

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique Et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الأرض

Faculté Des Sciences de la Nature et de
la Vie et des Sciences de la Terre

Département : Biologie



جامعة الجيلالي بونعامة – خميس مليانة

Université Djilali Bounaama
Khemis Miliana

قسم : بيولوجي.

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie.

Filière : Sciences Biologiques .

Spécialité : Biotechnologie Microbienne.

THEM

VALORISATION BIOTECHNOLOGIQUE DE MICROORGANISME EXTRÊMOPHILES ISSUES DE SOURCES THERMALES

Réalisé par :

- TABOUCHE Halima
- SENOUCI Sabrina
- HARAOUI Hassna

Soutenu le 02 /07/2024 devant le jury composé de :

Président(e)	M.	HALFAOUI Z	MCB	U. Khemis Miliana
Promoteur	Mr.	AIZI Djameleddine	MCB	U. Khemis Miliana
Examineur	Mr.	BOUCHIBA Z	MCB	U. Khemis Miliana

Résumé :

Dans l'optique d'isoler des bactéries thermophiles, productrices d'enzymes hydolytiques thermostables, un échantillonnage a été pratiqué à partir d'eau de source thermal de Hammam Bouhanifia dans la Wilaya de MASCARA. Un seul isolat a été purifié et caractérisé, avant de procéder à l'extraction des enzymes de la cellulase et de l'amylase, dont la mise en évidence de l'activité hydrolytique a été réalisée par trois techniques (technique des spots, technique des disques et technique des puits). Après révélation par le lugol, l'analyse des activités enzymatiques a permis de détecter la formation d'une zone de lyse en forme d'un anneau clair. Suite à ça, deux applications biotechnologiques ont été explorées. La première est la dégradation de l'amidon afin de produire un sirop de glucose et la seconde est le traitement des fibres cellulosiques utilisées dans le textile.

Mots- clés : Source thermal, bactéries thermophiles, enzymes thermostables, activité hydrolytique.

Abstract :

This study aimed to screen thermophilic isolates from the thermal water source of Hammam Bouhanifia located in the Mascara Province. The hydrolytic activity of the isolate was demonstrated through several tests. One isolate was purified and identified as a Gram-positive thermophilic bacillus based on phenotypic and biochemical characteristics. Two types of hydrolytic activities were investigated using two different substrates (starch and cellulose). The hydrolytic activity of the selected isolate was assessed using three techniques (spot technique, disc technique, and well technique). Analysis of enzymatic activities detected two types of hydrolases: amylase and cellulase, as evidenced by the formation of a lysis zone. The isolated strain showed the largest lysis zone formation for both starch and CMC substrates, and two isolates were selected (IHA1-IHC1). This result was confirmed using two methods: disc method and well method, compared with HCL, and confirmed by observing the isolate penetrating the fibers to destroy them. Finally, our study characterized and identified the isolate as *Bacillus* species capable of surviving in a thermal source (extreme environment) and demonstrating their importance in the field of biotechnology due to their ability to produce bioactive substances such as enzymes.

Key-words : Thermal water source, thermophilic bacteria, enzymes, hydrolytic activity .

ملخص:

تهدف هذه الدراسة إلى فحص العزلات المحبة للحرارة من مياه الينابيع الحرارية بحمام البوحنيفية بولاية معسكر وقد تم إبراز النشاط المائي لهذه العزلة من خلال عدة اختبارات. تم تنقية عزلة واحدة وتحديدتها من خلال الخصائص المظهرية والكيميائية الحيوية، مع ملاحظة وجود عصية جرام + محبة للحرارة بطبيعتها. تم البحث عن نوعين من الأنشطة التحليلية من خلال استخدام ركيزتين مختلفتين (النشا والسليلوز)؛ تم إجراء النشاط المائي للعزلات المختارة بواسطة ثلاث تقنيات (تقنية البقعة، تقنية القرص، وتقنية الأبار). تحليل النشاط الأنزيمي مكن من الكشف عن نوعين من هيدروليز الأميليز والسلوليز من خلال تكوين منطقة تحلل، أظهرت العزلة المعزولة تشكيل أكبر منطقة تحلل لكل من النشاء والـ CMC وتم اختيار الركيزتين (IHA1-IHCI). تم التأكد من هذه النتيجة بطريقتين: طريقة القرص وطريقة البئر، مقارنة مع HCL واعتمادها من خلال ملاحظة العزلة التي تخترق الألياف لتدميرها. وأخيراً، أتاحت لنا دراستنا توصيف وتعريف العزلة على أنها Bacillus التي يمكنها العيش في ينبوع حراري (بيئة قاسية) وإظهار أهميتها في مجال التكنولوجيا الحيوية من خلال قدرتها على إنتاج المواد النشطة بيولوجياً مثل الإنزيمات.

كلمات مفتاحية: عزلة، المحبة للحرارة، الينابيع الحرارية، النشاط المائي، النشاط الأنزيمي، عصية جرام + ، بيئة قاسية، التكنولوجيا الحيوية، الإنزيمات.

Remerciements

Tout d'abord, nous exprimons notre gratitude envers le tout puissant ALLAH pour nous avoir donné la force, le courage et la patience nécessaires pour mener à bien ce travail.

Il est difficile de résumer en quelques lignes notre reconnaissance envers notre encadrant de mémoire, Dr. AIZI Djameleddine, Maître de conférences classe B à l'université Djilali Bounaama de Khemis Miliana, sa guidance, sa confiance et sa patience ont joué un rôle crucial dans la réalisation de ce travail. Ses explications éclairantes ont éclairci notre chemin de recherche, et sa collaboration a été précieuse pour mener ce modeste travail à bien.

Nous lui adressons des remerciements chaleureux.

Nous remercions les estimés membres du jury Mme bouchiba et Mme halfaoui d'avoir accepté d'évaluer notre travail et nous apprécions leur empressement à examiner la recherche avec soin et attention. Nous apprécions leurs précieux commentaires qui ont contribué à son amélioration et à son développement.

Nous exprimons nos sincères remerciements et notre appréciation à tous nos professeurs du Département de biologie, qui ont déployé de grands efforts pour nous enseigner et nous fournir les connaissances et les compétences nécessaires pour mener à bien cette recherche. Nous les remercions pour leur patience et leur motivation, et nous prions pour leur bonne santé et leur bien-être.

Nous remercions le Directeur Moulay Ali et toute l'équipe du laboratoire pédagogique de la Faculté des Sciences Naturelles, de la Vie et de la Terre, et nous remercions tout particulièrement nos collègues du département de biologie pour leur coopération et leur soutien. Nous apprécions leur aide, qui a contribué à surmonter les difficultés et à faciliter la réalisation des travaux.

Nous remercions tous ceux qui ont contribué directement ou indirectement à la réalisation de ce travail, et nous apprécions leur soutien et leurs encouragements. Nous espérons que ces travaux apporteront une valeur scientifique utile et contribueront à l'avancement de la science et des connaissances.

En conclusion, nous renouvelons nos sincères remerciements et notre appréciation à tous, et nous prions Dieu tout-puissant de nous accorder, ainsi qu'à eux, le succès pour le bien de l'islam et des musulmans.

Merci à tous...

DEDICACES

*À l'aide de ALLAH le tout puissant, qui m'a tracé le chemin
de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :*

À mes chers parents,

*Je souhaite exprimer ma gratitude envers mes parents pour l'éducation
exemplaire qu'ils m'ont prodiguée, ainsi que pour leur amour, leurs
encouragements, leur soutien constant, leur affection et la confiance qu'ils
ont placée en moi. Qu'ALLAH veille sur eux et leur accorde une vie longue et
heureuse, empreinte de tendresse, de noblesse et d'affection. Je tiens à leur
témoigner ici toute ma profonde reconnaissance.*

À ma chère sœur, future avocate, SamSoum Mae

*et à mon chers frères MEHAMMED AMINE ,ISLAM,ABD EL AZIZ , je
suis reconnaissante pour leur soutien et leurs encouragements constants.*

Qu'Allah les protège et leur accorde bonheur et réussite.

*Je voudrais également adresser mes vœux de longévité et de bonheur à mes
grands-parents, mes tantes et mes oncles. Qu'Allah veille sur eux.*

*Un grand merci à mes chères amies, véritables sœurs de cœur, pour leur
soutien et leur amitié. Je tiens à exprimer ma reconnaissance particulière
envers à MEHAMMED, pour son aide et son soutien précieux tout au long
de ce travail.*

*Enfin, je souhaite exprimer ma gratitude envers toute la promotion de
Biotechnologie Microbienne de 2023-2024.*

AHLAM HALIMA.

DEDICACE

*Je remercie Dieu qui reste toujours avec nous et qui Il nous a donné
patience et santé tout au long de notre vie, notamment lors des réalisations
Ce travail.*

Je consacre mon travail

A mes chers parents pour tous leurs sacrifices, leur tendresse et leur amour,

*Ils sont un bon modèle pour les parents et une source de force qui durera
toute une vie, si Dieu le veut. Que Dieu les protège avec une bonne santé et
une longue vie, et sans eux, je ne peux pas Je ne serais jamais arrivé là où je
suis.*

*À mes frères Muhammad, son fils Youssef, Abd el Razak, son fils Abdul
Rahman, Ahmed, Hicham et Khaled, je les remercie pour leur soutien et
j'espère que Dieu les protégera.*

À mes collègues Halima et Hassna pour votre coopération lors de ce travail.

*À mes proches : Ahlam, Sumaya, Najat, Khaira, Buchra, Delilah, Asmaa,
Lamia, Kholoud, Nasira, Habiba, Aisha, Fatima, Anisa, Jawhar.*

Aux étudiants de Master en Biotechnologie Microbienne de 2023-2024 .

À tous ceux que j'aime.

Sabrina.

DEDICACE

Tout d'abord, je remercie Dieu de m'avoir accordé le succès dans la réalisation de ce travail.

Je dédie cet humble travail à

Ma mère, Zahra, je demande à Dieu d'avoir pitié d'elle

À mon cher père arabe, vous avez été mon soutien et ma force pour aller de l'avant. Je ne peux pas exprimer l'amour, l'appréciation et le respect que j'ai pour vous dans mon cœur.

À ma belle-mère taouss pour m'avoir soutenu et motivé à poursuivre ma carrière, que Dieu prolonge sa vie.

A mes chers frères Moussa, Belkacem, Ali et Abdelkader, merci pour vos encouragements et votre confiance en moi.

À mes sœurs Fatima, ses enfants Nono et Mohammed Amin et ses poussins Lilian, Rabia et Sabrina, je suis reconnaissant pour votre soutien et votre amour.

À mes collègues Halima et Sabrina pour votre coopération dans ce travail.

Au groupe biotechnologie microbienne 2023/2024 .

En conclusion, je remercie tout le monde de loin et de près.

Hassna.

Liste des figures

Figure 1 :	Croissance microbienne après 24h d'incubation.	29
Figure 2 :	Observation microscopique des isolats sélectionnées . A :isolat amidon ,B :isolat cellulosee .	30
Figure 3 :	Observation macroscopique des isolats sélectionnées . A : milieu de culture amidon ,B : milieu de culture cellulose.	30
Figure 4 :	Activité enzymatique de isolat (AC) par la méthode des spots. A : Activité amylolytique , B : Activite cellulolytique.	31
Figure 5 :	Activité enzymatique de isolat (AC) par la méthode des disques ,A :Activie amilolytique , B :Activite cellulolytique .	33
Figure 6 :	Activité anzymatique de isolat (AC) par la méthode des puits . A : Activite amilolytique , B :Activite cellulolytique	33
Figure 7 :	Hydrolyse de l' Amidon.	35
Figure 8 :	Observation au Microscopique de l'hydrolyse de cellulose .	37

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Classification des bacteries selon leur temperature de croissance.	8
Tableau 2 :	Classification des bactéries selon le pH de croissance .	8
Tableau 3 :	Classification des bactéries selon la osmolarité de croissance Certains	9
Tableau 4 :	Les enzymes amylolytiques thermostables : origines et propriétés .	13
Tableau 5 :	microorganismes thermophiles producteurs de xylanases Thermostables.	19
Tableau 6 :	Chitinases thermostables : origines et propriétés.	21
Tableau 7 :	Autres enzymes des thermophiles et leurs applications .	22
Tableau 8 :	Les résultats des observations microscopique et macroscopique.	30
Tableau 9 :	Diamètre des zones de lyses d' isolat obtenus sur les deaux milieau(amidon et cellulose) par la méthode des spots .	31-32
Tableau 10 :	Diamètre des zones de lyses des différents isolats obtenus par la méthode des disque.	33
Tableau 11 :	Diamètre des zones de lyses des différents isolats obtenus par la méthode des puits.	34

Liste des abréviations

% : pourcentage.

