

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Mustapha Ben Boulaid- Batna 2
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie et Biochimie
Réf :



جامعة باتنة 2
كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم الميكروبيولوجيا و البيوكيمياء
المرجع :

Thèse présentée par

Taha MENASRIA

En vue de l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

THÈME

**Biodiversité microbienne dans les milieux
extrêmes salés du Nord-Est Algérien**

Devant le jury composé de :

Président :	Dr. Kamel AISSAT	(Professeur)	Univ. de Batna 2
Directeur de thèse :	Dr. Hocine HACÈNE	(Professeur)	Univ. d'Alger (USTHB)
Co-directeur de thèse :	Dr. Abdelkrim SI BACHIR	(Professeur)	Univ. de Batna 2
Examineur :	Dr. Yacine BENHIZIA	(Professeur)	Univ. de Constantine 1
Examineur :	Dr. Mahmoud KITOUNI	(Professeur)	Univ. de Constantine 1
Examineur :	Dr. Lotfi LOUCIF	(Maître de conférences 'A')	Univ. de Batna 2
Membre invité :	Dr. Ammar AYACHI	(Professeur)	Univ. de Batna 1

Année universitaire : 2019-2020

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciements

C'est un devoir d'exprimer mes remerciements et reconnaissances à travers cette thèse à tous ceux qui par leurs aides, encouragements et leurs conseils ont facilité, de près ou de loin, à l'élaboration et à la réalisation de ce modeste travail.

Mes remerciements vont en premier ordre et particulièrement à :

Dr. Hocine HACÈNE (Professeur à l'Université d'USTHB, Alger) pour le grand honneur qu'il m'a fait en acceptant de diriger ce travail, pour ses conseils et ses encouragements durant la réalisation de cette thèse. Je tiens particulièrement à le remercier de la liberté d'action qu'il m'a donnée le long de cette aventure. J'espère avoir été digne de la confiance qu'il m'ait accordé et que ce travail est finalement à la hauteur de ses espérances.

Dr. Abdelkrim SIBACHIR (Professeur à l'Université de Batna 2) pour ces encouragements et ses précieux conseils

Ma gratitude et mes sincères remerciements vont également aux membres du jury qui ont consacré une part importante de leurs temps à la lecture et à l'évaluation de ce travail :

Dr. Kamel AISSAT (Professeur à l'université de Batna 2) pour avoir accepté aimablement de présider le jury d'évaluation de cette thèse.

Dr. Mahmoud KITOUNI (Professeur à l'Université de Constantine 1), Dr. Yacine BENHIZIA (Professeur à l'Université de Constantine 1), Dr. Lotfi LOUCIF (Maître de conférences à l'Université de Batna 2) pour m'avoir fait l'honneur d'examiner et de juger ce travail.

Je remercie vivement Dr. Ammar AYACHI (Professeur à l'université de Batna 1) pour la confiance qu'il m'a accordé en accueillant à son laboratoire, pour l'intérêt qu'il a manifesté envers ce travail, pour sa disponibilité, attention et dévouement.

Ma gratitude va aussi à Dr. Mercedes MONTEOLIVA-SANCHEZ (Professeur à l'université de Granada, Espagne) et Dr. Margarita AGUILERA (Professeur à l'Université de Granada, Espagne), pour les deux ans passés à Granada dans une ambiance de travail stimulante. Merci pour les échanges que nous avons eus tant au niveau professionnel que personnel. En deux ans, je n'ai certes enrichi mon vocabulaire espagnol que de trois mots (Hola, buenos dias et hasta luego) et ce n'est pas faute d'avoir essayé mais j'ai eu l'occasion d'étoffer mes connaissances sur plein d'autres aspects. Merci pour la liberté encadrée, pour l'écoute attentive de mes points de vue, votre patience, compréhensions et aussi pour le long travail au laboratoire des Halophiles. À MV. MEGIAS SANCHEZ (Technicienne, Université de Granada) pour son aide, son assistance et suggestion. Pour m'avoir bien accueilli lors de mon séjour à Granada et pour toutes les facilités accordées pour la finalisation de ce modeste travail.

Un grand merci s'adresse aux ; Dr H CHENCHOUNI, Dr. L BENAMMAR, Dr MN MEKAHLIA, Dr. S NEFFAR, Dr, A MIHI, Dr. M BENHADJ, Dr. A DEKAK, Dr. M BOUKOUCHA, Dr. R MEGRI, Dr. H ABDESSMED, H BOUDJNIBA, Dr. S MEHLAINE pour leur encouragements, leur précieux conseils, et disponibilité permanente,... pour toutes les facilitations et assistance. Je les remercie pour l'intérêt qu'ils portaient toujours à mes travaux de recherche et spécialement ma vie. Et qu'ils sachent que ma reconnaissance va bien au-delà de ces remerciements, et que le plaisir que j'ai eu à les rencontrer et à les connaître était réel et sincère.

Bien entendu, cette liste n'est pas exhaustive. J'ai fait tout mon possible pour n'oublier personne dans ces remerciements. À tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, directement ou indirectement, à la réalisation de ce travail, merci infiniment. Surtout un immense merci à ma famille (Mon père, ma mère, mes sœurs, et mes frères) pour m'avoir toujours soutenue, sans oublier mes nièces et mes neveux.

Taha Menasria

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	I
RÉSUMÉ	VI
ABSTRACT	VII
ملخص	VIII
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES TABLEAUX	XI
LISTE DES ABRÉVIATIONS	IXI
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1. BIODIVERSITÉ ET ÉCOLOGIE MICROBIENNE D'UN ÉCOSYSTÈME	7
1.1. DÉFINITION DE LA BIODIVERSITÉ.....	7
1.2. ÉCOLOGIE MICROBIENNE D'UN ÉCOSYSTÈME.....	7
2. BIODIVERSITÉ MICROBIENNE DES ENVIRONNEMENTS HYPERSALÉS	9
2.1. ENVIRONNEMENTS SALÉS OU SALINS	9
2.1.1. Composition ionique et concentration en sel	9
2.1.2. Types des milieux hypersalés.....	9
a. Environnements thalassohalins	9
b. Environnements athalassohalins	10
2.2. LES LACS SALÉS EN ALGÉRIE	12
2.3. HALOPHILISME ET MÉCANISME D'ADAPTATION	13
2.3.1. Accumulation de sels 'Salt-in' ou 'high salt-in'	14
2.3.2. Synthèse et accumulation de solutés compatibles 'Salt-out ou low salt-in'	16
2.4. MICROORGANISMES HALOPHILES	18
2.4.1. Procaryotes halophiles	19
a. Archées halophiles	19
b. Bactéries halophiles	22
2.4.2. Eucaryotes halophiles	24
3. APPLICATIONS BIOTECHNOLOGIQUES DES HALOPHILES	25
3.1. POLYHYDROXYALKANOATES ET EXOPOLYSACCHARIDES	25
3.2. ENZYMES HYDROLYTIQUES	26
3.2.1. Lipases et estérases	27
3.2.2. Amylases	28
3.2.3. Protéases	28
3.3. BACTÉRIORHODOPSINES	29
3.4. PIGMENTS CAROTÉNOÏDES ET ANTIOXYDANTS	29
3.5. SOLUTÉS COMPATIBLES	30
3.6. SUBSTANCES BIOACTIVES ET ANTIMICROBIENNES	30
4. MÉTHODES D'ANALYSE EN ÉCOLOGIE MICROBIENNE	32
4.1 APPROCHES MICROBIOLOGIQUES CLASSIQUES	32

4.2. MÉTHODES MOLÉCULAIRES ET ANALYSE GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS MICROBIENNES	32
4.2.1. Clonage moléculaire et séquençage	33
4.2.2. Techniques d'empreintes moléculaires (Fingerprinting).....	33
4.2.3. Recherche des gènes fonctionnels (Génomique fonctionnelle)	34
4.2.4. Approches métagénomiques	35
4.2.5. Autres approches	36

MATERIEL ET MÉTHODES

1. ZONE D'ÉTUDE	39
2. ANALYSE MÉTAGÉNOMIQUE ET ÉCOLOGIE MOLÉCULAIRE	42
2.1. ÉCHANTILLONNAGE	42
2.2. ANALYSE PÉDOLOGIQUE ET PHYSICOCHIMIQUE DES SÉDIMENTS	42
2.3. EXTRACTION DIRECTE D'ADN TOTAL	43
2.4. CONTRÔLE DE LA PURETÉ ET DÉTERMINATION DE LA CONCENTRATION DE L'ADN	44
2.5. ANALYSE MÉTAGÉNOMIQUE « ILLUMINA SEQUENCING »	45
2.6. ANALYSE STATISTIQUE ET BIOINFORMATIQUE	45
2.6.1. Caractéristiques des sols	45
2.6.2. Identification des unités taxonomiques opérationnelles (OTU).....	45
2.6.3. Analyse de la diversité	46
3. ANALYSE DE LA FLORE HALOPHILE CULTIVABLE DES CHOTTS ET SEBKHAS	48
3.1. ÉCHANTILLONNAGE ET MISE EN CULTURE	48
3.2. CONSERVATION ET NOMENCLATURE DES ISOLATS	49
3.3. CARACTÉRISATION PHÉNOTYPIQUE PRÉLIMINAIRE DES ISOLATS	49
3.4. IDENTIFICATION MOLÉCULAIRE ET ANALYSE PHYLOGÉNÉTIQUE	50
3.4.1. Extraction de l'ADN génomique	50
3.4.2. Réaction de polymérisation par PCR.....	50
3.4.3. Électrophorèse sur gel d'agarose, purification et séquençage.....	51
3.4.4. Analyse phylogénétique	52
3.5. MISE EN ÉVIDENCE D'ACTIVITÉS HYDROLYTIQUES EXTRACELLULAIRES	52
3.6. TOLÉRANCE AUX MÉTAUX LOURDS	54
3.7. MISE EN ÉVIDENCE DE L'ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE	55
3.8. ANALYSE DES DONNÉES	55
4-ANALYSE POLYPHASIQUE DES EUBACTERIES ET ARCHÉES HALOPHILES.....	56
4.1. COLLECTION DE BACTÉRIES ET ARCHÉES	56
4.2. ÉTUDE DES CARACTÈRES PHÉNOTYPIQUES	56
4.2.1. Détermination des caractères phénotypiques	56
4.3. ÉTUDE PHYLOGÉNÉTIQUE	59
4.3.1. Extraction de l'ADN total (Technique de Marmur, 1961).....	59
4.3.2. Détermination du GC%	59
4.3.3. Réaction de polymérisation par PCR.....	60
4.3.4. Analyses phylogénétiques	61

