats et collaborations**

Nous explorerons des opportunités de partenariats et de collaborations avec d'autres acteurs de l'industrie, tels que les dermatologues, les centres de bien-être, les spas, les salons de beauté, etc. Ces partenariats nous permettront d'étendre notre portée et d'atteindre de nouveaux segments de clientèle. Nous pourrions également envisager des collaborations avec des influenceurs et des blogueurs dans le domaine de la beauté et de la santé pour promouvoir notre crème solaire.

➤ **Communication ciblée**

Nous utiliserons des techniques de marketing ciblé pour atteindre notre public cible. Cela peut inclure des publicités en ligne et hors ligne, des publications dans des magazines spécialisés, des participations à des salons et des événements de l'industrie, ainsi que des campagnes de sensibilisation à la protection solaire à travers des articles et des contenus informatifs. Nous veillerons à adapter notre message en fonction des besoins et des préoccupations spécifiques de notre public cible.

4/ Quatrième axe : Plan de production et d'organisation

4.1/ Le processus de production

1^{ère} Partie

- Échantillonnage : Nous collecterons des échantillons de Sebka (sol salin) en Algérie. Cette étape est cruciale pour obtenir les microorganismes halophiles nécessaires à la production de l'ectoïne.
- Isolement des bactéries halophiles : Les échantillons seront utilisés pour isoler les bactéries halophiles. Cette étape se fera en utilisant des milieux de culture solide spécifiques qui favorisent la croissance des bactéries dans des conditions salines.
- Sélection, purification et identification de la bactérie productrice.

2^{ème} Partie

- Production de l'ectoïne : La bactérie sélectionnée sera cultivée en utilisant un processus de fermentation. Les conditions de culture seront contrôlées pour permettre une production optimale d'ectoïne.
- Extraction de l'ectoïne : Une fois la fermentation terminée, nous procéderons à l'extraction de l'ectoïne à partir du milieu de culture. Nous utiliserons une méthode d'extraction hydroalcoolique pour obtenir une concentration élevée d'ectoïne.
- Caractérisation de l'ectoïne (détection et semi-purification) : L'ectoïne extrait sera caractérisé afin de vérifier sa qualité et sa pureté. Nous utiliserons des techniques d'analyse telles que la chromatographie liquide à haute performance couplé à la spectrométrie de masse (HPLC-MS) pour analyser et élucider la structure de l'ectoïne.

- Lyophilisation du produit semi-purifié : Une fois caractérisée, l'ectoïne semi-purifiée sera lyophilisée. Ce processus permettra de convertir l'ectoïne en une forme lyophilisée, qui peut être utilisée ultérieurement dans la formulation de la crème solaire.

3^{ème} Partie

- Fabrication de la crème : La formulation de la crème solaire comprendra des ingrédients tels que du beurre de karité, du miel, de l'ectoïne, du jus de concombre et de l'eau distillée. Les ingrédients seront mélangés selon une formule spécifique pour obtenir la crème solaire finale. Le pH de la crème sera mesuré afin de choisir un conservateur approprié, car leur efficacité peut varier en fonction du pH.