°C : Degré celsius.

AC : Amidon Cellulolytique

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ATP : Adénosine triphosphate.

BN : Bouillon Nutritif.

CMC : Carboxyméthyl cellulose.

g : gramme.

H : Heure.

Km : kilomètre

M : mètre.

Min : Minute.

ml : Millilitre.

mm : Millimètre.

NaCl : Chlorure de sodium.

NAG : N-acétylglucosamine.

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne.

PH : Potentiel hydrogène.

pHopt : Potentiel hydrogenique optimum.)

S : secondes

Sp : Species (espèce).

T : Température.

Topt : Température optimale.

Tr/min : Tour par minute.

Table des matières

- Résumé
- Liste des figures
- Liste des tableaux
- Abréviations
- Introduction.....1

CHAPITRE I :Bactéries extrêmophiles

- I. Historiques.....4
- II. Propriétés des extrêmophiles.....5
- III.Milieux extrême.....5
 - III.1.Bactéries thermophile.....6
 - III.2.Milieux alcalin.....6
 - III.3.Milieux acides7
- IV. Classification des extrêmophiles.....7
- V. Importance biotechnologiques des micro-organisms extrêmophile.9

CHAPITRE II :Les Enzymes industrielles

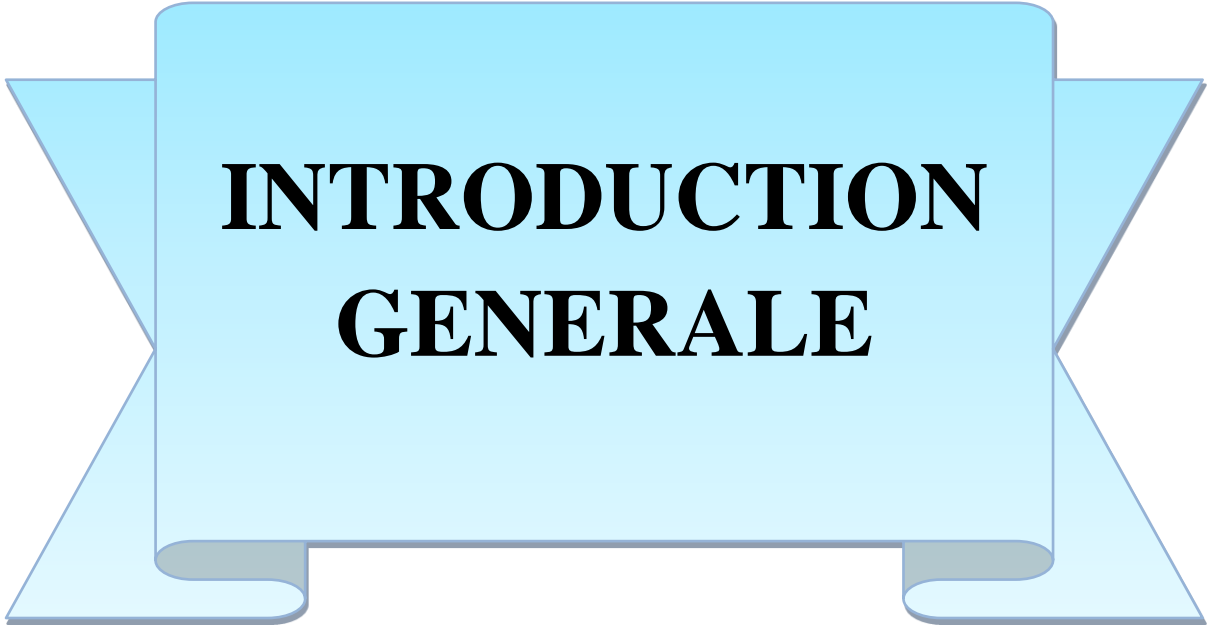
- I. Les avantages de l'utilisation des thermo-philés dans L'industri.....11
- II. Les applications biotechnologiques.....12
 - II.1.Les enzymes thermostables.....12
 - II.1.1.Les enzymes amylolytiques.....12
 - II.1.2.Les ADN polymérase.....14
 - II.1.3.Les enzymes lipolytiques.....15
 - II.1.4.Les enzymes protéolytiques.....16
 - II.1.5.Les enzymes cellulolytique.....18
 - II.1.6.Les enzymes xylanolytiques.....18
 - II.1.7.Les enzymes chitinolytiques.....20
 - II.1.8.Autres enzymes thermostable.....21

Chapitre III : MATERIEL ET METHODES

I. Objectifs du travail.....	24
II. Lieu de travail	24
III. Présentation du site de prélèvement	24
IV. Echantillonnage.....	24
V. Isolement.....	24
VI. Sélection sur milieu de culture solide CMC(carboxyméthylcellulose) et L'amidon.	25
VII. Sélection sur milieu de culture liquide (CMC et l'amidon)	25
VIII. Identification d'isolat purifiés	25
VIII.1.Caractérisation culturale et morphologique des souches	25
VIII.1.1.Observation macroscopique.	25
VIII.1.2.Observation microscopique.	25
IX. Teste de l'activité enzymatique chez l'isolat.....	26
IX.1.Amylase. et cellulose	26
IX.1.1.Par la méthode des spots.	26
IX.1.2.Par la méthode des disque	26
IX.1.3.Par la méthode des puits	26
➤ Révélation	26
IX.1.4.Hydrolyse de l'amidon	27
IX.1.5.Dégradation de cellulose	27

Chapitre IV : RESULTATS ET DISCUSSION

I. Isolement et sélection d' isolat.....	29
II. Identification phénotypique d' isolat.. ..	29
II.1.Les caractères macroscopique et microscopique d' isolat	29
III.Activité enzymatique	31
III.1.Activité enzymatique	31
III.1.1.Par la méthode des spots	31
III.1.2.Par la méthode des disques.	32
III.1.3.Par la méthode des puits.	32
III.1.4.Hydrolyse de l'amidon	35
III.1.5.Dégradation de la cellulose.....	36
• Conclusion	38
• Références bibliographiques.....	41
• Annexes	



**INTRODUCTION
GENERALE**

INTRODUCTION GENERALE

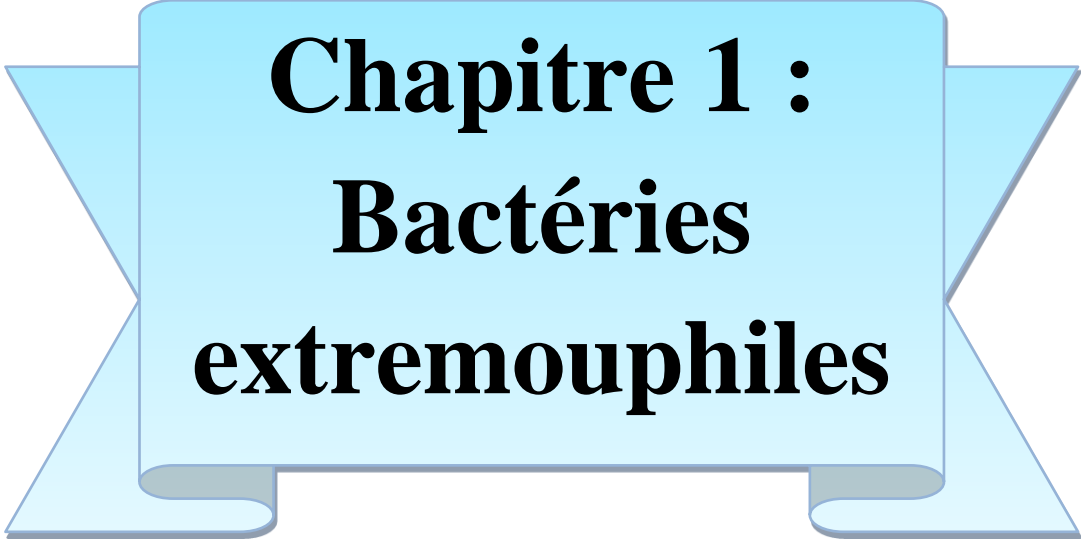
La détection de micro-organismes dans des environnements auparavant considérés comme stériles a montré que les conditions physico-chimiques favorables à la vie sont plus variées que ce que l'on pensait. Les organismes désignés sous le terme « extrêmophiles » ne se contentent pas de survivre dans des conditions extrêmes, mais ils prospèrent dans ces environnements (Franzetti., 2019).

Grâce à leur remarquable capacité d'adaptation, les microorganismes peuvent prospérer dans des environnements extrêmes tels que les sources thermales, la glace, les sources hydrothermales sous-marines et les marais salants. Ils développent diverses stratégies moléculaires pour survivre dans des conditions hostiles à la vie (Schlegel et Jannasch., 2006). Cette adaptabilité a conduit les scientifiques à explorer un nouveau groupe fascinant de microorganismes connus sous le nom de « microorganismes extrêmophiles ». Les chercheurs sont particulièrement intéressés par les caractéristiques et les mécanismes permettant à ces microorganismes de survivre dans de tels milieux extrêmes (Quérellou et Guézennec., 2010).

Parmi le grand groupe des microorganismes extrêmophiles, on distingue les thermophiles qui se développent à des températures élevées. Ces thermophiles se divisent en deux groupes principaux : les thermophiles (>60°C) et les hyperthermophiles (>80°C) (Madigan et Martinko., 2007). On les trouve dans des environnements tels que les zones volcaniques, les sources thermales, les fumerolles, les geysers et même les événements hydrothermaux. Ils sont également présents dans des environnements artificiellement chauds. L'étude de ces microorganismes est devenue un domaine de recherche important et passionnant pour les microbiologistes et les biochimistes. En effet, l'exploitation de ces microorganismes, de leurs métabolites et enzymes sécrétées offre un large éventail d'applications dans divers domaines industriels, agricoles et médicaux, et propose des solutions potentielles aux problèmes environnementaux ainsi qu'à la demande croissante de biocarburants (Aanniz *et al.*, 2015 ; Urbietta *et al.*, 2015).

Les enzymes provenant de microorganismes thermophiles, également connues sous le nom de « thermoenzymes », sont caractérisées par leur thermostabilité et leur résistance. Elles sont capables de catalyser des réactions à des températures élevées tout en conservant leurs propriétés et leurs activités enzymatiques. Cette capacité les rend plus attrayantes dans les processus industriels par rapport aux enzymes mésophiles, dont les fonctions pourraient sinon être limitées ou altérées. Les propriétés de thermostabilité des thermoenzymes ont suscité l'intérêt de divers secteurs industriels, notamment les industries alimentaires, chimiques, pharmaceutiques, du papier, de la pâte à papier, des détergents, du traitement des déchets, ainsi que le secteur de la synthèse organique (Aanniz *et al.*, 2015).

L'Algérie possède une richesse inestimable en termes de diversité géologique et écologique, abritant pas moins de 280 sources thermales. Certaines de ces sources sont exploitées pour leurs vertus thérapeutiques reconnues. Ces environnements constituent des terrains d'étude privilégiés pour la découverte de nouvelles souches productrices de biomolécules, principalement des enzymes. De nombreux chercheurs aspirent à explorer ces sources de manière approfondie afin d'identifier un large éventail d'enzymes thermostables. Des travaux de recherche sont actuellement en cours pour évaluer leur potentiel dans la production de divers produits d'importance biotechnologique (Nshimiyimana *et al.*, 2018). Dans cette même optique s'enregistre notre étude qui a été menée sur la source thermal de Hammam bohnifia comme moyen d'isolement de bactéries thermophyles avec une large compétence à sécréter des enzymes hydrolytiques, tout en examinant ses applications biotechnologiques.



Chapitre 1 :
Bactéries
extremouphiles

I) Historique :

Les micro-organismes connus sous le nom d'extrêmophiles sont spécialement adaptés à des environnements écologiques spécifiques où ils se développent activement, alors qu'ils ne survivent pas dans des conditions « ordinaires ». Certains dans des températures extrêmement froides ou chaudes (psychrophiles et thermophiles, respectivement), et/ou dans des environnements très acides ou basiques (acidophiles et alcalophiles, respectivement), ainsi que sous des pressions élevées (piézophiles) (Gomri., 2012).

Le terme « extrêmophiles » a été introduit pour la première fois par Mac Elroy en 1974. Un extrêmophile est défini comme un organisme dont les conditions de croissance optimales se trouvent en dehors des environnements considérés comme normaux (Kristjansson et Hreggvidsson., 1995). Cette notion diffère de celle de la résistance aux conditions extrêmes (Irwin et Barid., 2004).

Les extrêmophiles, présents dans les trois domaines du vivant – bactéries, archées et les eucaryotes comprennent des micro-organismes commensaux qui jouent un rôle crucial dans la nutrition, comme le souligne (Jane., 2004).