4.3.5. Hybridation ADN-ADN.....	61
---------------------------------	----

RÉSULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE 1. ANALYSE MÉTAGÉNOMIQUE DE LA DIVERSITÉ MICROBIENNE DES ÉCOSYSTÈMES HYPERSALÉS

1. CARACTÉRISATION PHYSICOCHIMIQUES DES SOLS	65
2. CORRÉLATIONS ENTRE LES DIFFÉRENTES CARACTÉRISTIQUES DES SOLS ANALYSÉS	72
3. ANALYSE MÉTAGÉNOMIQUE DE LA DIVERSITÉ MICROBIENNE.....	75
3.1. ABONDANCE RELATIVE DES TAXONS MOLÉCULAIRES	75
3.2. MESURES DE LA DIVERSITÉ MICROBIENNE.....	84
3.3. ESPÈCES EXCLUSIVES ET ESPÈCES COMMUNES.....	87
3.4. ESTIMATIONS DE LA RICHESSE MICROBIENNE	88
3.5. EXTRAPOLATION DE LA RICHESSE DES ESPÈCES MICROBIENNES.....	88
3.6. ANALYSE DES SIMILARITÉS SPATIALES DES ESPÈCES MICROBIENNES	91
3.7. INFLUENCE DES FACTEURS ÉDAPHIQUES SUR LA DISTRIBUTION BACTÉRIENNE.....	92

CHAPITRE 2. DIVERSITÉ DE LA FLORE HALOPHILE ET HALOTOLÉRANTE (EUBACTÉRIENNE/ARCHÉENNE)

1. PARAMÈTRES PHYSICOCHIMIQUES DES SOLS PRÉLEVÉS	99
2. ISOLEMENT ET SÉLECTION DES HALOPHILES	100
3. FRÉQUENCE D'ISOLEMENT ET RÉPARTITION DES ISOLATS HALOPHILES	102
4. IDENTIFICATION MOLÉCULAIRE ET ANALYSE PHYLOGÉNÉTIQUE.....	106
4.1 BACTÉRIES HALOPHILES.....	107
4.2 ARCHÉES HALOPHILES EXTRÊMES.....	113
5. ANALYSES PHYSIOLOGIQUES ET SCREENING ENZYMATIQUE DES ISOLATS HALOPHILES	120
5.1. ARCHÉES HALOPHILES.....	120
5.2. BACTÉRIES HALOPHILES.....	125
6. RÉSISTANCE AUX MÉTAUX LOURDS DES ISOLAS BACTÉRIENS	129
7. ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE DES BACTÉRIES HALOPHILES.....	132

CHAPITRE 3. CARACTÉRISATION PHYLOGÉNÉTIQUE ET ANALYSE TAXONOMIQUE DES HALOPHILES

1. CARACTÈRES CULTURAUX, MORPHOLOGIES ET STRUCTURES CELLULAIRES DES SOUCHES SÉLECTIONNÉES.....	136
1.1 SOUCHE BCHS25.....	136
1.2 SOUCHE ARSDJ4	136
2. IDENTIFICATION MOLÉCULAIRE	137
2.1. SÉQUENÇAGE DE L'ADNr 16S.....	137
2.2. AMPLIFICATION ET SÉQUENÇAGE DU GÈNE <i>rpoB</i>	140
2.3. DÉTERMINATION DU CONTENU EN GC% DE L'ADN GÉNOMIQUE	140
2.4. HYBRIDATION ADN-ADN.....	141

3. CARACTÈRES PHYSIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES.....	142
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	150
REFERENCES BIBLIOGRPHIQUES	155
ANNEXES	187

Résumé

L'objectif de ce travail de recherche consiste à analyser et caractériser la diversité des procaryotes des Chotts et Sebkhass situés dans des zones arides et semi-arides (Nord-Est de l'Algérie) ainsi d'élargir les connaissances de cette biodiversité du point de vue fonctionnel et intérêt biotechnologique. Dans un premier temps, la diversité et la distribution des communautés bactériennes et archéennes dans deux habitats hypersalés classés comme sites Ramsar 'Chott El Beida et Chott Tinsilt' ont été analysées par le biais d'une approche métagénomique avec un séquençage à haut débit (Illumina, MiSeq). D'autre part, une collection d'halophiles isolés de sept dépressions endoréiques a été explorée pour leur potentiel de production d'hydrolases, leur tolérance aux métaux lourds et comme agent de bio-contrôle vis-à-vis des champignons phytopathogènes. L'étude réalisée à partir de vingt échantillons de sols hypersalés a conduit à la description de séquences d'*Archaea* méthanogènes, hyperthermophiles et surtout d'halophiles affiliées à l'ordre *Halobacteriales*. Pour l'ensemble des échantillons, les séquences de *Bacteria* étaient associées à des *Actinobacteria* (22,4-16,4%), *Bacteroidetes* (15,1-21,6%), *Proteobacteria* (15,4-16,7%), *Chloroflexi* (8,35-5,2%) et *Planctomycetes* (5,6-4,8%) qui représentent plus de (68,7-64,8%) du total des séquences bactériennes détectées dans les deux Chotts (El Beida et Tinsilt) respectivement. Des *Acidobacteria*, *Aquificae*, *Cyanobacteria*, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia* et *Gemmatimonadetes* ont été également identifiés. Les modèles linéaires généralisés ont montré que le nombre des unités taxonomiques opérationnelles (OTUs) et la richesse en espèces variaient de manière significative entre les principaux facteurs (Site, Gradient et Horizon) ($p < 0,001$). Un total de 142 halophiles extrêmes et halotolérants (68 archées et 74 eubactéries non mycéliennes) ont été isolés et phylogénétiquement identifiés. Sur la base du séquençage ADNr 16S, les isolats archéens ont été attribués à sept phylotypes différents de la classe *Halobacteria* à savoir (*Haloarcula*, *Halococcus*, *Haloferax*, *Halogeometricum*, *Haloterrigena*, *Natrialba* et *Natrinema*, avec une dominance des genres *Haloferax* (30 souches) (44%) et *Halococcus* (13%). En outre, la diversité cultivable a montré un groupe hétérogène de bactéries halophiles appartenant à deux grands phylums, *Firmicutes* (52 souches/ 12 genres/ 70,2%) et γ - *Proteobacteria* (22 souches/ 4 genres/ 29,7%). La majorité des isolats ont été affiliés aux genres *Bacillus*, *Halobacillus*, *Oceanobacillus*, *Virgibacillus*, *Salicola* et *Halomonas*. Le screening enzymatique a montré que 89,7% des archées halophiles étaient capables de produire au moins deux types d'enzymes extracellulaires tandis que les souches produisant des activités d'estérase, gélatinase, inulinase, cellulase et protéase constituaient le groupe fonctionnel le plus diversifié. Par ailleurs, la plupart des producteurs enzymatiques des eubactéries halophiles étaient liés aux genres *Bacillus*, *Halobacillus* et *Virgibacillus*. Dans l'ensemble, les isolats bactériens ont présenté une tolérance remarquable avec des valeurs de concentration minimale inhibitrice (CMI) élevées pour le Ni^{2+} et le Cu^{+2} (0,625 à 5 mM) par rapport au Cd^{2+} (0,1 à 2 mM) et au Zn^{2+} (0,156 à 2 mM). En outre, dix souches affiliées aux genres *Bacillus*, *Virgibacillus* et *Halomonas*, ont montré une activité antagoniste importante vis-à-vis des phytopathogènes (*Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *F. verticillioides* et *Phytophthora capsici*). Cette étude sur la diversité des procaryotes halophiles des environnements salins rares a révélé une communauté abondante et diversifiée, présentant des sources potentielles de biocatalyseurs et de nouveaux métabolites bioactifs, ainsi que des candidats prometteurs comme agents de biocontrôle et des outils écologiques de bioremédiation et pour applications biotechnologiques importantes.

Mots clés : Algérie, Chott et Sebkhass, sol, salinité, procaryotes halophiles, diversité phylogénétique, *Archaea*, *Bacteria*, enzymes hydrolytiques, tolérance aux métaux lourds, activité antifongique.