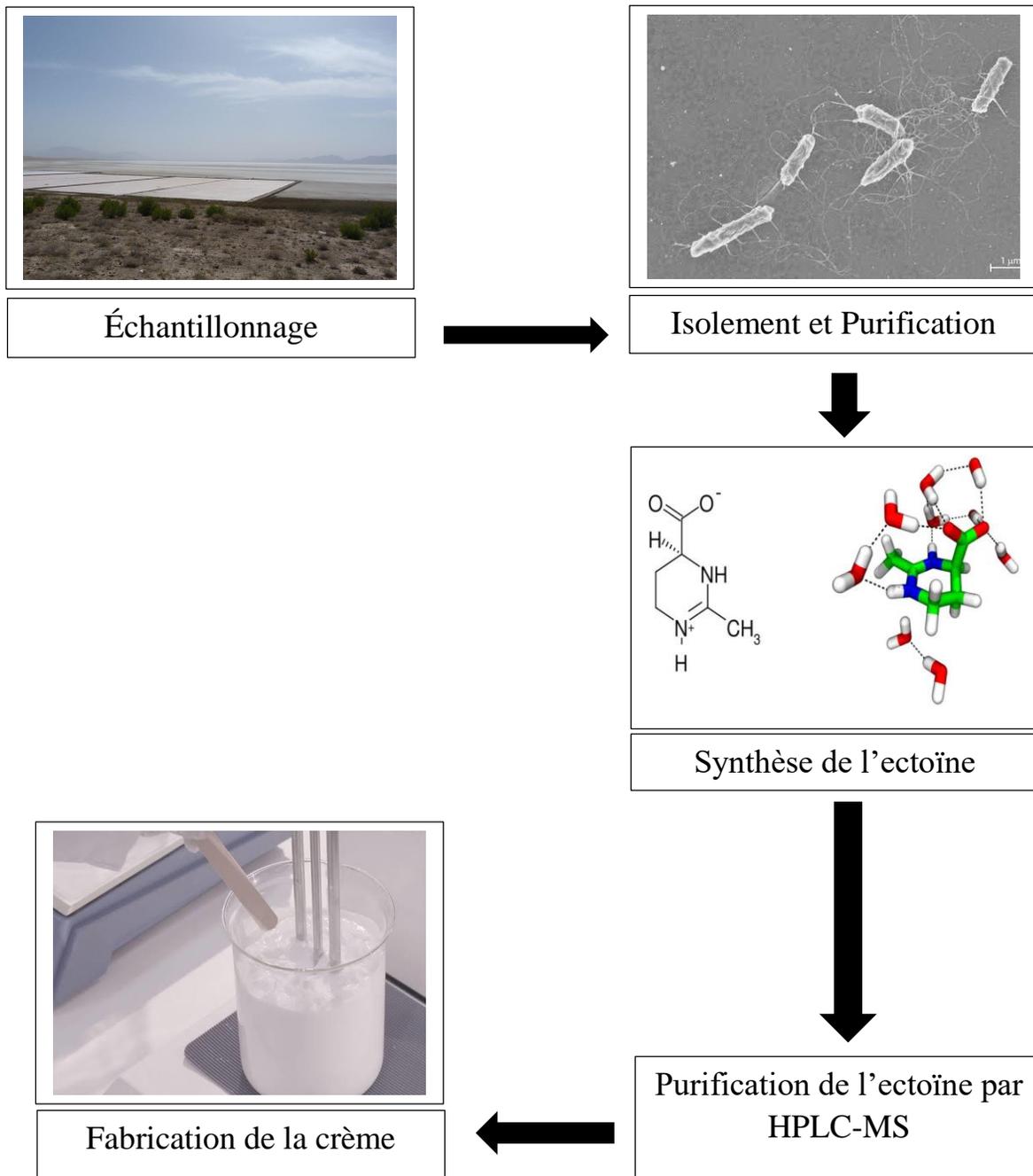


Figure : Etapes Expérimentales de la fabrication de la crème solaire à base d'ectoïne.

4.2/ L'approvisionnement

Pour la matière première, il suffit de prélever du sol de sebka et réussir à isoler une bactérie productrice d'ectoïne. Et en ce qui concerne les matériels du laboratoire, il faut les commander à l'étranger par exemple chez **Fabrilabo** ou chez **CIFL (Comité International des Fournisseurs du Laboratoire)** qui sont les fournisseurs les plus importants des matériaux dont nous avons besoin.

4.3/ La main d'œuvre

Notre projet créera une vingtaine d'emploi au début et au fur et à mesure que l'entreprise va prospérer, la demande de main d'œuvre augmentera. Pour chaque poste, il faut une certaine qualification en rapport avec le poste.

4.4/ Les principaux partenaires

Nos partenaires les plus importants sont :

- Les agences de financement
- L'incubateur de l'université de Constantine 1
- Les Agences de marketing
- Les Agences publicitaires

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master et diplôme startup –
diplôme brevet**

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biologie Moléculaire des microorganismes

**Caractérisation des bactéries halophiles isolées depuis la Sebkha de Ain
Yagout-Batna pour la fabrication d'une crème solaire à base d'ectoïne.**

Les bactéries halophiles sont classées en plusieurs groupes en fonction de leur tolérance en sel et sont trouvées dans différents habitats appelés salins ou hypersalins. Ils survivent dans ces environnements en utilisant deux principaux stratégies qui sont le Salt-in et le Salt-out. Ces bactéries produisent de nombreuses molécules à intérêt biotechnologique.

Ainsi, notre travail qui représente la première partie de notre projet, s'est intéressé à l'étude de 20 souches bactériennes halophiles et a porté sur un isolement à partir de sebkha de Ain Yagout (BATNA), une purification ainsi qu'une identification (macroscopique, microscopique et biochimiques) et une mise en évidence de leurs capacités à produire différentes enzymes : tyrosinase, chititanase, L-glutaminase et L-asparaginase.

Nos résultats ont ainsi démontré que :

- Les 20 souches halophiles isolées, sélectionnées et étudiées appartenaient à différents genres : *Halomonas* (30%), *Bacillus* (5%), *Streptomyces* (5%), *Alkalibacillus* (5%), *Actinoplanes* (5%), 50% ont été non-déterminées.
- Certaines souches ont été très proches phénotypiquement mais varié en termes de caractéristiques biochimiques.
- Les bactéries pigmentées ont été toutes à Gram positif et ne se sont développées que sur le milieu M1.
- L'activité enzymatique la plus produite a été celle de la L-asparaginase (12 souches, 60%), vient ensuite la chitinase et la L-glutaminase (8 souches, 40%) et finalement la tyrosinase (2 souches, 10%).

Dans une deuxième partie qui portera sur la molécule active (ectoïne) qui constitue la molécule clé de notre projet, il faut sélectionner le genre *Halomonas* (06 souches) et procéder à la fermentation, l'extraction et la caractérisation de la molécule cible.

Mot clés : Sebkha de Aïn Yagout-Batna, Bactéries halophiles, Ectoïne, *Halomonas*

Membre du jury :

Présidente du jury : Mme BENKAHOUL Malika (MCA-UFM Constantine 1)

Encadreuse : Mme MERIANE Ilhem (MAA-UFM Constantine 1)

Examinatrice : Mme BOUBEKRI Karima (MCA-UFM Constantine 1)

Présenté par :

SANOGO Hali

Année universitaire 2022-2023