Dans la fin des années 60, Thomas Brock a trouvé les premières espèces capables de se développer à des températures d'environ 70°C dans les sources thermales du parc de Yellowstone aux États-Unis. En 1969, il a isolé *Thermus aquaticus*, ce qui a conduit à la découverte des ADN polymérase thermostables (Djinni., 2017). Au cours de l'année 1969, au Japon, Horikoshi découvre l'existence de microorganismes qui prospèrent uniquement dans des environnements de pH alcalin, une réalité largement négligée jusqu'alors. Par la suite, les microbiologistes allemands W. Zillig et K. Stetter ont donné un nouvel élan à ces recherches (Guézennec., 2014). Ils ont systématiquement exploré les environnements les plus extrêmes de la planète, en privilégiant les climats chauds et en mettant en lumière les espèces capables de survivre à des températures atteignant 121°C, soit la température standard pour les opérations de stérilisation en

laboratoire et dans l'industrie. Entre 1980 et 2000, Le laboratoire K. Stetter a découvert plus de 50 espèces inédites appartenant à de nouveaux environnements. Des recherches ont émergé, explorant de nouveaux genres voire des catégories familiales différentes. Ces travaux, ainsi que d'autres portant sur divers types d'environnements, ont donné naissance à la notion d'extrémophiles (Guézennec., 2014) .

II) Propriétés des extrêmophiles :

Les environnements extrêmes sont caractérisés par des conditions physiques et chimiques très difficiles pour la vie des organismes adaptés aux environnements normaux. Cependant, ces milieux sont propices au développement des organismes extrêmophiles, qui ont la capacité de s'adapter à ces environnements (Zettam., 2013).

Contrairement à la simple résistance aux conditions extrêmes, le concept d'extrémophilie implique une adaptation de l'ensemble de la machinerie cellulaire à ces conditions, permettant aux cellules de fonctionner de manière optimale. Cependant, chaque composant cellulaire ne fonctionne pas nécessairement de manière optimale dans ces environnements. Par exemple, le pH intracellulaire des souches alcalophiles peut différer de celui du milieu extérieur, tandis que pour les espèces acidophiles (Querellou *et al.*, 2013). En ce qui concerne d'autres paramètres comme la température et la pression, les conditions du milieu extérieur influent sur l'ensemble des cellules, nécessitant une stabilité et une fonctionnalité des constituants cellulaires. Bien que la stabilité de chaque biomolécule prise individuellement dans les conditions du milieu extérieur ne soit pas toujours requise, le milieu intérieur peut bénéficier de certains solutés organiques ou d'une protection au sein de complexes macromoléculaires (Yousfi., 2013).

III) Milieux extrêmes :

Les environnements extrêmes sont des zones écologiques caractérisées par des conditions physiques et chimiques très inhospitalières pour la vie des organismes adaptés aux habitats normaux. En revanche, ces milieux offrent des conditions propices

au développement des organismes extrêmophiles, qui possèdent des capacités d'adaptation spécifiques à ces environnements hostiles (Meskher., 2017).

III.1. Bactéries thermophiles :

Les thermophiles sont des organismes qui se distinguent par leur capacité à vivre et prospérer dans des conditions de température extrêmement élevées. Au cours de la dernière décennie, ils ont suscité un grand intérêt dans les domaines de la science fondamentale et appliquée. Du point de vue de la biotechnologie, les thermophiles sont particulièrement intéressants en tant que sources d'enzymes uniques aux propriétés peu communes, utilisées dans la fermentation à haute température, le traitement des déchets (Fandi *et al.*, 2012).

Ces environnements sont souvent riches en produits chimiques réduits provenant de l'intérieur de la terre, ce qui fait que de nombreuses bactéries thermophiles sont chimiolithotrophes, réagissant avec l'hydrogène et le fer ferreux (Amend *et al.*, 2003). Par conséquent, l'extraction d'énergie par l'oxydation des composés de soufre produit de l'acide sulfurique, ce qui rend souvent les eaux géothermiques très acides (Dahmane et Daoudi., 2018).

III.2. Milieux alcalins :

Les microorganismes alcalophiles se développent de manière optimale dans des milieux ayant un pH élevé, généralement entre 10 et 12, mais leur multiplication est très lente voire inexistante dans des milieux plus proches du neutre, autour de 6,5 (Horikoshi., 1999).

Les alcalophiles sont fréquemment isolés dans des habitats naturels qui affichent des niveaux élevés de chlorure de sodium (NaCl), ce qui les qualifie également de haloalcalophiles (Gareeb et Setati., 2009).

Sous des conditions alcalines, les micro-organismes rencontrent des défis énergétiques car les ions d'hydrogène sont très rares, rendant difficile l'utilisation de l'ATP-synthase pour produire de l'énergie. Pour résoudre ce problème, ils expulsent

activement ces ions et importent d'autres pour maintenir leur milieu intérieur proche de la neutralité. En outre, la paroi cellulaire chez les alcalophiles agit comme une barrière de défense contre les conditions environnementales extrêmes (Herikoshi., 2006).

III.3.Milieus acides :

Les micro-organismes acidophiles se développent de manière optimale dans des environnements avec un pH d'environ 2 (Morozkina *et al.*, 2010), et ils sont souvent trouvés dans des habitats acides. En revanche, les acidotolérants peuvent survivre dans des environnements avec un pH neutre (Horikoshi., 1999).

Les organismes acidophiles se trouvent dans les trois domaines du vivant (archées, bactéries, eucaryotes) selon (Baker-Austin et Dopson., 2007). Certains d'entre eux ont des mécanismes pour expulser les protons intracellulaires, maintenant ainsi le pH de leur cytoplasme proche de la neutralité, ce qui signifie que leurs protéines intracellulaires n'ont pas besoin de développer des mécanismes de stabilité. Cependant, d'autres acidophiles, comme *Acetobacter aceti*, ont un cytoplasme acide et doivent utiliser des mécanismes pour expulser les protéines intracellulaires (Baker-Austin et Dopson., 2007).

Cependant, d'autres acidophiles, comme *Acetobater aceti*, ont un cytoplasme acide et doivent utiliser des mécanismes pour expulser les protéines intracellulaires (Baker-Austin et Dopson., 2007). Certains acidophiles possèdent des mécanismes qui leurs permettent de faire ressortir les protons intracellulaires pour garder le ph de leur cytoplasme proche de la neutralité. Donc leur protéines intracellulaires ne nécessitent pas de developper des mécanismes pour le maintien de leur stabilité. Par contre, des acidophiles comme *Acetobacter aceti* possèdent un cytoplasme acide et des mécanismes pour expulser les protéines intracellulaires à l'extérieur afin d'assurer leur stabilité (Menzel et Gottschalk., 1985).

IV. Classification des extrêmophiles :

Les microorganismes extrêmophiles se divisent selon les conditions physico-chimiques extrêmes auxquelles ils sont adaptés. Par exemple, ils sont classés en microorganismes hyperthermophiles, thermophiles et psychrophiles en fonction de la température. Pour le pH, ils sont distingués en acidophiles et alcalophiles, tandis que pour la salinité, on les classe en halophiles (Detay et Thomas., 2018).

La classification et quelques exemples de genres extrêmophiles sont présentés dans le (tableau suivant) :

Tableau N°1 : Classification des bacteries selon leur temperature de croissance (Pakchung *et al.*, 2006).

Extrêmophiles	Température	Genre
<i>Thermophiles</i>	Hyperthermophiles (>85 °C)	<i>Sulpholobus</i> <i>Picrophilus</i>
<i>Thermophiles</i>	Thermophiles (65–85°C)	<i>Clostridium</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Geobacillus</i> , <i>Thermus</i>
<i>Thermophiles</i>	Thermophiles modérés (45–65°C)	<i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Geobacillus</i>
<i>Psychrophiles</i>	Basse température (<15 °C)	<i>Psychrobacter</i> <i>Alteromonas</i>

Tableau N°2 : Classification des bactéries selon le pH de croissance (Pakchung *et al.*, 2006).

Extrêmophiles	pH	Genre
<i>Alcalophiles</i>	pH élevé (ph >9°C)	<i>Pseudoalteromonas</i> <i>Bacillus</i>
<i>Acidophiles</i>	pH faible (ph <2–3 °C)	<i>Sulpholobus</i> <i>Picrophilus</i>

Chapitre 1 : Bactéries extrêmophiles

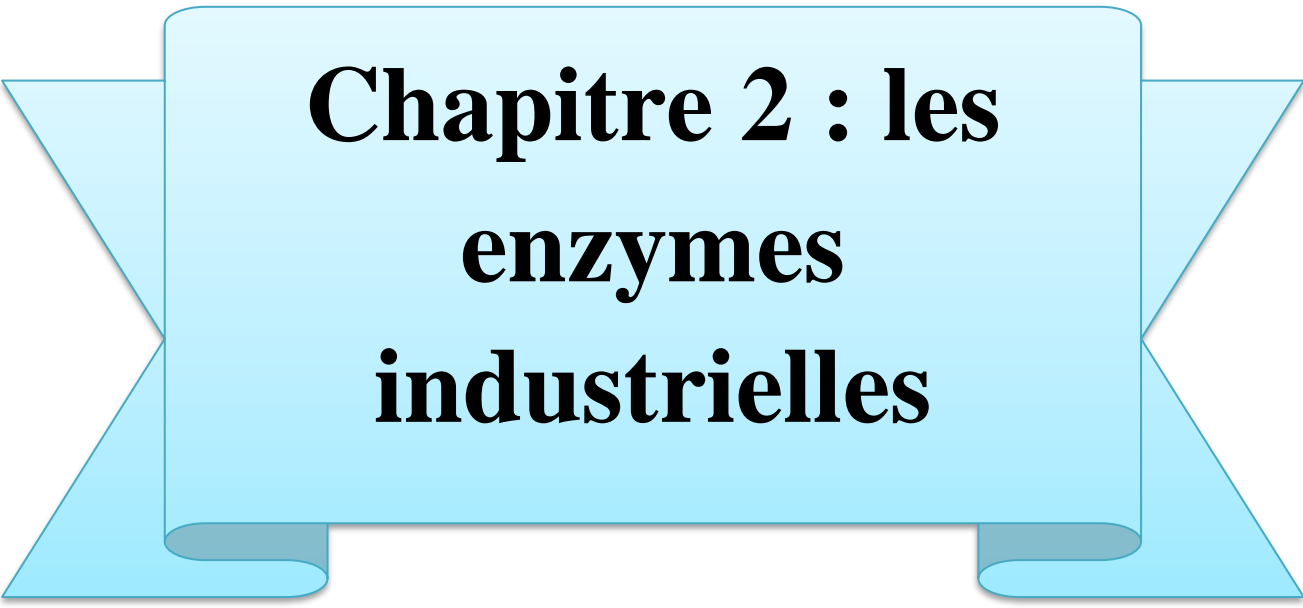
Tableau N°3 : Classification des bactéries selon la osmolarité de croissance (Pakchung *et al.*, 2006).

Extrêmophiles	Osmolarité	Genre
<i>Halophiles</i>	Concentration élevée en sel (NaCl 2–5 M)	<i>Halobacterium</i> <i>Haloferax</i> <i>Halococcus</i>
<i>Piézophiles</i>	Haute pression (jusqu'à 130 MPA)	<i>Shewanella</i> <i>Moritella</i> <i>Pyrococcus</i>
<i>Metalophiles</i>	Concentrations élevées de Métaux	<i>Ralstonia</i>
<i>Radiophiles</i>	Niveau de rayonnement Elevé	<i>Deinococcus</i> <i>Thermococcus</i>

V.Importance biotechnologiques des micro-organismes extrêmophiles :

Il existe deux types d'applications dans les domaines de la biotechnologie, première repose sur l'utilisation directe des organismes, notamment dans des domaines tels que la bioremédiation (processus visant à restaurer un écosystème en stimulant les populations microbiennes indigènes) et la biolixiviation (utilisation de microbes pour le traitement des minerais). Le deuxième type d'applications utilise les biomolécules issues des extrêmophiles, telles que les enzymes, les lipides, les polymères, les extrêmolytes et une variété de métabolites secondaires (Quérellou et Guézennec., 2013).

Les micro-organismes sont une source abondante d'enzymes uniques, cruciales pour la biotechnologie, particulièrement les enzymes extrêmophiles, ou extrêmozymes, en raison de leur robustesse et capacité à fonctionner dans des conditions extrêmes; Les enzymes halophiles, par exemple, sont utiles dans des milieux salés et divers pH, trouvant des applications dans l'agroalimentaire, l'industrie papetière et textile . Les enzymes thermophiles, comme la Taq polymérase de *Thermus aquaticus*, sont essentielles pour la PCR en raison de leur résistance à haute température; Les enzymes psychrophiles sont recherchées pour leur efficacité à basse température, réduisant ainsi la consommation d'énergie (van den burg. , 2003).