Abstract

The aim of this work consist to analyze and characterize the microbial diversity of Chotts and Sebkhass located in arid and semi-arid zones (Northeastern of Algeria) as well as to expend the knowledge of this biodiversity from a functional point of view and biotechnological interest. First, the diversity and distribution of bacterial and archaeal communities in two hypersaline habitats classified as Ramsar sites 'Chott El Beida and Chott Tinsilt' were analyzed through a metagenomic approach using high throughput sequencing (Illumina, MiSeq). On the other hand, a collection of halophiles isolated from seven endoreic depressions was explored for their potential to produce hydrolases, their tolerance to heavy metals and as a bio-control agent against phytopathogenic fungi. The study carried out on twenty samples of hypersalinated soils led to the description of sequences of methanogenic archaea, as well as hyperthermophilic and especially halophilic archaea affiliated to the order *Halobacteriales*. For all samples, *Bacteria* sequences were associated with *Actinobacteria* (22.4-16.4%), *Bacteroidetes* (15.1-21.6%), *Proteobacteria* (15.4-16.7%) , *Chloroflexi* (8.35-5.2%) and *Planctomycetes* (5.6-4.8%), which represent more than (68.7-64.8%) of the total bacterial sequences detected in the two Chotts (El Beida and Tinsilt), respectively. *Acidobacteria*, *Aquificae*, *Cyanobacteria*, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia* and *Gemmatimonadetes* were also identified. Generalized linear models showed that the number of operational taxonomic units (OTUs) and species richness varied significantly between the principal investigated factors (Site, Gradient and Horizon) ($P < 0.001$). A total of 142 extreme halophilic and halotolerant isolates (68 archaea, 74 non-mycelial eubacteria) were isolated and phylogenetically identified. Based on 16S rDNA sequencing, archeal isolates were assigned to seven different phylotypes within *Halobacteria* class (*Haloarcula*, *Halococcus*, *Haloferax*, *Halogeometricum*, *Haloterrigena*, *Natrialba* and *Natrinema*), with a dominance of *Haloferax* (30 strains) (44%) and *Halococcus* (13%). In addition, the cultivable diversity showed a heterogeneous group of halophilic bacteria belonging to two phyla, *Firmicutes* (52 strains / 12 genera / 70.2%) and γ -*Proteobacteria* (22 strains / 4 genera / 29.7%). The majority of isolates are affiliated to *Bacillus*, *Halobacillus*, *Oceanobacillus*, *Virgibacillus*, *Salicola* and *Halomonas*. The enzymatic screening showed that 89.7% of archaeal halophiles were capable of producing at least two types of extracellular enzymes, and strains producing esterase, gelatinase, inulinase, cellulase and protease activities were the most diverse functional group. In addition, most of halophilic bacterial producers were related to the genera *Bacillus*, *Halobacillus* and *Virgibacillus*. Overall, bacterial isolates showed high minimal inhibitory concentration values (MIC) for Ni^{2+} and Cu^{2+} (0.625 to 5 mM) compared to Cd^{2+} (0.1 to 2 mM) and Zn^{2+} (0.156 to 2mM). Moreover, ten isolated strains belonging to *Bacillus*, *Virgibacillus* and *Halomonas* genera, displayed high activity against the pathogenic fungi (*Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *F. verticillioides* and *Phytophthora capsici*). This study on halophilic prokaryotes of unexplored saline niches, showed an abundant and diverse community, presenting potential sources of biocatalysts and novel bioactive metabolites as well as promising candidates of biocontrol agents, eco-friendly tools for heavy metal bioremediation and important biotechnological applications.

Key words: Algeria, Chott and Sebkhass, soil, salinity, halophile prokaryotes, phylogenetic diversity, *Archaea*, *Bacteria*, hydrolytic enzymes, heavy metal tolerance, antifungal activity.

ملخص

الهدف من هذا العمل البحثي هو تحليل وتوصيف التنوع الميكروبي في البحيرات المالحة الجافة (شط وسبخة) الواقعة في المناطق الجافة وشبه الجافة (شمال شرق الجزائر) وكذلك لتوسيع نطاق معرفة هذا التنوع البيولوجي من وجهة نظر العرض الوظيفي و التكنولوجيا الحيوية. أولاً ، تم تحليل تنوع وتوزيع المجتمعات البكتيرية في سبطين شديدي الملوحة مصنفيين عالمياً "شط البيضاء و شط تينسليت" باستخدام نهج ميتاجينومي ذو تسلسل عالي (Miseq-Illumina). من ناحية أخرى ، مجموعة من الهالوفايالات المعزولة من سبع منخفضات تم فحص قدرتها على إنتاج الإنزيمات المحللة ، وتحملها للمعادن الثقيلة وكعنصر تحكم حيوي للفطريات المسببة للأمراض النباتية. أدت الدراسة التي أجريت على عشرين عينة من التربة الشديدة الملوحة إلى وصف بكتريات عتيقة كالميثانوجينية ، وأخرى محبة للحرارة وخاصة المحبة للملوحة الشديدة أو الهالوفيلية. بالنسبة لجميع العينات ، ارتبط تسلسل البكتيريا الملاحظة بالنسبة لـ *Actinobacteria* (16.4-22.4٪) ، *Bacteroidetes* (15.1-21.6٪) ، *Proteobacteria* (16.7-15.4٪) ، *Chloroflexi* (8.35-5.2٪) و *Planctomycete* (5.6-4.8٪) ، والتي تمثل أكثر من (64.8-68.7٪) من إجمالي المتواليات البكتيرية المكتشفة في المنطقتين شط البيضاء وتينسليت، على التوالي. كما تم أيضاً تحديد البكتيريا المحبة للحموضة (*Acidobacteria*) ، *Aquifacae* ، البكتيريا الخضراء (*Cyanobacteria*) ، المكورات الدهنية والحرارية (*Deinococcus-Thermus*) ، *Firmicutes* ، *Gemmatimonadetes* و *Verrucomicrobia*. أوضحت النماذج الخطية المعممة أن عدد الوحدات التصنيفية (OTUs) و ثراء الأنواع تباين بشكل كبير بين العوامل الرئيسية المستقصاة (الموقع ، التدرج والأفق) ($P < 0.001$). تم عزل ما مجموعه 142 عذلة محبة ومتحسسة للملوحة (68 بكتيريا عتيقة ، 74 و بكتيريا). على أساس تسلسل الحمض النووي الريبي S16 ، تم تعيين عزلات البكتيريا العتيقة إلى سبعة أنواع مختلفة من فصيلة *Halobacteria* (*Haloarcula*, *Halococcus*, *Haloferax*, *Natrialba Natrinema*, *Halogeometricum*, *Haloterrigena*) ، مع سيطرت كل من *Haloferax* و *Halococcus* على مجوع العزلات بنسبة 44٪ و 13٪ على التوالي. بالإضافة إلى ذلك ، أظهر التنوع المستنتج مجموعة غير متجانسة من البكتيريا المحبة للملح تنتمي إلى نوعين رئيسيين هي *Firmicutes* ب 52 عذلة/12 نوع (70.2٪) و *Proteobacteria* ب 22 عذلة/4 أنواع (29.7٪). غالبية العزلات هي تابعة لبكتيريا *Bacillus*, *Halobacillus*, *Oceanobacillus*, *Virgibacillus*, *Salicola* , و *Halomonas*. أظهر الفحص الأنزيمي أن 89.7٪ من الهالوبيكتيريا كانت قادرة على إنتاج نوعين على الأقل من الإنزيمات المحللة ، وأن السلالات التي تنتج الاستيراز ، والجيلاتيناز ، والإينوليناز ، والسليلاز والبروتياز كانت أكثر المجموعات الوظيفية تنوعاً. بالإضافة إلى ذلك ، فإن معظم العزلات المنتجة للإنزيمات مرتبطة بالأنواع *Bacillus*, *Halobacillus* و *Virgibacillus*. حيث تحتل أنشطة الأميليز والإستيراز والجيلاتيناز والنوكلياز المرتبة الأولى بين الأنشطة الإنزيمية الملحوظة. بشكل عام ، أظهرت العزلات البكتيرية غير الفطرية تحملاً ملحوظاً مع قيم تركيز عالية (MIC) لكل من Ni^{2+} و Cu^{2+} (5-0.625 ميلي مول) بالنسبة إلى Cd^{2+} (0.1-2 ميلي مول) ، و Zn^{2+} (0.156 إلى 2 ميلي مول). بالإضافة إلى ذلك ، أظهرت عشر سلالات مرتبطة بالأنواع *Bacillus*, *Virgibacillus* و *Halomonas* نشاطاً مثبطاً مهماً ضد مسببات الأمراض النباتية (*Botrytis cinerea* و *Fusarium oxysporum* , *F. verticillioides* و *Phytophthora capsici*). كشفت هذه الدراسة عن تنوع بدائيات النوى في بيئات مالحة نادرة وعن وجود مجتمع وفير ومتنوع ، غني بمصادر محتملة للعوامل والأيضات النشطة حيوياً ، فضلاً عن مرشحين واعدين كعوامل مراقبة حيوية وأدوات بيئية للإصلاح البيولوجي و تطبيقات بيوتكنولوجية هامة .

الكلمات المفتاحية: الجزائر ، شط وسبخة ، التربة ، الملوحة ، بدائيات النواة محبة للملح ، التنوع ، الأركيا ، البكتيريا ، إنزيمات التحلل ، مقاومة المعادن الثقيلة ، النشاط المضاد للفطريات.

Liste des figures

Figure 1. Exemples des environnements hypersalins thalassohalins	11
Figure 2. Situation géographique des Chotts et Sebchas en Algérie.....	13
Figure 3. Transport cellulaire des ions et acides aminés chez les archées aérobies halophiles (Salt in stratégie).....	15
Figure 4. Complexe opérationnelle d'initiation de la transcription (Bending protein-ADN) chez l'archée halophile extrême <i>Halobacterium</i> sp. NRC-1 (A) et l'être humain (B).....	16
Figure 5. Exemples de quelques solutés compatibles	17
Figure 6. Arbre phylogénétique universel basé sur le séquençage du gène d'ARNr (16S).	19
Figure 7. Carte de localisation des sites échantillonnés (Nord-Est de l'Algérie)	41
Figure 8. Procédure d'extraction d'AND génomique (kit DNeasy®PowerLyzer®PowerSoil).....	44
Figure 9. Extraction d'ADN cellulaire « DNeasy®Min-i-procedure, Qiagen ».....	50
Figure 10. Variation des différents paramètres physicochimiques des sols prélevés.....	67
Figure 11. Matrice des corrélations entre les différents paramètres physicochimiques du sol mesurés dans Chott El Beida et Chott Tinsilt.....	74
Figure 12. Abondance relative des phyla microbiens dans les sols analysés	75
Figure 13. Abondance relative des archées détectées dans les sols des Chotts analysés	77
Figure 14. Abondance relative des groupes bactériens majeurs détectés dans les sols analysés.	80
Figure 15. Classification hiérarchique en fonction de l'abondance relative de différents membres des classes bactériennes majeures détectées dans les échantillons de sols selon les gradients (G) et les horizons (H) de prélèvements des deux sites analysés Chott El Beida (CHS) et Tinsilt (TIN).	83
Figure 16. Variation de la diversité archéenne dans les deux Chotts.	85
Figure 17. Variation de la diversité bactérienne dans les deux Chotts.....	86
Figure 18. Diagramme de Venn indiquant le nombre des espèces de procaryotes exclusives et communes dans les deux Chotts (El Beida et Tinsilt).....	88
Figure 19. Indices de diversité et estimation de la richesse des espèces de procaryotes (Bacteria/Archaea) des Chotts (El Beida-Tinsilt).	89
Figure 20. Courbes de raréfaction et d'extrapolation de la richesse estimée en espèces de procaryotes (Bacteria/Archaea) des Chotts (Tinsilt et El Beida).....	91
Figure 21. Analyse canonique des correspondances (ACC) illustrant les relations entre les classes de procaryotes majeures, et les facteurs édaphiques mesurés.....	93
Figure 22. Différents aspects phénotypiques des halophiles après mise en culture sur gélose (HM)	102
Figure 23. Fréquence d'isolment des halophiles	104
Figure 24. Profil de migration sur gel d'agarose des produits de PCR du gène ADNr16S de quatre isolats archéens.....	106
Figure 25. Arbre phylogénétique des isolats bactériens halophiles et halotolérants (Phylum des <i>γ-Proteobacteria</i>	110
Figure 26. Arbre phylogénétique des isolats bactériens halophiles et halotolérants (Phylum des <i>Firmicutes</i>	111
Figure 27. Arbre phylogénétique (Neighbor-joining Tree) montrant les liens entre les isolats archéens (<i>Haloferax</i> spp. et <i>Halogeometricum</i> spp. et les espèces étroitement apparentées.....	117

- Figure 28.** Arbre phylogénétique (Neighbor-joining Tree) montrant les liens entre les isolats archéens (*Haloterrigena* spp., *Natrialba* spp., *Natrinema* spp., *Halococcus* spp. and *Haloarcula* spp.) et les espèces étroitement apparentées. **118**
- Figure 29.** Activité antagoniste des souches de *Bacillus* sp. BCHS3 et BSOM9 vis-à-vis de *Fusarium oxysporum*, et *Fusarium verticillioides*..... **134**
- Figure 30.** Micrographies électroniques montrant la morphologie générale des cellules colorées négativement des souches BCHS25 (A-MET), et ArSDJ4 (B, MEB),..... **137**
- Figure 31.** Arbres phylogénétiques basés sur l'analyse des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S et *rpoB* montrant les relations entre les souches ArSDJ4 et BCHS26 avec les espèces-types des genres les plus proches. **139**

Liste des tableaux

Tableau 1. Classification phylogénétique des archées halophiles.....	21
Tableau 2. Programme de PCR et cycle employés	51
Tableau 3. Séquences des amorces pour PCR	52
Tableau 4. Isolats halophiles et souches de références utilisées	56
Tableau 5. Séquences des amorces pour amplification/séquençage du <i>rpoB</i>	61
Tableau 6. ANOVA à trois facteurs testant la variation des différents paramètres physicochimiques des sols.....	68
Tableau 7. GLMs testant les effets des variables édaphiques sur les paramètres de biodiversité des archées et des bactéries.....	86
Tableau 8. Indices de la diversité et richesse totale des espèces de procaryotes estimés pour les deux zones humides (Chott El Beida et Tinsilt).....	90
Tableau 9. Valeurs moyennes du pH et de la conductivité électrique des sols analysés	100
Tableau 10. Milieu d'isolement et caractères microscopiques des isolats.....	105
Tableau 11. Résultat du BLASTn et similarité des séquences ADNr 16S des eubactéries halophiles et halotolérantes.....	108
Tableau 12. Résultat du BLASTn et similarité des séquences ADNr 16S des archées halophiles....	114
Tableau 13. Résultat du criblage enzymatique des archées halophiles.....	124
Tableau 14. Résultat du criblage enzymatique des bactéries halophiles modérées	128
Tableau 15. Activité antifongique des bactéries halophiles isolées.....	133
Tableau 16. Résultat du BLAST des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S de la souche ArSDJ4 avec les souches-types des espèces du genre <i>Haladaptatus</i>	138
Tableau 17. Résultat du BLAST des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S de la souche BCHS25 avec les souches-types des espèces les plus proches du genre <i>Lentibacillus</i> ..	138
Tableau 18. Caractéristiques physiologiques de la souche bactérienne <i>Lentibacillus</i> sp. BCH25 ^T ...	145
Tableau 19. Caractéristiques physiologiques de la souche archéenne <i>Haladaptatus</i> sp. ArSDJ4 ^T ..	147

Liste des abréviations

Abs₂₃₀/Abs₂₆₀/Abs₂₈₀ : Absorbance à 230-260-et 280nm
ACC : Analyse canonique des correspondances
ACP : Analyse en composante principale
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
ANOVA : Analyse de la variance
ARNr 16S : Acide ribonucléique 16S
ADNr 16S : Gène codant pour ARN ribosomique 16S
ATP : Adénine triphosphate
BET : Bromure d'éthidium
BLASTn : Basic Local Alignment Search Tool for nucleotide
BRs : Bactériorubérine
CE : Conductivité électrique
CHS : Chott El Beida Hammam Essoukhna
CMC : Carboxy-méthyl-cellulose
CMI : Concentration minimale inhibitrice
CTI : Chott Tinsilt
DDH : DNA-DNA hybridation
DIG-DNA : Digoxigenin DNA
dNTP : Mélange des quatre désoxynucléotides
DPANN : *Diapherotrites*, *Parvarchaeota*, *Aenigmarchaeota*, *Nanoarchaeota* et *Nanohaloarchaeota*
EDTA : Éthylène diamine tétra-acétique
EPS : Exopolysaccharides
F : Forward
F : Statistiques de *Fisher*
FASTA : *.fasta*, un format de fichier texte utilisé pour stocker des séquences biologiques
g/l : gramme par litre
G1-G1 : Gradient1-Gradient 2
GC et GC% : Pourcentage de GC, ou coefficient de Chargaff
GLM : Modèle linéaire généralisé
H' : Indice de Shannon
*H'*_{max} : Indice de diversité maximale de Shannon
H1 et H2 : Horizon 1 et Horizon 2
HM : Halophilic medium
KAR : Chott Karalla
Kb : kilobase
LPSN : List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature
M : Molarité
AU/ml : unité d'activité par millilitre
MEGA : Molecular Evolutionary Genetics Analysis
meq/100g : milliéquivalent par millilitre
mM : Millimol
MO% : Taux de la matière organique
mS/cm : Millisiemens par centimètre
NCBI : National Center for Biotechnology Information
ng : Nanogramme
NGS : Next generation sequencing
nifH : Gène H de régulation de l'opéron NIF pour la fixation d'azote
nirS : Gène de la nitrate réductase
OTU : Unité Taxonomique Opérationnelle
p : Valeur de la probabilité

p/v : poids/volume
pb : Paire de bases
PCR : Amplification en chaîne par polymérase.
pH : Potentiel hydrogène
PHA : Polyhydroxyalcanoates
ppm : Partie par million
q.s.p : Quantité suffisante pour
R : Reverse
r : Coefficient de corrélation de Pearson
RDP : Ribosomal Database Project
rpoB : Gène codant la sous-unité β de l'ARN polymérase bactérienne.
S : Richesse spécifique
 $S_{(Chao\ 2)}$: Estimateur de la richesse des espèces de Chao de deuxième ordre
 $S_{(est)}$: Valeur estimée de richesse spécifique
 $S_{(Jack\ 1)}$: Estimateur de la richesse des espèces de Jackknife de premier ordre
SD : Écart-type
SDJ : Sebkha Djendli
SDS : dodécylsulfate de sodium
SEM : Scanning Electron Microscopy
SMD : Sebkha Medghassen
SOM : Sebkha Oumache
SSC : Tampon citrate sodique
SSU : Small subunit ribosomal ribonucleic acid (SSU rRNA)
TE : Tampon Tris-EDTA
TEM : Transmission Electron Microscopy
 T_m : Température de fusion d'AND (temperature of melting)
 μ l : Microlitre
 χ^2 : khi-deux

INTRODUCTION GÉNÉRALE

INTRODUCTION GÉNÉRALE

En dépit de l'importance scientifique et économique, notre connaissance de la biosphère reste limitée. De la même façon que l'homme a su s'acclimater à l'atmosphère terrestre, au spectre de son milieu habituel, des organismes vivants prospèrent dans des milieux réputés, de notre point de vue, 'hostiles et extrêmes' où l'organisme est qualifié 'extrémophiles' (Singh *et al.*, 2019).

Les habitats hypersalins qu'ils soient naturels (mer, lacs salés, mines de sels...) ou d'origine anthropogénique (marais salants, tables de cristallisation, ...) constituent un exemple typique des milieux extrêmes dans lesquelles une diversité des espèces microbiennes halophiles considérable et unique peut être trouvée (Lizama *et al.*, 2011), allant d'organismes eucaryotes à un groupe hétérogène de procaryotes (bactéries et archées) qui constituent la microflore prédominante (Oren, 2002). Ceci décrit leur tendance invraisemblable d'adaptation moléculaire et physiologique en développant différentes approches pour prospérer sous l'extrême salinité et faible disponibilité des nutriments en utilisant leur capacité à produire diverses voies métaboliques dans ces environnements compétitifs (Edbeib *et al.*, 2016).