**Chapitre 2 : les
enzymes
industrielles**

I. Les avantages de l'utilisation des thermophiles dans l'industrie :

En plus de l'aspect fondamental évoqué par les nouvelles souches thermophiles et hyperthermophiles, ces microorganismes pourraient renfermer des molécules bénéfiques pour les processus biotechnologiques opérant à des températures élevées (Postec., 2005).

L'utilisation des microorganismes thermophiles en biotechnologie présente plusieurs avantages :

- La contamination par les mésophiles semble être réduite lorsque les cultures sont maintenues de manière continue à des températures dépassant 60 °C, comme indiqué (Vielle et Zeikus., 2001 ; Haki et Rakshit., 2003).
- L'élévation de la température accroît la disponibilité et la solubilité des composés organiques, conduisant à une augmentation du taux de production, ainsi qu'à l'ionisation de certains substrats ou produits (Scriban., 1999).
- La réduction de la viscosité des milieux de culture peut augmenter la diffusion des molécules, accélérant ainsi les réactions enzymatiques et favorisant le déplacement de l'équilibre (Lin *et al.*, 1998 ; Scriban., 1999 ; Abdel-fattah., 2002 ; Haki et Rakshit., 2003).
- Certes, l'emploi de micro-organismes thermophiles présente des bénéfices tels que la réduction des coûts liés au refroidissement post-stérilisation et la facilitation des transformations sélectives à des températures élevées pour les composés insolubles (Scriban., 1999).
- La facilité d'isolement et de culture, la diversité des habitats, la réduction des risques de contamination, les besoins nutritionnels simples, la croissance rapide et la formation homogène du mycélium sont des facteurs souhaitables qui permettent une application à grande échelle des champignons thermophiles (Maheshwari *et al.*, 2000).

Les enzymes des thermopstables peuvent avoir des applications commerciales importantes car :

- Leur activité cruciale à des températures élevées, compatible avec les processus industriels entre 50°C et 100°C, en fait des candidats idéaux.
- leur purification après un traitement thermique est aisée, et elles se révèlent plus économiques, nécessitant moins de quantité pour obtenir une activité similaire.
- Leur stabilité à température ambiante prolonge leur durée de conservation dans les supermarchés.
- Leur résistance aux agents chimiques dénaturants, tels que les surfactants et les chélateurs de métaux, les rend encore plus attrayantes.
- Certaines de ces enzymes peuvent également servir de modèles pour comprendre la thermostabilité et la thermoactivité.

II. Les applications biotechnologiques :

II.1. Les enzymes thermostables :

Les micro-organismes thermophiles, grâce à leurs enzymes thermostables, offrent des opportunités biotechnologiques intéressantes. Les enzymes thermostables et hyperthermostables, connues sous le nom de « thermozymes » et faisant partie des « Extremozymes », jouent un rôle crucial en tant que biocatalyseurs dans divers processus biotechnologiques, qu'ils soient de nature scientifique ou industrielle, compte tenu de l'utilisation fréquente de températures élevées dans la plupart des procédés industriels (Madigan *et al.*, 2003).

II.1.1. Les enzymes amylolytiques :

Les amylases microbiennes sont une alternative efficace aux méthodes chimiques traditionnelles pour l'hydrolyse de l'amidon, comme le suggèrent (Jensen et Olsen.,

Chapitre 2 : les enzymes industrielles

1992). Il existe divers types d'enzymes amylolytiques, tels que l' α -amylase, β amylase, la glucoamylase et la pullulanase, classées en fonction des liaisons osidiques hydrolysées (Bousseboua., 2005). En termes de mode de clivage, elles sont catégorisées en endoamylases, exoamylases et enzymes débranchantes (Haki et Rakshit., 2003).

Les amylases microbiennes, produites par des bactéries et des mycètes thermophiles pendant la phase stationnaire, présentent un intérêt significatif en biotechnologie, selon (Uma Maheswar Rao et Stayanarayana ., 2003). Les enzymes amylolytiques jouent un rôle crucial dans divers processus industriels tels que la fabrication du sucre, la liquéfaction de l'amidon pour la production d'alcool, les textiles et l'industrie papetière (Mamo *et al.*, 1999 ; Jensen et Olsen., 1992).

Ces processus impliquent souvent l'utilisation d'amylases thermostables, opérant à des températures élevées (Mamo *et al.*, 1999). La bioconversion de l'amidon se déroule en trois étapes : gélatinisation, liquéfaction avec hydrolyse partielle et perte de viscosité, et enfin saccharification conduisant à la formation de sirops de glucose, de maltose et d'oligosaccharides (Vielle et Zeikus., 2001 ; Haki et Rakshit., 2003).

Les α -amylase présentes dans les améliorants de panification jouent un rôle essentiel en normalisant la farine, accélérant le processus de fermentation, réduisant la viscosité de la pâte et diminuant le temps de pétrissage. Certaines d'entre elles agissent également en tant qu'agents antirassissants, prévenant la rétrogradation de l'amidon et préservant la fraîcheur du pain lors du stockage (Bejar., 2006).

Tableau 4 : Les enzymes amylolytiques thermostables : origines et propriétés (Bouamoucha *et al.*, 2008).

Enzyme	Origine	Propriétés
α -amylase	<i>Bacillus sp. TS. 23</i>	$T_{opt} : 70^{\circ}\text{C}$
α -amylase	<i>Bacillus thermoleovorans NP54</i>	$\text{pH}_{opt} : 9.0$ $T_{opt} : 100^{\circ}\text{C}$

Chapitre 2 : les enzymes industrielles

<i>α-amylase</i>	<i>Pyrococcus woesei</i>	pH _{opt} : 8.0 T _{opt} : 100°C
<i>β-amylase</i>	<i>Clostridium Thermosulphurogenes</i>	pH _{opt} : 5.0 T _{opt} : 75°C
<i>β-amylase</i>	<i>Thermoanaerobacterium Thermosulphurogenes</i>	pH _{opt} : 5.0 T _{opt} : 75 °C
<i>Pullulanase</i>	<i>Fervidobacterium pennavorans</i>	pH _{opt} : 5.5-6.0 T _{opt} : 80-85°C
<i>Glucoamylase</i>	<i>Thermoanaerobacterium</i>	pH _{opt} : 6.0 T _{opt} : 50-60°C
		pH _{opt} : 4.0-5.5

Le secteur des détergents demeure un grand utilisateur d'enzymes. Actuellement, 90% des poudres de lessive en Europe contiennent des enzymes, notamment les amylases alcalines qui présentent une stabilité et une compatibilité avec les conditions difficiles lors des processus de lavage (Shaw *et al.*, 1995 ; Bejar., 2006). L'ajout de petites quantités d'amylase bactérienne dans le corps d'un évaporateur à multiples effets, à une température égale ou supérieure à 80°C, permet d'éliminer les contaminants amylicés, préservant ainsi la concentration des sirops de canne à sucre et favorisant le processus de cristallisation (Sicard., 1982).

En 1995, Shaw a introduit une nouvelle méthode enzymatique autorisant l'utilisation simultanée d'amylases et d'enzymes débranchantes telles que l'isoamylase et la pullulanase. Cette approche était destinée à la production de sirops de maltose et de farine de riz (Shaw *et al.*, 1995).

II.1.2. Les ADN polymérases :

Les technologies de l'ADN recombinant reposent sur l'utilisation d'une variété d'enzymes, telles que les enzymes de restriction qui coupent l'ADN en des sites précis, les ADN polymérases et les ADN ligases. Les ADN Polymérases thermostables jouent un rôle crucial dans les techniques d'ingénierie du vivant en permettant d'amplifier un gène spécifique à des millions de copies grâce à la réaction de PCR. Cette réaction, connue sous le nom de réaction en chaîne par polymérase (PCR), implique plusieurs cycles de température, comprenant la dénaturation des brins d'ADN à 94°C, l'hybridation des amorces à une température variant entre 40 et 60°C selon leur composition, et l'élongation des amorces ainsi que la synthèse du brin complémentaire à 72°C (Querellou et Guzenec., 2010).

Les microorganismes thermophiles et hyperthermophiles sont des sources d'ADN polymérases résistantes à la chaleur, utilisées dans des applications telles que la PCR (réaction de polymérisation en chaîne) et le séquençage cyclique. Par exemple, la Taq polymérase, originaire de *Thermus aquaticus* et isolée dans le parc national de Yellowstone aux États-Unis, est célèbre pour sa stabilité à des températures élevées, ce qui la rend idéale pour la PCR classique. De même, l'ADN polymérase Tth de *Thermus thermophilus* est particulièrement utilisée dans la RT-PCR (transcription inverse) en raison de ses caractéristiques distinctes en matière de transcription inverse (Ishino et Ishino., 2013).

II.1.3. Les enzymes lipolytiques :

Les lipases sont des enzymes largement utilisées en industrie en raison de leur capacité à hydrolyser les triglycérides et à catalyser des réactions d'estérification dans des milieux non aqueux. Leur utilisation s'étend à divers secteurs tels que l'alimentation, les détergents, les produits pharmaceutiques, le cuir, le textile, les cosmétiques et le papier. En industrie alimentaire, elles sont employées pour le traitement des graisses et des huiles, tandis que dans les formulations détergentes, elles

aident à éliminer les taches de lipides, d'aliments gras et de sébum des tissus (Rigoldi *et al.*, 2018).

Les différentes lipases issues de divers microorganismes présentent des spécificités positionnelles, des spécificités d'acides gras, des stabilités thermiques et des valeurs de pH optimales variables. La plupart des lipases disponibles sont dérivées de mésophiles et agissent dans une large gamme de pH, mais elles sont instables à des températures élevées (généralement supérieures à 70 °C). Un grand nombre de lipases thermostables ont été isolées à partir de thermophiles. Certaines lipases thermostables ont été extraites de thermophiles modérés, notamment des membres du genre *Bacillus* (comme *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus stearothermophilus*) (Sharma *et al.*, 2013).

Parmi les enzymes lipasiques thermostables, on peut citer la lipase Lip501 dérivée de la souche thermophile *Bacillus thermoamylovorans* NB501, qui a montré une activité optimale à 60°C et à un pH de 8. L'ajout de calcium a amélioré la stabilité thermique de cette enzyme. Elle s'est avérée efficace dans l'industrie, notamment dans la modification des huiles comestibles, en particulier en dégradant l'huile de soja. Une autre lipase extracellulaire produite par la bactérie thermo-alcalophile *Geobacillus thermoleovorans* a également montré une grande thermostabilité à 76°C. Ces enzymes sont donc considérées comme de bons candidats pour diverses applications biotechnologiques (Yamada *et al.*, 2017 ; Moharana *et al.*, 2019).

II.1.4. Les enzymes protéolytiques :

Les enzymes protéases dérivées de micro-organismes thermophiles suscitent un intérêt croissant en raison de leur utilité dans divers secteurs industriels, notamment l'agroalimentaire, le textile, le biomédical, le pharmaceutique, les détergents et la gestion des déchets dans l'industrie du cuir. Parmi les bactéries, *Bacillus sp.* est largement reconnue comme une source importante de protéases thermostables (Sinha et Khare., 2013). Dans le domaine des détergents, la sérine protéase KP-43 issue de *Bacillus Halmapalus* KSM-KP43 montre une activité optimale à des pH compris entre 6 et 12 et des températures allant de 45 à 65°C (Quérellou et Guézennec ., 2010). Les

protéases thermostables, qui résistent aux agents tensio-actifs anioniques ou non ioniques et restent actives à des températures dépassant 60°C, sont utilisées dans la fabrication de détergents pour lave-vaisselle (Banerjee *et al.*, 1999 ; Niehaus *et al.*, 1999).

En raison de leur adaptabilité aux conditions opérationnelles, les protéases thermoactives sont employées dans diverses techniques de biologie moléculaire, telles que la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et le séquençage de l'ADN (Vieille et Zeikus., 2001).

Parmi les types de protéases, on trouve l'aminopeptidase qui cible les résidus d'acides aminés au niveau N-terminal des protéines. Ces enzymes ont de nombreuses applications dans divers domaines, notamment l'industrie pharmaceutique où elles sont cruciales pour l'analyse des séquences protéiques, ainsi que dans l'industrie alimentaire où elles contribuent à améliorer la saveur. Lorsqu'elles sont combinées avec d'autres protéases, elles facilitent la dégradation complète de diverses protéines telles que la caséine, le gluten, le collagène et la gélatine, ce qui favorise l'assimilation des nutriments (Rigoldi *et al.*, 2018).