Les organismes vivant en milieux extrêmes salins 'thalassohaline, athalassohaline' et en particulier, les microorganismes présentant un répertoire de voies métaboliques et de biomolécules originales, leur permettant non seulement de survivre dans ces conditions, mais aussi de se développer souvent de manière optimale (Margesin et Schinner, 2001). L'intérêt porté à ces microorganismes a abouti à la découverte d'une diversité inouïe, complètement inattendue, dans ces écosystèmes supposés hostiles et les propriétés singulières de leurs biomolécules à savoir les enzymes ont très vite attiré l'attention des biotechnologues (de Lourdes Moreno *et al.*, 2013). Également, l'activité métabolique de ces microorganismes et donc leur croissance varie selon les conditions physiques et chimiques de leur biotope et la connaissance de l'impact de ces facteurs permet à la fois de mieux comprendre leur distribution dans la nature et de concevoir des méthodes pour les contrôler ou favoriser leurs activités biologiques ou possibilités biotechnologiques (Mellado *et al.*, 2004). L'intérêt croissant pour les microorganismes halophiles florissant dans ces milieux extrêmes pourrait servir de systèmes modèles pour comprendre les bases moléculaires et physiologiques adaptative particulière, ainsi d'élargir les connaissances de la biodiversité microbienne des milieux hostiles aussi bien du point de vue taxonomique que du point de vue fonctionnel et intérêt biotechnologique (Gunde-Cimerman *et al.*, 2018)

En raison de la capacité d'adaptation aux conditions hostiles, les halophiles présentent un groupe intéressant de microorganismes avec des caractéristiques biotechnologiques et industrielles spécifiques (Singh *et al.*, 2018), à savoir la capacité de produire des biopolymères, des pigments, des antimicrobiens, des solutés compatibles et des enzymes hydrolytiques (Margesin et Schinner, 2001; DasSarma et DasSarma, 2015). Ces enzymes 'halophilic-actives enzymes' devraient constituer un outil très puissant comme biocatalyseurs pour les processus et procédés de biotransformation industrielle dans des conditions extrêmes de pH, de température, de force ionique et / ou de solubilité limitée (Delgado-Garcia *et al.*, 2012; Schreck et Grunden, 2014), ce qui peut être utile dans diverses applications (Flores-Gallegos *et al.*, 2019). En outre, les micro-organismes halophiles deviennent de plus en plus utiles comme moyen alternatif, sûr et efficace de bioremédiation d'environnements salins contaminés (Arora *et al.*, 2017).

Récemment, le développement de la biologie moléculaire a offert de nouvelles techniques d'identification des micro-organismes et de résolution des complexes microbiens basées sur les critères sensibles et spécifiques que sont les séquences nucléotidiques, en éludant l'étape de culture (Daniel, 2005; Nacke et Daniel, 2015). Ces techniques sont de remarquables outils et leur utilisation en écologie microbienne est une opportunité qui devrait permettre de repositionner les écosystèmes salins dans une approche systémique et dynamique (Ventosa *et al.*, 2015). L'amélioration de la description taxonomique et fonctionnelle microbienne prise dans leur globalité devrait servir de fondement à des thématiques de recherches plus fondamentales qui pourraient constituer les véritables challenges de l'écologie microbienne moderne.

L'Algérie compte plus de 2 000 zones humides et écosystèmes salins naturels avec une typologie et une écologie particulières, dont une cinquantaine sont classées comme étant sites Ramsar d'importance internationale en termes de biodiversité et rôle fonctionnel (Aliat *et al.*, 2016). Cependant, ces habitats très originaux et diversifiés dans les steppes et le Sahara algériens, qui détiennent plus de 80% de la superficie des terres du pays, sont encore peu étudiés pour évaluer leurs ressources biologiques spécialement au terme diversités microbiennes et seulement des informations très limitées sur le microbiote autochtone sont disponibles, à l'exception de quelques études antérieures (Hacène *et al.*, 2004; kharroub, 2007; Boutaiba *et al.*, 2011; Quadri *et al.*, 2016). Il apparaît pertinent, d'explorer ces environnements notamment, afin de rechercher l'éventuelle présence d'une vie microbienne halophile et d'identifier sa diversité. Ainsi que, la prospection de ces écosystèmes salins naturels permet d'améliorer nos connaissances sur les distributions et les fonctions des populations microbiennes dans le but d'aboutir à une meilleure

compréhension des diversités microbiennes, ces interactions et à terme de ces applications industrielles et biotechnologiques potentielles.

Considérant l'importance de tels environnements extrêmes et naturels, qu'il nous a paru nécessaire d'entreprendre cette étude. Les communautés bactériennes et archéennes halophiles habitant différentes dépressions salines (Sebkha et Chott) situées dans des terres semi-arides et hyperarides situées au Nord-Est Algérien (Batna, Sétif, Oum El Boughi, Biskra et ElOued), ont été évaluées sur différents échantillons de sédiments afin de déterminer la viabilité de ces dernières, décrivant leurs caractéristiques phénotypiques et affiliation phylogénétique. On outre, l'isolement de nouvelles espèces microbiennes autochtones offrira des opportunités dans la découverte de nouvelles molécules dont les propriétés actives pourront être utilisées à des fins biotechnologiques. Cette approche représente l'ossature de la recherche et de celle-ci se dégagent plusieurs lignes directrices :

- La première partie de ce travail de thèse s'est essentiellement focalisée sur l'estimation de la diversité eubactérienne et archéenne de manière culture-indépendante par une approche métagénomique au séquençage de nouvelle génération (**Illumina, MiSeq**) pour dresser un inventaire précis de la diversité spécifique présente dans cet environnement. Pour cela, des extractions d'ADN ont été effectuées sur des échantillons de sédiments des lacs salés peu profonds pour ensuite être séquencés à haut-débit. L'analyse de l'effet des caractères physicochimiques du sédiment à savoir (contenu ionique, salinité, conductivité électrique, pH...) sur la composition et l'abondance des communautés procaryotiques séquestrées au sein des Chotts et Sebkhas a constitué le principal objectif de cette partie. Ainsi, pour établir un modèle de connaissance des communautés autochtones halophiles/halotolérantes des lacs salés (Chott et Sebkha) Algériens et de contribuer à la bonne compréhension du mode de résistance de ces microorganismes aux conditions extrêmes.

- La deuxième partie consiste à évaluer la diversité eubactérienne et archéenne de manière culture-dépendante ou cultivable. Pour ce faire, des colonies ont été isolées sur des milieux riches spécifiques à partir des échantillons de sédiments salins de différentes localités. Les isolats ont été ensuite identifiés et la diversité phylogénétique a été déterminée par séquençage de l'ADN codant pour l'ARNr 16S. De plus, des tests biotechnologiques intéressants ont été réalisés afin de démontrer leur tolérance aux métaux lourds, leur potentiel de biocontrôle et comme source de biocatalyseurs ou enzymes hydrolytiques. L'hypersalinité, le pH et la

température ont été utilisés comme principaux paramètres de sélection pour la biodiversité microbienne de ces lacs et, par conséquent, facilitent l'identification de nouveaux isolats.

- Troisièmement, cette partie s'intéresse aux analyses polyphasiques et la caractérisation taxonomique de quelques isolats potentiellement nouvelles. Une analyse phylogénétique a été effectuée basée sur le séquençage d'ADNr 16S, la détermination du contenu en GC et par des tests d'homologies par hybridation ADN-ADN. Conjointement, des analyses phénotypiques, physiologiques ont été réalisées pour déterminer leur position taxinomique exacte.

Ce travail est structuré en trois chapitres après une introduction générale incluant les objectifs sous-tendant la présente étude :

-Le premier chapitre fait état des connaissances acquises sur les communautés microbiennes colonisant les environnements salins et hypersalins. Ce chapitre traite également les méthodes et les techniques d'analyse de la biodiversité et écologie microbienne des écosystèmes terrestres ainsi qu'aux approches les plus fréquemment utilisées pour la caractérisation microbiologique des biotopes salins. De plus, des généralités abordant les potentielles applications des halophiles.

-Le deuxième fait référence à l'ensemble des méthodes analytiques utilisées dans le cadre de ce travail. Cette partie a été consacrée à un état des lieux techniques employées pour décrire et caractériser les écosystèmes échantillonnés d'un point de vue microbiologique (identification de la flore bactérienne halophile) et de présenter les plans d'expériences appliqués pour analyser les communautés microbiennes (approches culturelles et génomiques). Étant donné la dépendance de cette thèse vis à vis des techniques de biologie moléculaire mettant en évidence la diversité des microorganismes dans les sédiments salins, et la caractérisation des isolats en termes d'identité phylogénétique. La description de ces zones ainsi que leur caractérisation physicochimique sont donc importantes afin de mieux appréhender cette diversité.

-Le troisième chapitre est relatif aux résultats et discussion portant sur (i) l'analyse métagénomique des communautés microbiennes totales, halophiles et halotolérantes des Chotts et Sebkhass sélectionnés, (ii) la distribution, l'isolement et l'identification phylogénétique des eubactéries et archées halophiles et leur potentialité biotechnologique comme producteur d'enzymes et de métabolites secondaires, (iii) la taxonomie polyphasique des isolats halophiles potentiellement nouvelles.

-Une conclusion générale récapitule les principaux résultats de ce travail et ouvre des perspectives sur les axes de recherche qui devraient être abordés afin de renforcer la compréhension sur la structure des communautés microbiennes dans les environnements salés et hypersalés algériens, d'affiner les limites de viabilité des microorganismes halophiles en fonction des paramètres physico-chimiques, et d'exploiter cette biodiversité comme source de molécules bioactives et productrices de métabolites à intérêt biotechnologique.

CHAPITRE 1

‘‘État des connaissances’’

1. Biodiversité et écologie microbienne d'un écosystème
2. Biodiversité microbienne des environnements salés et hypersalés (Diversité Phylogénétique)
3. Applications biotechnologiques des halophiles
4. Méthodes d'analyse en écologie microbienne

1. BIODIVERSITÉ ET ÉCOLOGIE MICROBIENNE D'UN ÉCOSYSTÈME

1.1. Définition de la biodiversité

La biodiversité ou la diversité biologique désigne 'la variabilité des organismes vivants qui peuplent la biosphère de toute origine y compris les écosystèmes terrestres, marins ou autres et les complexes écologiques dont ils font partie (Ramade, 2008). La biodiversité a également été définie comme un ensemble d'identités mesurables selon différentes échelles de l'espace et du temps.

La biodiversité est habituellement exprimée en trois niveaux de complexité croissante (Ives et Carpenter, 2007 ; Blandin, 2010 ; Page, 2010) : (i) *La diversité génétique* (diversité intraspécifique) qui se définit par la variabilité des gènes ou génotype à l'intérieur de deux individus d'une même espèce ou sous-espèce. Cette diversité demeure un des facteurs permettant aux espèces de s'adapter aux changements de leur environnement; (ii) *La diversité spécifique* (diversité interspécifique), correspond à celle qui existe au niveau des différentes espèces trouvées dans une aire donnée où chaque groupe défini peut être caractérisé par le nombre des taxons qui le composent et (iii) *La diversité écosystémique* ou écologique, qui correspond à la diversité des écosystèmes qui existe au niveau des environnements physiques, elle concerne les interactions des populations naturelles et de leur environnement physique ou encore les groupes fonctionnels d'espèces et d'habitats.

1.2. Écologie microbienne d'un écosystème

Les micro-organismes constituent une partie importante de la biomasse de l'ensemble de la biosphère et représentent des enjeux majeurs en agriculture, alimentation, santé humaine et animale, production d'énergie renouvelable, dépollution ou traitements de déchets. Ils sont au cœur de notre environnement puisqu'ils font intrinsèquement partie des écosystèmes qui nous entourent.

L'écologie microbienne consiste à caractériser la biodiversité microbienne d'un écosystème, à caractériser les interactions entre microorganismes, à identifier le rôle des microorganismes dans l'écosystème et à étudier les différentes interactions hôtes-microorganismes (symbiose, commensalisme, parasitisme,...) (Ramette, 2007).

Pour connaître et maîtriser ces écosystèmes, la caractérisation de ces microorganismes est donc un atout essentiel. Or seuls quelques pourcentages d'entre eux étant cultivables en laboratoire, les approches métaboliques (génomique, transcriptomique, protéomique, et

métabolomique) qui permettent de s'affranchir de cette étape sont une méthode de choix pour appréhender dans leur globalité ces écosystèmes microbiens complexes (Øvreås, 2000 ; Torsvik et Øvreås, 2002 ; Riesenfeld *et al.*, 2004; Schneider et Riedel, 2010). Les avancés scientifiques en biologie moléculaire et l'intérêt croissant, sur les sujets concernant l'environnement, ont contribué au développement exponentiel des études en écologie microbienne, couvrant ainsi des domaines très variés à partir de lesquels l'écosystème microbien s'affirme comme un domaine d'importance pour la science, l'industrie et l'environnement (Franzosa *et al.*, 2015 ; Rowe *et al.*, 2017)

Dans le domaine de l'environnement, les études en écologie microbienne se sont consacrées sur la description de la biodiversité (Ramette, 2007), la relation entre diversités-activités-services écosystémiques (Zak *et al.*, 2002; Widder *et al.*, 2016), ainsi que l'impact de la variété des situations environnementales (la bioremédiation, les processus de recyclage, de biodegradation et la connaissance de l'écologie des biomasses épuratrices) (Paul *et al.*, 2005; Truu *et al.*, 2009).

D'un point de vue médical, les analyses en écologie microbienne par le biais métagénomique de masse se sont employées pour ; (i) établir un catalogue des micro-organismes présents chez les organismes hôtes, et comprenant les agents pathogènes, les symbiotes et commensaux, (ii) identifier leur répartition ainsi que les co-infections dans les populations naturelles, (iii) éclairer les interactions possibles entre les agents pathogènes ou entre les pathogènes et d'autres microorganismes qui pourraient interférer avec leur transmission (Chhour *et al.*, 2005; Huttenhower *et al.*, 2012). Le progrès des technologies de séquençage d'ADN et de la bioinformatique permet de lever ce verrou et ainsi d'accroître notre connaissance des écosystèmes microbiens complexes.

L'établissement de la communauté microbienne dans les niches rhizosphériques qui présente un habitat propice à la colonisation microbienne où les plantes sont donc la principale force structurante de ces communautés (Berendsen *et al.*, 2012) qui seraient entièrement dépendantes d'organismes microbiens pour leur croissance et leur survie (Mendes *et al.*, 2011). Qu'ils soient mutualistes, parasites ou non symbiotiques, les microorganismes peuvent influencer la diversité et la composition des communautés végétales, en influençant le potentiel adaptatif des plantes au milieu abiotique (apport en nutriments) ou biotique (compétition intra-règne et meilleure tolérance/résistance à des organismes pathogènes) (Köberl *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2014; Vandenkoornhuysen *et al.*, 2015).

2. BIODIVERSITÉ MICROBIENNE DES ENVIRONNEMENTS HYPERSALÉS

2.1. Environnements salés ou salins

2.1.1. Composition ionique et concentration en sel

Les environnements où la concentration en sels est élevée sont considérés comme extrêmes et ont fait l'objet de ce travail de thèse. Les environnements salins ou hypersalins sont essentiellement caractérisés par leur concentration totale en sels mais leur composition ionique est un facteur clé pour déterminer le biotope de l'environnement (Oren, 2006a).

Ces ions peuvent être minéraux (Cl^- , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , Li^+ , etc) ou organiques (acétate, carbonate, citrate, nitrate) ainsi que monoatomiques (F^-) ou polyatomiques (SO_4^{2-}). Dans le cas des environnements hypersalés, le terme sel est utilisé pour définir une combinaison de différentes molécules ioniques 'anions et cations' inorganiques, parmi lesquels Cl^- et Na^+ sont les plus abondants. Un environnement est qualifié hypersalin quand la concentration en sels est supérieure à celle de l'eau de mer, qui est d'environ 35g/l (DasSarma et DasSarma, 2017). Cependant, la notion d'hypersalinité peut faire référence à des concentrations salines bien plus élevées, parfois même proches des conditions de saturation (Oren, 2002).

2.1.2. Types des milieux hypersalés

Les environnements hypersalins sont nombreux et très répandus sur notre planète (Litchfield et Gillevet, 2002) dont le sol et l'eau sont les deux types majeurs d'environnements salés biologiquement importants, où le facteur sel agit sur les communautés microbiennes halophiles. Il existe deux types de milieux hypersalins qui diffèrent selon leur composition ionique ; les environnements thalassohalins et athalassohalins.

a. Environnements thalassohalins

Les environnements thalassohalins (du grec : *thalasso*, la mer) ont une composition ionique reflétant celle de l'eau de mer, avec des proportions de cations et d'anions similaires et une prédominance du NaCl (Ventosa et Arahall, 2006). Les environnements thalassohalins peuvent être d'origine anthropique, comme les marais salants, ou bien d'origine naturelle, comme les sebkhas ou les lagons.

- *Environnement thalassohalin d'origine anthropique* : la majorité des milieux hypersalés ont pour origine l'évaporation des eaux de mers et sont dites thalassohalines où le chlorure de sodium est le sel prédominant. La proportion des autres sels minéraux est en grande

partie semblable à celle de l'eau de mer. Un exemple illustrant est celui des marais salants, ou salines d'évaporations (Figure 1) présentant une succession de bassins d'évaporation et de cristallisation créés afin de produire du sel à partir de la concentration des sels présents dans l'eau de mer où le NaCl précipite en halite (conditions saturantes) (Oren, 2006a ; DasSarma et DasSarma, 2017). Comme l'évaporation progresse, les minéraux deviennent plus concentrés et éventuellement se précipitent dans l'ordre suivant : calcite (CaCO_3), le gypse ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), l'halite, sylvinite (KCl) et enfin carnallite (KCl, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Grant, 2004). La concentration finale des plans thalassohalins est dominée par le magnésium et les ions de chlorure mais durant l'évaporation, certains changements peuvent survenir dans la composition ionique des gypses ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ou des autres minéraux (Oren, 2002).

- *Environnement thalassohalin d'origine naturelle* : Ces écosystèmes sont fréquents : (i) Sous climat sec (semi-désertique, steppique, tropical sec) où la forte évaporation limite le drainage, (ii) Sous climat aride en bordure des dépressions salées subdésertiques 'Sebkhas et Chotts' en Afrique du Nord, (Playas) en Amérique du Sud, 'Takyr' en Asie centrale) et dans les grandes vallées irriguées (Nil, Euphrate, Colorado, vallées du Moyen-Orient), et (iii) Sous climat humide en bordure de mer (Lagons en climat tempéré et Mangroves en climat tropical humide et équatorial) (Oren, 2007; Edbeib *et al.*, 2016). Les environnements thalassohalins sont en conditions naturelles soit dépourvus de végétation lorsque la salinité est très élevée, soit colonisés par une végétation spécialisée et de nombreuses plantes halophytes adaptées à de telles conditions (Figure 1).

b. Environnements athalassohalins

Les eaux hyper salées formées par la dissolution des dépôts salés fossiles dérivent de sources d'eau douce (torrents de montagne...) sont qualifiées d'eaux athalassohalines. Ces environnements ont une composition ionique différente de celle de l'eau de mer en fonction de la nature des dépôts et ils se caractérisent par une domination des ions potassium, magnésium (Demergasso, 2004, Ventosa *et al.*, 2008). L'environnement hypersalin le plus étudié au monde est d'origine athalassohaline. Il s'agit de la Mer Morte qui représente un lac fermé partagé entre la Jordanie et la Palestine où la concentration saline est plus de 340 g/L avec un pH relativement faible de l'ordre de 5,8-6. A cause de la forte concentration calcique (Ca^{2+} : 63,97 g/L), la solubilité du sulfate est faible et les anions monovalents Cl^- et Br^- représentent plus de 99 % des anions totaux (Oren, 2002).

Il existe également des environnements athallassohalins alcalins (Lac Magadi et d'autres lac au Kenya et Tanganika), dans le désert Ouadi Natroun en Égypte ainsi qu'aux États-Unis, Inde, Chine, etc. Ces lacs sont riches en ions carbonates et bicarbonates, responsables de l'alcalinité du lac, et qui représentent une partie importante des anions totaux, en plus du chlore et sulfate (Oren, 2006a). En générale, la nature des ions dominants dans les lacs hypersalés dépend de la topographie environnante, de la géologie et des conditions climatiques (Oren, 2011).