La sérine alcaline protéase thermostable extracellulaire, connue sous le nom de SAPCG, est produite en grandes quantités par la bactérie thermophile *Caldicoprobacter guelmensis* D2C22T, isolée de la source thermale de Guelma en Algérie. Après purification, l'enzyme a démontré une activité protéase optimale à 70°C et à un pH de 10, utilisant la caséine comme substrat. L'ajout de calcium a amélioré à la fois la thermoactivité et la thermostabilité du SAPCG, augmentant ses temps de demi-vie à 80°C et 90°C respectivement à 180 minutes et 60 minutes. Des tests de performance de lavage ont révélé sa capacité à éliminer efficacement les taches de sang, présentant ainsi un potentiel prometteur pour être utilisée comme additif dans les formulations de détergents (Bouacem *et al.*, 2015).

(Bouacem *et al.*, 2016) ont étudié une enzyme appelée kératinase thermostable extracellulaire (KERCA) produite par la souche TH7C1T de *Caldicoprobacter algeriensis*, isolée d'une source chaude hydrothermale en Algérie. Ils ont observé une activité optimale à 50°C et à pH 7. Les caractéristiques de l'enzyme KERCA en font une alternative écologique et prometteuse aux produits chimiques traditionnels utilisés dans l'industrie du cuir pour l'épilation des peaux de chèvre, de mouton et de bovin. Nouvelle protéase extracellulaire sérine alcaline, appelée SAPN, a été isolée et caractérisée à partir de *Melghiribacillus thermohalophilus* Nari2AT. Cette protéase, la subtilisine, a montré une activité optimale à 75°C, avec une demi vie de 9 heures à 80°C et de 5 heures à 90°C. Elle est utilisée dans la production d'hydrolysats bioactifs déprotéinisés (Mechri *et al.*, 2019).

De plus, la souche *Anoxybacillus kamchatkensis* M1V a été identifiée comme efficace dans la production d'enzymes protéolytiques utilisées pour le processus de déprotéinisation (Mechri *et al.*, 2020).

II.1.5. Les enzymes cellulolytiques :

La Cellulose représente une source renouvelable hautement prometteuse pour la conversion biologique en produits biovalorisés. Les cellulases produites par les bactéries cellulolytiques sont capables de la dégrader (Rigoldi *et al.*, 2018).

Les cellulases sont parmi les enzymes industrielles les plus cruciales à ce jour, car elles transforment la cellulose en sucres adaptés à la consommation humaine. Ces sucres peuvent ensuite être fermentés pour produire du bioéthanol et des produits biosourcés (Shabih *et al.*, 2018). En outre, les cellulases sont utilisées dans l'industrie textile pour le traitement des tissus et dans l'industrie des détergents à lessive (Rigoldi *et al.*, 2018).

Effectivement, une bactérie thermophile qui produit une cellulase thermostable a été découverte dans une région de sources chaudes et identifiée sous le nom de *Geobacillus* sp. L'enzyme a été purifiée et a montré une activité maximale à 60°C et un pH de 7. De

plus, elle reste stable sur une plage de températures allant de 50°C à 70°C après 5 heures d'incubation (Potprommanee *et al.*, 2017).

Une nouvelle enzyme cellulase thermostable et halotolérante, nommée CelDZ1, a été isolée et étudiée à partir de *Thermoanaerobacterium sp.* Elle a montré une activité optimale à 70°C et un pH de 5, démontrant également une bonne résistance à la chaleur (Zarafeta *et al.*, 2016). De plus, une autre enzyme cellulase halotolérante, appelée Bc22Cel, a été découverte et caractérisée à partir de la souche *Bacillus Sp.* SR22. La Bc22Cel a démontré une activité maximale à 60°C et à un pH de 6,5 (Dos Santos *et al.*, 2018).

II.1.6. Les enzymes xylanolytiques :

Sont cruciales pour la dégradation de la xylane, qui est l'un des polysaccharides les plus abondants après la cellulose (Meheshwari *et al.*, 2000). Cette dégradation dépend des enzymes appelées « xylanases », les quelles sont classées en deux familles distinctes : la famille 10 groupes et la famille 11 groupes. Les xylanases, stables et actives à des températures entre 50°C et 80°C, sont isolées à partir de nombreuses bactéries et mycètes thermophiles (Tableau N°5) (Haki et Rakshit., 2003).

Tableau 5 : Certains microorganismes thermophiles producteurs de xylanases thermostables (Bouamoucha *et al.*, 2008).

Microorganisme	Propriété
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	T _{opt} : 80°C
	pH _{opt} : 6.8-7.0
<i>Bacillus Sp. I 101 7</i>	T _{opt} : 55°C
	pH _{opt} : 7.8
<i>Chaetomium thermophile</i>	T _{opt} : 70°C
	pH _{opt} : 4.0-6.0
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	T _{opt} : 60°C
	pH _{opt} : 6.0

Actuellement, il existe une demande croissante pour les xylanases thermostables dans divers processus biotechnologiques. Dans l'industrie papetière, notamment, ces enzymes sont recherchées pour remplacer les composés chlorés et offrir des processus de fabrication plus respectueux de l'environnement. Les xylanases thermostables doivent présenter des propriétés spécifiques pour être efficaces dans les conditions industrielles réelles, notamment une bonne stabilité à différentes valeurs de pH et de température, avec une plage d'activité optimale typiquement entre pH 5 et 10 et une température de 50 à 80 °C (De Buyl *et al.*, 2004).

Leurs utilisation permet de dégrader le xylane présent dans les pulpes chimiques, améliorant ainsi l'esthétique et la qualité des produits finaux (CAR/PP., 2003).

Les xylanases trouvent également leur utilité dans la préparation de xylose et de Xylooligosaccharides à partir de la hémicellulose. Elles sont aussi employées dans l'industrie alimentaire pour améliorer la panification, la clarification des jus de fruits et de vin, ainsi que les qualités nutritionnelles des fibres céréaliers. Dans l'alimentation animale, notamment celle des volailles, les xylanases permettent de réduire la viscosité des aliments, améliorant ainsi leur digestibilité. Jusqu'à présent, la faisabilité technique de ces applications a principalement été évaluée en utilisant des enzymes produites par des microorganismes mésophiles. Cependant, l'utilisation des microorganismes présentant une meilleure stabilité à la température pourrait faciliter ces utilisations (Samain *et al.*, 1997).

II.1.7. Les enzymes chitinolytiques :

La chitine est une substance insoluble formée par la polymérisation des résidus de N-acétylglucosamine (NAG) liés par des liaisons β (1-4) (Tanaka *et al.*, 2001). Dans la nature, elle constitue principalement l'exosquelette des arthropodes (crustacés, insectes) ainsi que la paroi cellulaire de certains champignons et algues (Gomes *et al.*, 2001).

Les chitooligosaccharides peuvent être préparés par hydrolyse enzymatique, impliquant des chitinases (Sakai *et al.*, 1994). Ces enzymes sont classées en trois

Chapitre 2 : les enzymes industrielles

catégories selon leur mode de clivage des chaînes polysaccharidiques : *Endochitinases*, *exochitinases* et *N-acétyl β hexosaminidases* (Tanaka *et al.*, 2001).

Tableau 6 : Chitinases thermostables : origines et propriétés (Bouamoucha *et al.*, 2008).

Microorganismes	Propriétés
<i>Bacillus sp. MHI (Endochitinase)</i>	T _{opt} : 65°C pH _{opt} : 5.5
<i>Bacillus sp. 1326</i>	T _{opt} : 60°C pH _{opt} : 7.0-8.0
<i>Bacillus sp. (Endochitinase)</i>	T _{opt} : 75°C pH _{opt} : 5.5
<i>Streptomyces sp. RC 1 Q71 (Endochitinase)</i>	T _{opt} : 40°C pH _{opt} : 8.0

Les chitooligosaccharides, produits par l'hydrolyse enzymatique de la chitine et de la chitosane, trouvent des applications diverses dans les secteurs médical, agricole et industriel. En médecine, les chitooligosaccharides sont reconnus pour leurs diverses propriétés bénéfiques. Ils agissent comme agents antibactériens et antifongiques, tout en contribuant à la réduction du cholestérol et à la régulation de la pression artérielle (Eyuli *et al.*, 2004). De plus, certains chitooligosaccharides ont démontré leur capacité à stimuler la phagocytose et à inhiber la croissance de certaines tumeurs (Vielle et Zeikus., 2001).

En alimentation, les chitooligosaccharides sont reconnus comme des améliorants de la qualité nutritionnelle (Eyuli *et al.*, 2004). Dans le domaine agricole, les chitinases thermostables sont utilisées pour le biocontrôle des champignons phytopathogènes (Gomes *et al.*, 2001).

Chapitre 2 : les enzymes industrielles

De plus, la dégradation biologique des matériaux chitineux à haute température, facilitée par les chitinases thermostables, permet le recyclage des nutriments dans divers environnements (Sakai *et al.*, 1998 ; Tanaka *et al.*, 2001).

II.1.8. Autres enzymes thermostables :

Il existe d'autres enzymes thermostables qui sont d'un grand intérêt en biotechnologie. En resumé du un (tableau N°7).

Tableau 7 : Autres enzymes des thermophiles et leurs applications (Bouamoucha *et al.*, 2008).

Enzyme	Application
L-aminocyclase	-Production des acides amines -Bioconversion des intermédiaires pharmaceutiques
Alcool deshydrogenase	-Biodégradation des composés halogéniques toxiques
Phosphatase alcaline	-La détection non isotopique
Pectinase	-Production de vin -Extraction des jus de fruits



Chapitre 3 :
Materiels et Méthodes

I.Objectifs du travail :

Notre objectif est d'isoler des bactéries thermophiles à capacité de produire des enzymes hydrolytiques thermostables à partir de la source thermal de Hammam Bouhnifia.

II.Lieu de travail :

Ce travail a été réalisé au laboratoire pédagogique de microbiologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Djilali Bounaama, dans une période de 3 mois allant de février à Avril 2024.

III. Présentation du site de prélèvement :

Le prélèvement des échantillon d'eaux Thermale a été réalisé à partir de la source thermale De Hammam Bouhnifia, Mascara , Algérie. Cette source est située à 100km au Sud d'Oran et 25km de la ville de Mascara, à 230 m D'altitude, source très appréciée et très fréquentée .

IV. Echantillonnage :

Les échantillons d'eaux ont été prélevés durant le mois février 2024 dans des flacons de verre stériles de 250 ml. Sur le site de prélèvement, à l'aide d'un thermomètre et d'un papier pH on a pu mesuré une température de l'eau de 54°C et un pH compris entre 07-08. La partie expérimentale a été effectuée au niveau du Laboratoire de microbiologie à université Djilali Bounaama.

V.Isolement :

Dans un tube à essai, 1ml d'échantillon d'eau de source a été aditionée à 9 ml du milieu bouillon nutritif (BN), pour qu'il soit incubé par la suite dans une température de 54 °C jusqu'à l'apparition de trouble.

VI.Sélection sur milieu de culture solide d'amidon et CMC (carboxyméthylcellulose):

Après 24 heures d'incubation dans le milieu BN. Deux milieux sélectifs ont été utilisés. Le premier milieu à base de cellulose et le second milieu à base d'amidon. Dans chacun de ces deux milieux, 1 ml de la suspension bactérienne, a été ensemencé. Ensuite les boîtes ont été incubées à une température de 54°C pendant de 72 h .

VII.Identification des souches purifiées :

L'identification d'isolat est basée sur leurs caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques.

VII.1.Caractérisation d' isolat bactériens après sélection :

VII.1.1.Observation macroscopique :

Un fois l'isolat purifié même milieu, l'observation de l'aspect macroscopique des colonies (forme, taille, pigmentation, opacité, etc.), permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification.

VII.1.2. Observation microscopique :

L'identification microscopique repose sur les critères suivants :

- Coloration de Gram
- La forme des cellules bactériennes,
- L'arrangement cellulaire

VIII.Production des enzymes sur milieu liquide :

Afin de produire la cellulase, l'isolat ont été cultivés sur milieu contenant 9 ml solution CMC et 1 ml de bouillon nutritive. L'incubation a été faite pendant 72 h à 54 °C. Pour la production de l'amylase la même procédure a été répétée en ajoutant de l'amidon à la place du CMC.

L'extraction des enzymes nécessite une centrifugation à 2500 tr/min pendant 5 min. afin de récupérer le surnageant qui comporte les enzymes en l'occurrence.

IX. Teste de l'activité enzymatique chez l'isolats (Amylase et Cellulase) :

IX.1. Par la méthode des spots :

L'isolat pure ont été repiqué sur deux milieux solides. L'un à base de CMC et l'autre à base d'amidon. L'incubation a été faite pendant 24 h à 54°C.

IX.2. Par la méthode des disque :

les disques sterile faite de papier absorbant (watmen) sont d'un diametre de 6 mm, ont été imbibé dans les solutions enzymatiques, avant qu'ils soient déposé à l'aide d'une pince sterile sur le milieu à base d'amidon et le milieu le second milieu à base de CMC.