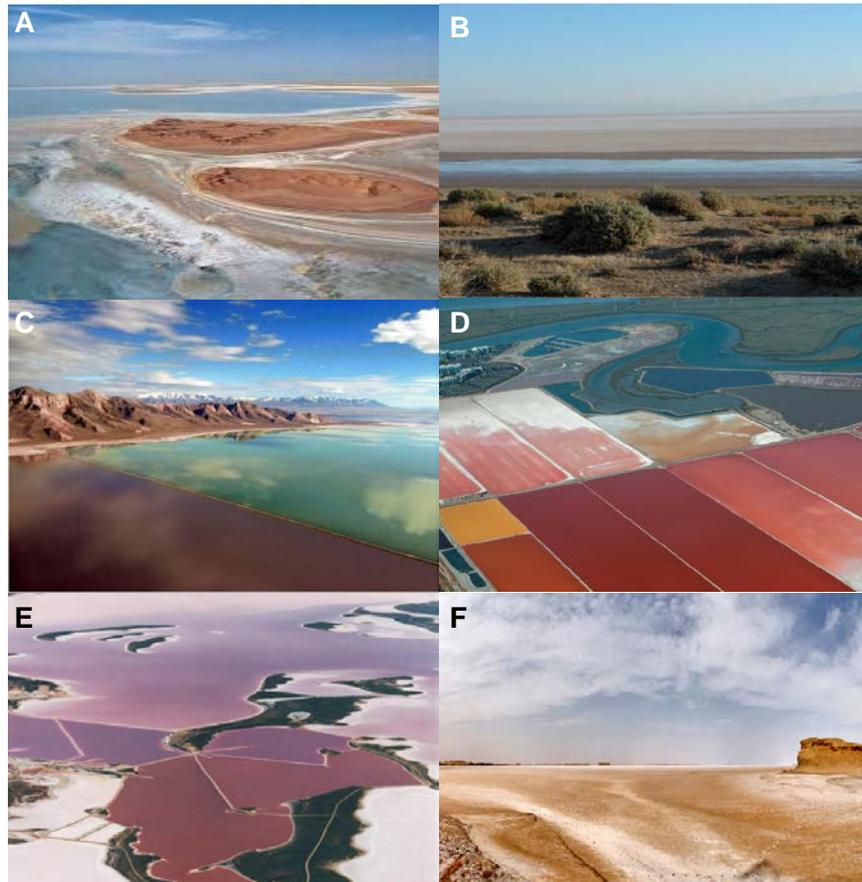


Figure 1. Exemples des environnements hypersalins thalassohalins (naturels et anthropiques).

A. Chott Melghir, **B.** Chott El Bieda Hammam Essoukhna, **C.** Great Salt Lake-USA, **D.** Saline de San Fransisco-USA, **E.** Saline d'Australie, **F.** Chott Elhodna. (La croissance dense des microorganismes halophiles conduit à un rougissement des milieux).

<http://www.labbize.net/French/Pictures/Oasis/Souf/Souf/Souf.htm>

<http://www.cheethamsalt.com.au/SocialResponsibility/Environment.aspx>

https://www.macmillanhighered.com/BrainHoney/Resource/6716/digital_first_content/trunk/test/hillis2e/asset/img_ch19/c19_fig17.html

2.2. Les lacs salés en Algérie

L'Algérie recèle un grand nombre d'écosystème aquatique de type zone humides naturelles de la région méditerranéenne. Ces zones sont représentées sous forme de marais d'eaux douces ou marines, les oueds, les barrages et les retenues dont plus de 50% de ces sites sont des lacs salés couvrant environ une superficie de deux millions d'hectares (Samraoui et Samraoui, 2008; Benhadj *et al.*, 2018). La majorité de ces plans d'eau sont composées d'immenses lacs salés continentaux, limitent généralement dans les zones arides à semi-arides. Ces lacs s'étalent de la côte nord algérienne jusqu'au Sahara en traversant les Hauts Plateaux, formés de vastes dépressions endoréiques continentales, synonymes des Chotts et Sebkhas (Menasria *et al.*, 2018). Le Chott est défini comme une zone salée entourant la sebkha, qui est le fond humide de la dépression (Dubost, 2002). Le mot 'sebkha', est issu de l'arabe, désigne des dépressions fermées en forme de cuvette, périodiquement à inondation temporaire, sans végétation dans lesquelles se produit une accumulation de sel. Quant au terme de Chott, il représente seulement l'auréole plus ou moins large qui entoure la sebkha (Romanescu *et al.*, 2013). En effet, ces dépressions salées représentent un système évaporatoire temporaire et leur formation est généralement contrôlée en grande partie par les précipitations (incluant les rivières et les apports de surface) et l'eau souterraine, l'évaporation et la température où elles deviennent éphémères pendant les périodes tempérées à chaudes (Bryant et Rainey, 2002).

L'Algérie compte un nombre important de Chotts et Sebkhas, et leurs répartitions géographiques est très étendue (Figure 2). Ils se situent entre les deux Atlas, 'Atlas Tellien au nord, l'Atlas Saharien au sud' et Erg Occidental et Erg Oriental d'Est en Ouest, on trouve le complexe des Chotts de Oum El Bouaghi dans l'Est des hauts plateaux, le Chott Hodna, le Zahres Chergui et Gherbi au centre et Chott Chergui, sebkha de Naâma à l'Ouest ; la sebkha d'Oran et les salines d'Arzew dans les plaines littorales. Au Sahara septentrional, on compte le Grand Erg Oriental, au nord-est du Sahara le Chott Melghir et le Chott Merouane. Vers le Sud, dans la région d'Ouargla, sont les Chotts d'Ain Beida, Oum Raneb, Sidi Amrane et Safioune. D'autres sont situées dans la zone du Grand Erg Occidental, comme la Sebkha El Melah (Ghardaïa). Ces zones consistent en un éco-complexe dont son fonctionnement écologique est important du point de vue écologique et socio-économique.

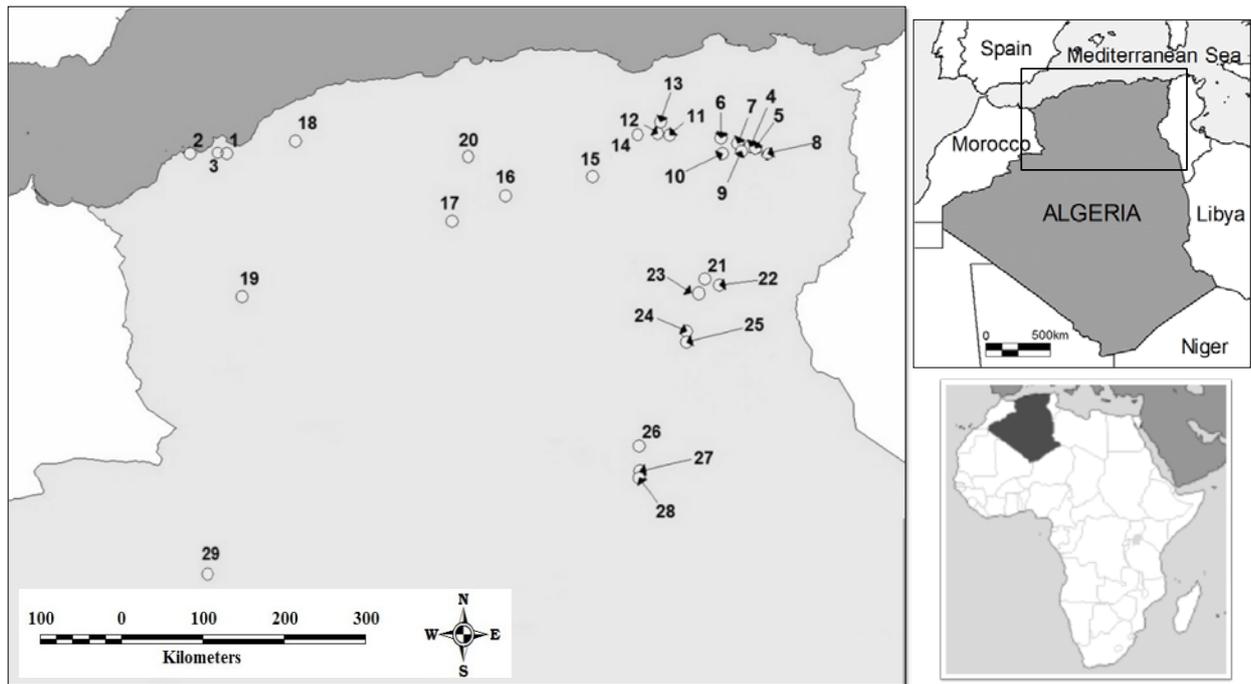


Figure 2. Situation géographique des Chotts et Sebkhass en Algérie (liste non exhaustive).

1. Salines d'Arzew, 2. Sebkhass d'Oran, 3. Lac Téllamine, 4. Garaet Ank Djmel, 5. Garaet Guellif, 6. Sebkhass Ezzeemoul, 7. Garaet Merhsel, 8. Garaet Tarf, 9. Chott Tinsilt, 10. Chott Boumia, 11. Chott ElBeidha Hammam Essoukhna, 12. Chott El Frain, 13. Sebkhass Bazzer, 14. Sebkhass El Hamiet, 15. Chott El Hodna, 16. Chott Zehrez Chergui, 17. Chott Zehrez Gherbi, 18. Sebkhass Sidi Bouziane, 19. Chott Chergui, 20. Sebkhass boughzoul, 21. Chott Melghir, 22. Chott Boudjloul, 23. Chott Merouane, 24. Chott Tindla, 25. Chott Sidi Amrrane, 26. Sebkhass Sefioune, 27. Chott Oum Raneb, 28. Chott Ain El Beida, 29. Sebkhass El Maleh. Adaptée de Demnati *et al.*, (2017).

2.3. Halophilisme et mécanisme d'adaptation

La différence d'osmolarité entre l'intérieur et l'extérieur d'une cellule génère une pression osmotique (choc hyperosmotique) sur la membrane plasmique conduisant à l'expulsion de l'eau et à la plasmolyse de la cellule. Afin de prévenir de tel phénomène et de faire face aux conditions de stress osmotique, les micro-organismes halophiles doivent garantir et maintenir un environnement intracellulaire au moins iso-osmotique avec le milieu extérieur et dans certains cas, même hyperosmotique lorsqu'une pression turgescente doit être maintenue (Oren, 2006a).