IX.1.3. Par la méthode des puits :

Un 1 ml du surnageant de chaque enzyme extraite a été ajouté dans chacun des puits avant incubation. Enfin, les diamètres des zones de lyse ont été mesurés à l'aide d'une règle.

➤ Révélation :

Après incubation, une solution de lugol a été versé sur les boites, après 10 min la solution de lugol a été éliminé afin de voir les zones de lyses.

IX.1.4. Hydrolyse de l'amidon :

La solution d'amidon préparée contient 1,7 g d'amidon diluée dans 100 ml d'eau distillée stérile (SHINKE, 1974). Deux tubes à essai (A, B) ont été utilisés pour le teste de l'hydrolyse d'amidon et un troisieme tube à essai (C) a été utilisé comme témoin. Dans les trois tubes nous avons ensuite ajouté 6 ml de la solution d'amidon à laquelle nous avons ajouté 2 ml d'amylase dans le tube (A), et 2 ml d'acide chlorhydrique à 23% dans le tube (B), et on laisse le tout pendant 15 minutes. Ensuite, nous ajoutons quelques gouttes de Lugol à chaque tube comme un revelateur.

IX.1.5. Dégradation de la cellulose :

Pour réaliser la dégradation de la cellulose, trois tubes à essai steriles (C1, C2,C3) ont été utilisés . Le premier tube (C1) contient 1 g de coton avec 1 ml de culture bactérienne et 8 ml de BN. Le deuxième tube (C2) contient 1 g de coton avec 1 ml de culture bactérienne et 8 ml d'eau thermal. Le troisieme tube témoin (C3), contient 1 g de coton avec 9 ml d'eau de source stérilisée, puis le tout a été mis dans l'étuve.



Chapitre 4 :
RESULTATS et DISCUSSION

Cette présente étude vise à isoler des isolats productrices d'amylase et de cellulase à partir d'une source thermale (Hammam Bouhdja). Isolé à partir de milieux de sélection de culture à base d'amidon agar et CMC agar (Aneja., 2003).

I. Isolement et sélection d'isolat :

Apparition d'un trouble après incubation des tubes contenant du BN inoculé par les échantillons d'eau thermale pendant 24 heures à 54°C.

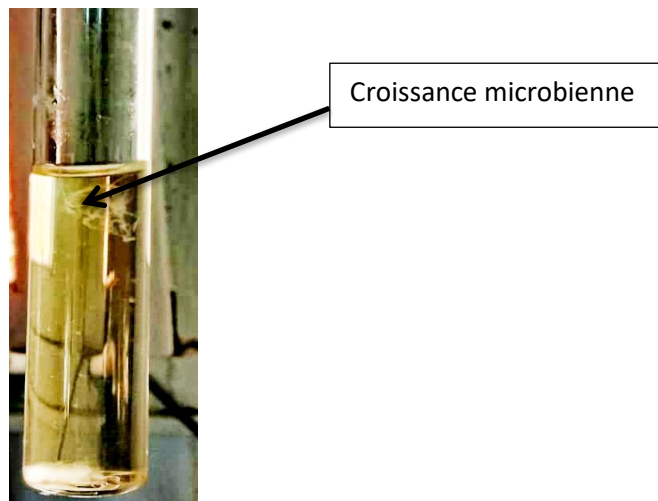


Figure N°1 : Croissance microbienne après 24h d'incubation.

Après incubation sur les milieux CMC et Amidon, on a observé la présence de plusieurs colonies du même type et après purification de ces derniers on a trouvé le même aspect macroscopique et microscopique dans les 02 milieux de culture (tableau 8) .

III. Identification phénotypique :

1. Les caractères macroscopique et microscopique

Selon Emanuel *et al.*, 2009 l'étude phénotypique de bactérie se fait essentiellement de deux critères l'aspect macroscopique des colonies (figure 03) et l'aspect microscopique (figure 02)

Chapitre 4 : Résultats et Discussion

Tableau N°8 : Les résultats des observations microscopique et macroscopique.

Isolat	Observation macroscopique	Observation microscopique
AC	élevés, circulaire et de bord régulier de couleur blanche.	Forme :Bacille Gram :Positif.

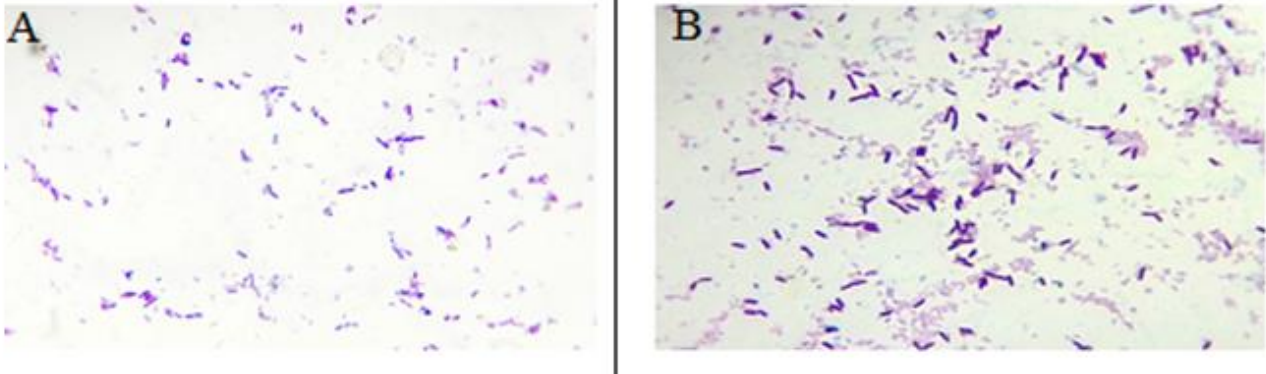


Figure N°2 : Observation microscopique d'isolats sélectionnés . A :isolat sur milieu amidon ,B :isolat sur milieu cellulosé .

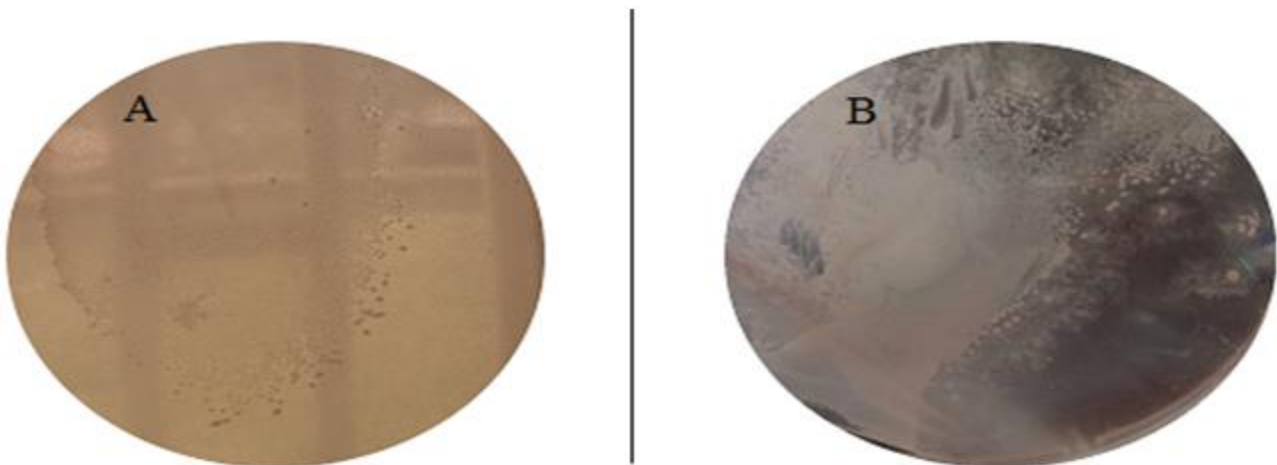


Figure N°3 : Observation macroscopique des isolats sélectionnés . A : milieu de culture amidon ,B : milieu de culture cellulosé.

Tous les microflores permes associées à leur hammam bouhnia, nous avons uniquement isolé un seul genre bactérien capable de dégrader l'amidon et la cellulose à la fois dans des températures qui dépassent 50°C.

Selon les travaux précédemment réalisés par Tifrt Abdelkarim 2016 sur l'eau thermale Hammam Bouhrara la majorité des espèces bactériennes à partir du genre *Bacillus* sp.

IV. Activité enzymatique :

IV.1. Activité amylolytique et cellulolytique :

IV.1.1. Par la méthode des spots :

La révélation de l'activité amylolytique et cellulolytique chez les bactéries productrices d'amylase et de cellulase dans le milieu de culture amidon agar et CMC agar se traduit par la formation d'une zone de lyse de couleur orange autour d'un isolat ensemencé plusieurs fois par des spots quantifiés par mesure des diamètres (Tableau 7).

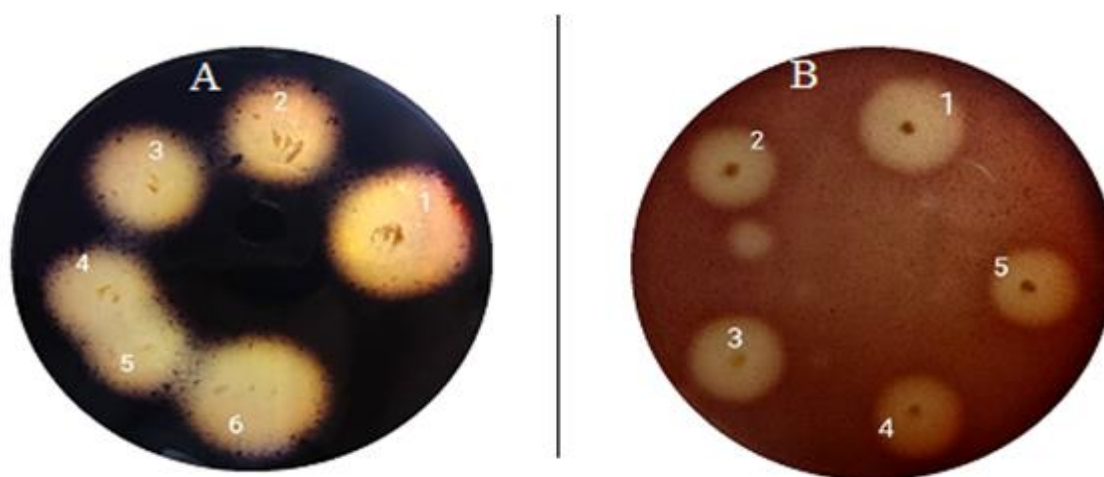


Figure N°4 : Activité enzymatique de isolat (AC) par la méthode des spots. A : Activité amylolytique , B : Activite cellulolytique.

Le tableau ci-dessous présente le diamètre des zones de lyse de l'isolat sur milieu amidon agar et CMC agar.

Tableau N°9 : Diamètre des zones de lyses d' isolat obtenus sur les deaux milieau(amidon et cellulose) par la méthode des spots .

Le milieu de culture	Nombre de repitition	Le diametre des zones de lyse (mm)	Moyenne de zone de lyse (mm)
Amidon	1	23	18,5
	2	17	
	3	17	
	4	16	
	5	16	

	6	22	
cellulose	1	15	13,6
	2	13	
	3	14	
	4	13	
	5	13	

L'isolement a révélé une activité enzymatique distincte dans les milieux amidon et cellulose à 54 °C, ce qui s'est traduit par la formation d'une zone de dégradation claire autour des colonies bactériennes, avec un diamètre variant selon l'intensité de l'activité enzymatique. La plus grande zone de dégradation a été observée dans le milieu amidon avec un diamètre de 18,5 mm, tandis qu'elle était de 13,6 mm dans le milieu cellulose (voir figure 4 et tableau 9).

Les *Bacillus sp* thermophiles sont largement reconnus pour leur capacité exceptionnelle à produire une gamme variée d'enzymes hydrolytiques telles que les cellulases et l'amylase à des températures élevées. Leur utilisation en biotechnologie est primordiale en raison de leur efficacité à dégrader divers polysaccharides comme le glycogène, provenant aussi bien de cellules animales que microbiennes. Ces microorganismes thermophiles sont une source privilégiée d'enzymes thermostables telles que les protéases, les lipases, les amylases et les estérases, les rendant indispensables dans de nombreuses applications biotechnologiques (Bertoldo et Antranikian., 2001 ; Salameh et Wiegel., 2007; Turner., 2007 ; Lagzian *et al.*, 2012 ; Stathopoulou *et al.*, 2013).

IV.1.2..Par la méthode des disques et des puits :

Les solutions enzymatiques en amylase et cellulase sont obtenues après centrifugation, chaque enzyme a été testée pour l'activité enzymatique en révélant les résultats suivants (figure 5 et 6), (Tableau 10 et 11).

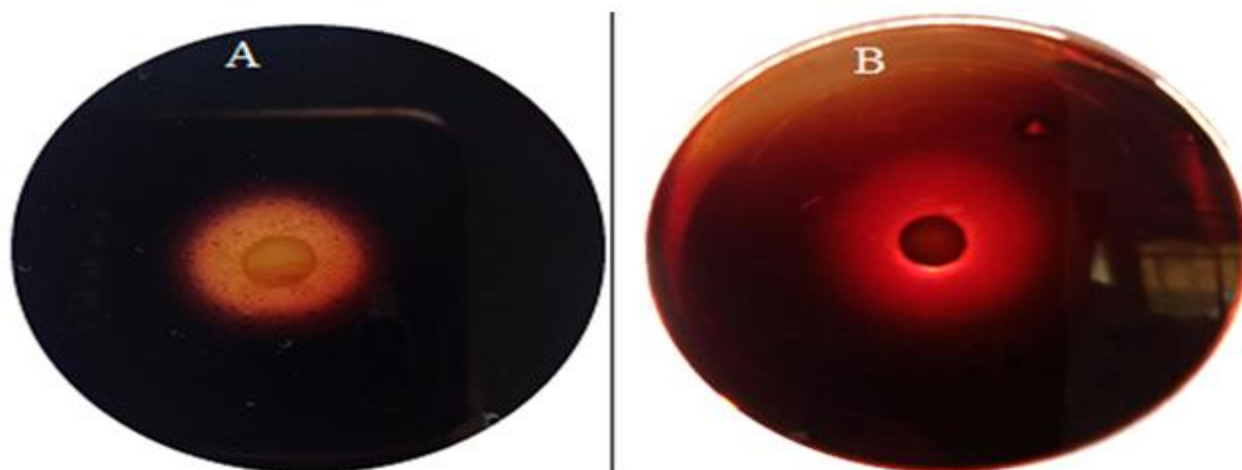


Figure N°5 : Activité enzymatique de isolat (AC) par la méthode des disques .
A :Activie amilolytique , B :Activite cellulolytique .

Tableau N°10 : Diamètre des zones de lyses d'isolat obtenus par la méthode des disque.

Les milieux des cultures	Diametre des zones de lyses de l'isolat (mm)
Amidon	16
Cellulose	25

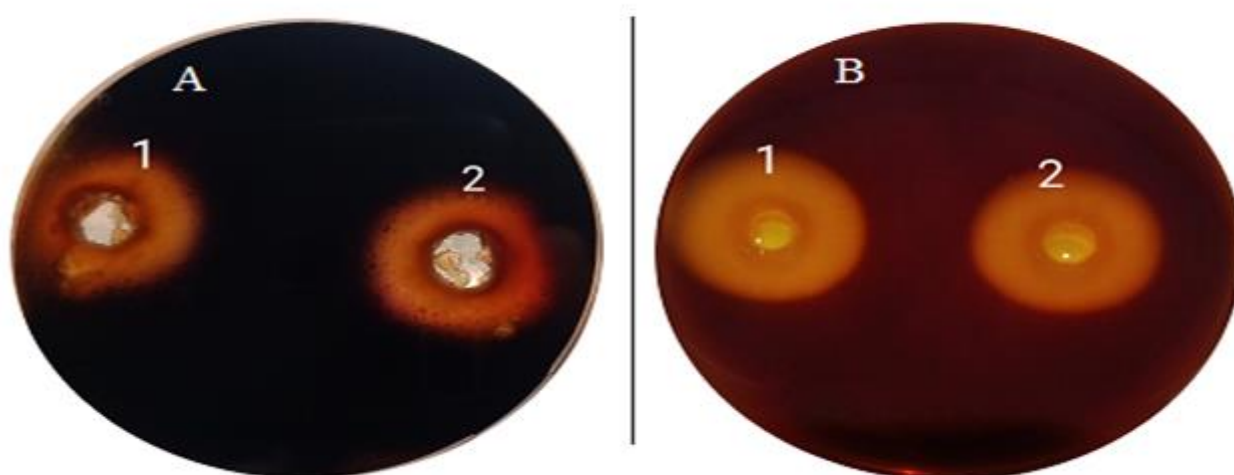


Figure N°6 : Activité anzymatique de isolat (AC) par la méthode des puits .
A : Activite amilolytique , B :Activite cellulolytique

Tableau N°11 : Diamètre des zones de lyses d'isolat obtenus par la méthode des puits.

Les milieux des cultures	Le nombre de repetition	Diametre des zones de lyses de l'isolat	Moyenne de la zone de lyse(mm)
Amidon	1	15	15
	2	15	
Cellulose	1	18	17
	2	16	

L'isolat obtenu par centrifugation a été testée pour évaluer leur activité enzymatique à l'aide de la technique du disque et de la technique des puits. Le test a montré une activité enzymatique pour l'isolement en utilisant la technique de disque et technique de puit sur deux supports CMC agar et amidon agar, montrant une activité élevée et différente pour les enzymes amylase et cellulase sur les supports amidon agar et cellulose agar, en prenant en compte le diamètre de la zone de dégradation qui apparaît autour du disque saturé d'extrait enzymatique.

De nombreuses études démontrent que les micro-organismes thermophiles sont les meilleures sources d'enzymes thermostables (Salameh et Wiegel., 2007 ; Turner., 2007 ; Stathopoulou *et al.*, 2013). La stabilité thermique de ces enzymes est considérée comme le critère de sélection dans les domaines industriel.

La dégradation de la cellulose joue un rôle majeur dans le cycle du carbone (Lee *et al.*, 2007), où elle est principalement convertie par des micro-organismes en dioxyde de carbone dans des conditions aérobies et en méthane dans des conditions anaérobies (Eriksson., 1985).

Les espèces de *Bacillus sp* jouent un rôle important dans la biodégradation et la bioconversion des composés de poids moléculaire élevé, et *Bacillus sp* est fréquemment signalé parmi les espèces cellulolytiques amilolytiques (Lu *et al.*, 2005).

Des travaux antérieurs de (Ashis *et al.*, 2009) ont caractérisé l'amylase, une enzyme thermostable produite par des bactéries du genre *Bacillus* et très adaptée à l'industrie des détergents. En outre, (Hashemi *et al.*, 2010 et Chaari *et al.*, 2013) ont criblé quelques souches de *Bacillus sp*, capables de produire une amylase résistante à la

chaleur, adaptée à une utilisation dans les processus d'hydrolyse de l'amidon lors de la production de sirop à haute teneur en glucose.

IV.1.3. Hydrolyse de l'amidon :

Tous les tubes (A,B) ont montré des changements de couleur de la solution d'amidon après l'ajout de l'amylase dans le tube A et l'ajout de HCL dans le tube B, à l'exception du témoin (C), n'a montré aucun changement de couleur, tel que c'est montré dans la (figure 7). L'absence de changement de couleur dans le témoin C indique qu'aucune réaction ne s'est produite en absence d'enzyme amylase.

Les changements de couleur de la solution d'amidon dans le tube A indique la dégradation de l'amidon en présence de l'enzyme d'amylase et pour le tube B ya eu une dégradation de l'amidon en présence du l'acide HCL (figure 7).

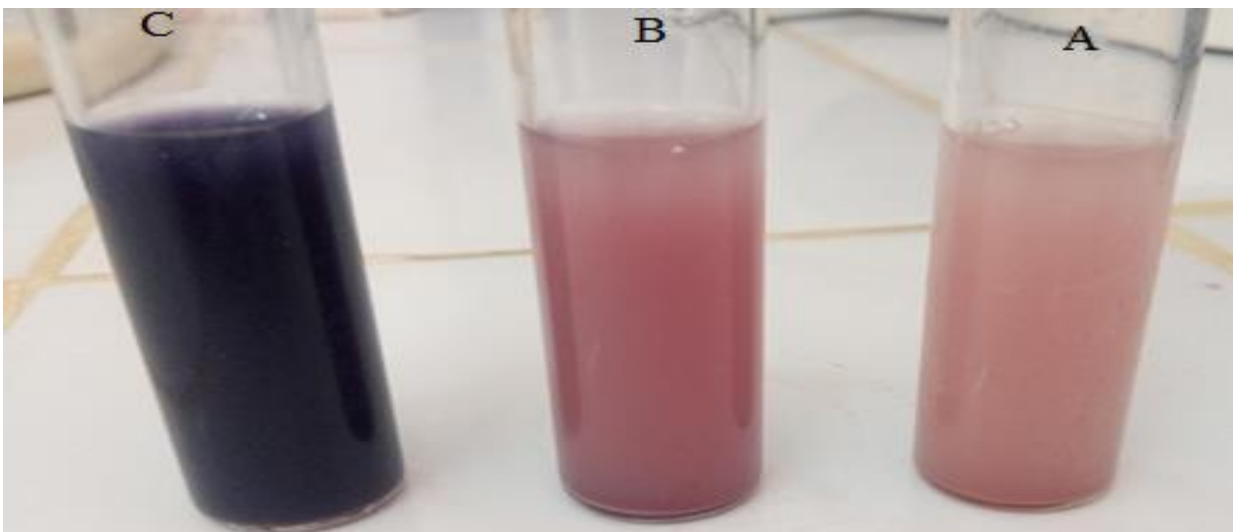


Figure N°7 :Hydrolyse de l'Amidon .

Tube A : Solution amidon + Enzyme Amylase.

Tube B : Solution amidon + HCL(Acide Chlorhydrique).

Tube C : Témoin

La figure 7 montre un virage de couleur qui se produit lors d'utilisation du lugol comme moyen de révélation. Ce virage est associé à l'activité hydrolytique. Le témoin se présente en couleur bleu, révélatrice de la présence de l'amidon, ce qui est compréhensible puisque il n'y a pas eu d'activité hydrolytique. Tandis que, la couleur rouge brique apparaisse uniquement lors de la dégradation de l'amidon en molécule de glucose et de dextrose. C'est ce qu'on obtenu dans les deux tubes A et B.

IV.1.4. Dégradation de Cellulose :

Après incubation, nous avons observé à l'aide du microscope (grossissement :10x100) dans les échantillons C1 et C2, (figure 8) qu'il ya eu la présence de la bacterie qui a dégrader de la paroi cellulaire de la cellulose. En revanche, dans l'échantillon de contrôle C3, aucune bactérie n'a été observée. Ces résultats mettent en lumière le fort potentiel des bactéries dans la dégradation de la cellulose, un polymère biologique abondant mais difficile à décomposer naturellement. Cette dégradation pourrait être bénéfique dans divers domaines tels que la production de biocarburants et le traitement des déchets (Benzar *et al.*, 2014).

Ce résultat confirme les résultats précédants associés à l'hydrolyse de la cellulose par notre isolat.

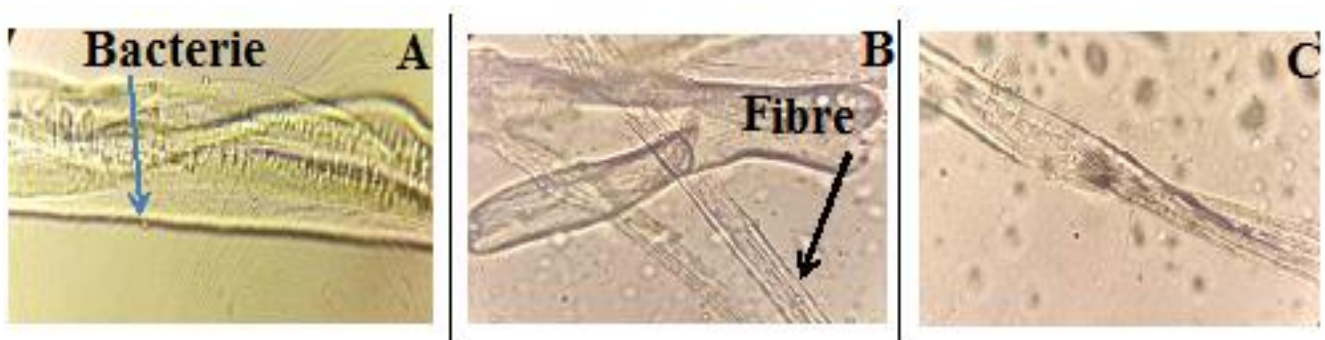


Figure N°8 : Observation au Microscopique de l'hydrolyse de cellulose.

- A :** Solution bactérienne + BN.
- B :** Solution bactérienne + eau thermal.
- C :** Témoin.



CONCLUSION

Les micro-organismes, en particulier ceux qui habitent des environnements extrêmes, constituent un trésor précieux de voies métaboliques et de molécules biologiques uniques. Grâce à leur capacité d'adaptation et de survie dans des conditions rigoureuses, ces microorganismes nous offrent une perspective fascinante sur les possibilités et la diversité de la vie.

L'étude de ces micro-organismes extrêmophiles a révolutionné notre compréhension de la biologie, menant à la découverte d'une incroyable diversité dans des environnements autrefois considérés comme inhabitables. Ces environnements incluent les sources chaudes et les événements hydrothermaux. Ce qui distingue particulièrement ces organismes est leur capacité à développer des enzymes aux propriétés uniques, leur permettant de fonctionner dans des conditions extrêmement difficiles. Ces enzymes possèdent des caractéristiques exceptionnelles telles qu'une grande stabilité thermique, et une activité à des températures très élevées.

Les propriétés uniques de ces enzymes extrêmophiles ont suscité un grand intérêt chez les scientifiques en biotechnologie, offrant un potentiel immense pour le développement de nouvelles applications industrielles.

A l'issue de notre étude, nous avons isolé une bactérie thermophile du genre *Bacillus sp* à partir d'échantillons prélevés de hammam Bouhanifia, ainsi que on a déterminé l'activité enzymatique hydrolytique de cet isolat qui présente une activité enzymatique élevée, puisque on a eu une zone de lyse d'un rayon de 18,5 mm de diamètre dans le substrat de l'amidon par méthode de spot, et un rayon de 13,6 mm dans le substrat de la cellulose par méthode de spot.

De ce point de vue, il semble pertinent de conclure que de futures études approfondies sont nécessaire pour élucider toutes les caractéristiques de ces enzymes hydrolytiques. Il serait également nécessaire de mener ultérieurement d'autres travaux expérimentaux afin d'identifier cet isolat par des techniques moléculaires.

Perspectifs :

- Étudier comment stimuler la production d'enzymes thermostables en améliorant les conditions de culture et la transformation génétique.
- Développer de nouvelles méthodes pour améliorer la stabilité des enzymes à des températures élevées, telles que la modification protéique et les additifs chimiques.
- Comprendre comment les températures élevées affectent la structure et la fonction des enzymes, et comment modifier ces mécanismes pour améliorer les performances des enzymes dans des conditions de température élevée.
- Explorer de nouvelles utilisations pour les enzymes thermostables dans différents secteurs tels que le textile, l'environnement et l'énergie.
- Améliorer les méthodes d'analyse et de test des enzymes thermostables pour une meilleure compréhension de leurs propriétés et de leurs utilisations potentielles.



Bibliographie

- ABDEL-FATTAH, Y. R. Optimization of thermostable lipase production from a thermophilic *Geobacillus sp.* Using Box Behnken experimental design. *Biotechnology Letters* 2015, vol. 24, p. 1217-1222.,2000.
- Aneja, K. R. Experiments in Microbiology, Plant Pathology and Biotechnology. New Delhi: New Age International. ISBN 81-224-1494-X,2008.
- BAKER-AUSTIN, C., DOPSON, M. Life in acid: pH homeostasis in acidophilic. *Trends in Microbiology*., vol. 15, p. 165-171 ,2007.
- BANERJEE, U. C., SANI, R. K., AZMI, W., SONI, R. Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. *Process Biochemistry*., vol. 35, no. 1-2, p. 213-219,1999.
- Bertoldo, C., & Antranikian, G. Amylolytic enzymes from hyperthermophiles. *Methods in Enzymology*, 330, 269-289 , 2001.
- BOUACEM, K., BOUANANE-DARENFED, A., LARIBI-HABCHI, H., BEN ELHOUL, M., HAMIDA-SAYARI, A., HACENE, H., OLLIVIER,B., FARDEAU, M.L., JAOUADI, B., & BEJAR, S. Biochemical characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from *Caldicoprobacter guelmensis*. *International Journal of Biological Macromolecules* , vol. 81, p. 299-307,2015.
- Bouamoucha, S., Boufersada, M., & Bonamis, F. *Les Microorganismes Thermophiles et leurs Applications en Biotechnologie*. Mémoire de fin des études en vue de l'obtention du diplôme des études supérieures (DES), Université de Jijel, Microbiologie,2008
- BROCK, T. D., KELLY, R.M., PEEPLES, T.L., HALO, S. B., RINKER, K. R., & DUFFAUD, G. D. In: KHALID, F., MASSADEH, M., LAATSCH, H. LC-MS/MS Profiling-based Metabolite Screening of thermophilic Bacteria from Jordanian Hot Springs. *International Conference on Applied Chemistry and Pharmaceutical Sciences* , 1994.
- CENTRE D'ACTIVITÉ RÉGIONALE POUR LA PRODUCTION PROPRE (CARI PP). Plan d'action pour la Méditerranée. Application de la biotechnologie dans l'industrie. p. 125 ,2003.
- CHÊNE, C. Les acides organiques. *Journal de Adrianor* , 2002.
- Dahmane, S., & Daoudi, S. Contribution à l'étude des bactéries extrêmophiles sporogènes isolées à partir des sols de trois régions sahariennes : Adrar, In Amenas et El Ménián. Mémoire de master académique en Biochimie appliquée, Université de Ghardaia ,2018 .

- DJINNI, I. Cours de micro-organismes des milieux extrêmes. Université Abderahmane MIRA-Bejaia, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département de Microbiologie, 2017.
- DOS SANTOS, Y. Q. DE VERAS, B. D., DE FRANCA, A. F. J., GORLACH-LIRA, K., VELASQUES, MIGLIOLO, L., & DOS SANTOSE, E. A. A new salt-tolerant thermostable cellulase from a marine *Bacillus sp.* Strain. *Journal of Microbiology and Biotechnology* ,vol. 28, no. 7, p. 1078-1085 , 2018.
- EYULI, P., SUHARTONO, M. T., RUKADI, Y.,HWRANG, J. K., & PYUM, Y. R. Characteristics of thermostable chitinase enzymes from the Indonesian *Bacillus sp.* 13.26. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 35, p. 147-153, 2004.
- GAREEB, A. P., SETATI, M. E. Assessment of alkaliphilic haloarchaeal diversity in Sua pan evaporator ponds in Botswana. *African Journal of Biotechnology* , vol. 8, p. 259-267,2009.
- GOMES, R. C., SEMEDO , L. T. S, SOARES, R. M.A., LINHARES, L. F., UIHOA, C. J., ALVIANO, C. S., & COELHO, R. R. R. Purification of a thermostable endochitinase from *Streptomyces* RC1071 isolated from a Cerrado soil and its antagonism against phytopathogenic fungi. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 90, p. 653-661,2001.
- GUÉZENNEC, J. *Bactéries marines et biotechnologies*. Editions Quae, Collection Carnets de Sciences, 2014.
- HAKI, G. D., RAKSHIT, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes. *Bioresource Technology*, vol. 89, p. 17-34 , 2003.
- HORIKOSHI, K. *Alkaliphiles: Genetic Properties and Applications of Enzymes*. Springer, Berlin, Germany, 2006.
- HORIKOSHI, K. Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 63, p. 735-750 , 1999.
- Ishino, S., & Ishino, Y. DNA Polymerases and DNA ligases. In Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology (pp. 429-457),2013.
- IRWIN, J. A., BAIRD, A. W. Extremophiles and their application to veterinary medicine. *Irish Veterinary Journal*, vol. 57, no. 6 , 2004.
- JENSEN, B., OLSEN, J. Physicochemical properties of a purified alpha amylase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 14, p. 112-116 ,1992.
- KRISTJANSSON, J. K., HREGGVIDSSON, G. O. Ecology and habitats of extremophiles. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 11, p. 17-25,1995.

- LABRIE, C., LECLERC, P., COTE, N., & ROY, S. Recherche sur les propriétés photoprotectrices de compost de résidus chitineux. Université Sherbrooke, Canada, 1998.
- LASSEUR, C. A. A., RICHAET, J. E. N., VESTRATE, W. H. Organic wastes processing method and plant, and uses of said method. Domestic Patent EP0882135, 2002.
- LEAL-DALMASO, G., FERREIRA, D., VERMELHO, A. B. Marine extremophiles: A source of hydrolases for biotechnological applications. *Marine Drugs*, vol. 13, p. 1925-1965 , 2015.
- LEE, SH, Ng, AW, & Zhang, K. "La quête pour améliorer les soins de santé chinois : certains enjeux fondamentaux", International Journal of Health Care Quality Assurance, 20(5), 416-428 , 2007.
- LI, W. F., Zhou, X. X., & Lu, P. Structural features of thermozyms. Biotechnology Advances, 23(4), 271-281,2005.
- LIN, L. L., CHYAU, C. C., HSU, W. H. Production and properties of a raw starch degrading amylase from the *thermophilic* and *alkalophilic Bacillus sp.* TS-23. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, vol. 25, p. 61-68 ,1998.
- Lu, D., Mahmood, A., Qu, C., Goussev, A., Schallert, T., & Chopp, M. Erythropoietin enhances neurogenesis and restores spatial memory in rats after traumatic brain injury. Journal of Neurotrauma, 22(9), 1011-1017 ,2005.
- MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., PARKER, J. *Brock Biology of Microorganisms*. 2003.
- Salameh, M., & Wiegel, J. Lipases from extremophiles and potential industrial application. Advances in Applied Microbiology, 61, 253-283 2007.
- Schwarz, W. H. . The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic Bacteria . Appl. Microbiol. Biotechnol., 56, 634-649 ,2001 .
- SHINKE , R., NISHIRA, H. ; MUGIBAYASHI , N. islation of b- amylase producing microorganisms. Agr. Boil. Chem., 38 (3), 665-666, 1974.
- Stathopoulou, P. M., Savvides, A. L., Karagouni, A. D., & Hatzinikolaou, D.G. Unraveling the Lipolytic Activity of Thermophilic Bacteria Isolated from a Volcanic Environment. *BioMed Research International*, Bio. Article ID 703130 , 2013.
- Vidyalakshmi, R., Paranthaman, R., & Indhumathi, J. Amylase Production on Submerged Fermentation by *Bacillus spp.* *World Journal of Chemistry*, 4(1), 89-91, 2009.



Annexes

Préparation des milieux de cultures utilisés

Bouillon Nutritif (BN) :

Peptone.....	10 g
Extrait de viande.....	5 g
Na Cl.....	5 g
Eau distillée	1L
PH.....	7,3

Autoclave à 121°C / 20 min

Milieu liquide de amidon :

Amidon.....	2g
L'eau de source.....	400ml

Milieu liquide de cellulose :

Cellulose.....	2g
L'eau de source.....	400ml

Milieu solide de amidon :

Amidon.....	2g
L'eau de source.....	400ml
Agar agar.....	4g

Milieu solide de cellulose :

Cellulose.....	2g
L'eau de source.....	400ml
Agar agar.....	4g

➤ **Coloration de Gram :**

Il a été effectué sur un frottis bactérien, préparé à partir des colonies suspectes en cultures pures, puis fixé et coloré par la méthode de gram (Denis *et al.*, 2011).

1. Coloration avec le violet de gentiane :

Le violet de gentiane est un colorant basique qui se fixe sur les composants de cytoplasme bactérien, à ce moment toutes les bactéries sont de couleur violette pendant 30s. (Denis *et al.*, 2011).

2. Mordançages au Lugol (30 secondes) :

Le lugol est un mordant qui renforce l'adhésion du violet de gentiane au niveau cytoplasme bactérien (Denis *et al.*, 2011).

3. Décoloration à l'alcool (30 secondes) :

La bactérie Gram – ont une paroi mince et riche en lipide, ce qui permet le passage de l'alcool qui va entraîner avec lui violet de gentiane et la cellule vont de venir transparentes, la paroi des bactéries Gram+ par contre est épaisse, qui empêche l'alcool de pénétrer et de ce fait de décolorer les cellules (denis *et al.*, 2011).

4. Coloration avec la fuchsine (1 minute) :

Cette étape sert à colorer la bactérie Gram négative qui se sont décolorée lors du traitement précédent, recouvrir la lame par fuchsine et laissé 1 minute avant de laver avec l'eau distillé, puis sèche entre deux feuille papier filtre, examiner à immersion (Denis *et al.*, 2011).

APPAAREILLAGE :

- Etuve (incubateur)
- Autoclave (HIRAYAMA)
- Centrifugeuse refrigerée
- Agitateur- plaque-chauffante
- Vortex
- Microscope optique
- Bec Bunsen
- Bain marie (WISEBATH)
- Becher de: 100 mL, 250 mL et 500 mL
- Flacons en verre de 250 mL
- Boîte de Petrie en plastique
- Pipette Pasteur
- Pipette graduées
- Anse de platine
- Tubes à essais stériles
- Lames et lamelles

Produit chimique :acide HCL

Réactif de la coloration de Gram :

- Solution de Lugol
- Alcool
- Solution de violet de gentiane
- Solution de fuschine