On appelle osmoadaptation ou la capacité des cellules à s'adapter aux variations extérieures de pression osmotique et osmorégulation ou halophilisme leur capacité à développer les mécanismes permettant de maintenir l'équilibre osmotique de la cellule et ajuster la pression osmotique par apport au milieu extracellulaire (Galinski, 1995).

Afin de compenser la perte d'eau induite par la pression osmotique, le transport actif de molécules d'eau vers l'intérieur de la cellule serait un processus énergétiquement irréalisable. A la place, l'osmorégulation des halophiles repose sur l'accumulation de petites molécules dans leur

cytoplasme (Roberts, 2005). Ces petites molécules, ou osmolytes, peuvent être de nature organique ou inorganique et selon leur nature, ces molécules seront impliquées dans deux stratégies distinctes développées chez les halophiles en milieux hypersalins : la première dite 'high salt-in', implique l'accumulation de sel à l'intérieur du cytoplasme, alors que la seconde consiste en la synthèse et l'accumulation de solutés organiques compatibles organiques dans le cytoplasme dite 'low salt-in' (Oren 2008).

2.3.1. Accumulation de sels 'Salt-in' ou 'high salt-in'

L'accumulation d'ions inorganiques dans le cytoplasme cellulaire permet de maintenir des concentrations salines intracellulaires extrêmement élevées (Oren, 2006b). Dans la plupart des cas, K^+ et Cl^- sont respectivement les ions majoritairement accumulés (Oren, 2008). Cependant, des cellules d'*Haloanaerobium praevalens* ont montré une grande variabilité et certaines cellules contenant de fortes concentrations de NaCl plutôt que du KCl (Oren *et al.*, 1997). Bien que cette stratégie soit énergétiquement moins coûteuse que la biosynthèse de solutés organiques, l'utilisation n'est pas répandue chez l'ensemble des halophiles (Roberts, 2005). Elle concerne les archées aérobies des ordres de la classe des *Halobacteria* (familles *Halobacteriales*, *Haloferacales* et *Natrialbales*), les bactéries du genre *Salinibacter* et d'autres bactéries anaérobies de l'ordre des *Halanaerobiales* (Oren, 2002 ; Oren, 2013).

La régulation de la concentration en ions est possible grâce à l'action coopérative de plusieurs protéines de transport 'pompes ioniques, transporteurs couplés ou autres' qui permettent les échanges bidirectionnels des molécules et d'ions. Ces différents échanges sont illustrés dans la Figure 3. Chez les halophiles, la force motrice utilisée pour le transport d'ions est une différence de potentiel formée de part et d'autre de la membrane grâce à : (i) la chaîne respiratoire, au niveau de laquelle le transport d'électrons est accompagné par l'extrusion des protons, (ii) à des protéines membranaires, 'les bactériorhodopsines ou halorhodopsine', qui grâce à leur pigment rétinol, et sous l'effet de la lumière peuvent aussi être utilisées pour la génération d'un gradient de protons, ou encore (iii) par l'utilisation des ATP synthases fonctionnant contre le gradient protons H^+ où elle entraîne la formation d'ATP.

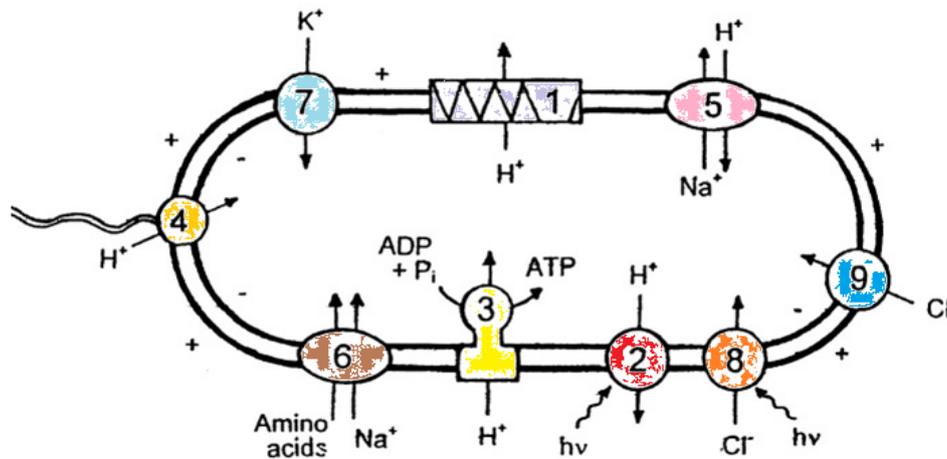


Figure 3. Transport cellulaire des ions et acides aminés chez les archées aérobies halophiles (Salt in stratégie) (Oren, 2006a).

1. Extrusion de protons via transport d'électrons respiratoire ; 2. Extrusion de protons induite par la lumière de la bactériorhodopsine ; 3. Formation d'ATP par l'ATP synthase, entraînée par le gradient de proton. 4. Moteur flagellaire entraîné par gradient de protons ; 5. Antiport sodium / proton électrogénique ; 6. Transport interne des acides aminés induit par le gradient de sodium, 7. Potassium uniport, entraîné par le potentiel membranaire, 8. Pompe de chlorure entraînée par la lumière, à médiation par l'halorhodopsine ; 9. Système de transport de chlorure indépendant de la lumière, éventuellement associé au transport de sodium vers l'intérieur.

A des concentrations en sel élevées, le flux des ions Na^+ diffuse vers l'espace extracellulaire à l'aide de l'échangeur Na^+/H^+ . Le Na extracellulaire peut également être utilisé pour permettre l'import de différentes substances organiques telles que les acides aminés. L'export de Na^+ via l'échangeur Na^+/H^+ est compensé par l'entrée à travers la membrane d'ions K^+ , ce qui permet le maintien de l'électroneutralité (Oren, 2006a).

La concentration de sel intracellulaire des halophiles extrêmes s'est avérée extrêmement élevée, où les ions K^+ s'accumulent à l'intérieur jusqu'à 5M (Roberts, 2005). De ce fait, la machinerie enzymatique intracellulaire est contrainte de s'adapter à la forte concentration saline afin de conserver la conformation et l'activité biologique des protéines (stables, actives) et assurer ainsi la survie cellulaire. Elles sont en ce sens qualifiées de protéines halophiles (Madern *et al.*, 2000).

A cause de toutes ces adaptations, les halophiles extrêmes ne peuvent pas survivre et les protéines pourront se dénaturer, à de plus faibles forces ioniques moins de 60 à 120 g/L de sels (Oren, 2008). Pour s'adapter à une forte concentration de KCl intracellulaire, les halophiles présentent un protéome acide et moins hydrophobe que d'autres organismes non halophiles. Les protéines halophiles possèdent un grand nombre de résidus acides, aspartate (Asp), glutamate (Glu), et peu de résidus basiques, lysine (Lys), arginine (Arg), des résidus hydrophobes méthionine (Met), leucine (Ieu), et isoleucine (Ile), et de cystéine (Cys), permettant une

flexibilité des protéines plus importantes dans les milieux hypersalins (Paul *et al.*, 2008). Le séquençage du génome et l'analyse du protéome des archées halophiles ont montré qu'ils contenaient une proportion excessive d'acides aminés acides que basiques, caractéristique susceptible d'être nécessaire à l'activité protéique à forte salinité (Joo et Kim, 2005 ; DasSarma, 2006). En effet, Paul *et al.* (2008) ont montré que les groupements carboxyliques (COO⁻) des résidus acides sont utilisés pour séquestrer, organiser et arranger un réseau étroit d'H₂O et d'ions K⁺ hydratés à la surface des protéines garantissant ainsi la solubilité de ces derniers (Figure 4).

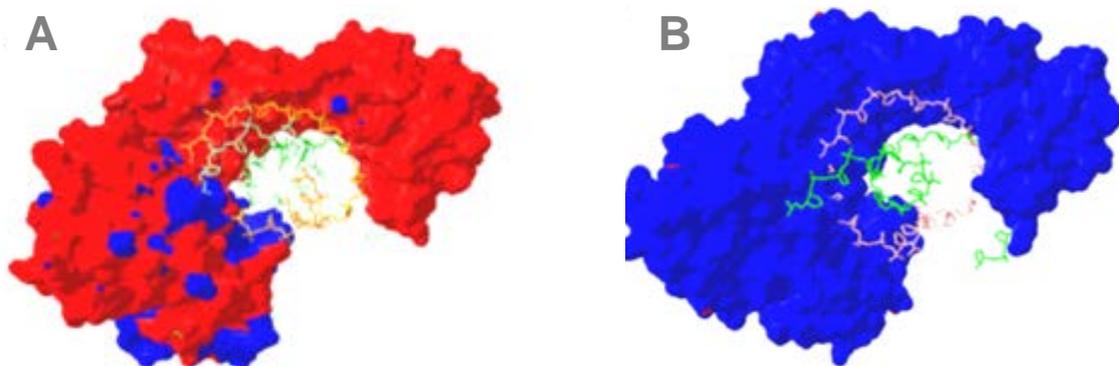


Figure 4. Complexe opérationnelle d'initiation de la transcription (Bending protein-ADN) chez l'archée halophile extrême *Halobacterium* sp. NRC-1 (A) et l'être humain (B). Adapté de DasSarma et DasSarma, (2017).

Le modèle montre les charges de surface de la protéine (rouge pour acide ou négatif et bleu pour basique ou positif), entourant la double hélice de l'ADN.

2.3.2. Synthèse et accumulation de solutés compatibles 'Salt-out ou low salt-in'

Cette stratégie permet le maintien de l'équilibre osmotique chez des espèces halophiles qui appartiennent aux trois domaines du vivant ; les bactéries halophiles modérées et extrêmes, les archées méthanogènes, les levures, les champignons et les algues (DasSarma, 2006 ; Oren 2008). Ce mécanisme met en œuvre des solutés compatibles, soit par import à partir du milieu extracellulaire, soit par synthèse endogène (Ventosa *et al.*, 1998). Il est basé sur la conservation d'une faible concentration ionique intracellulaire d'ions K⁺ et Cl⁻, grâce à un transport actif empêchant ainsi l'agrégation des protéines. Ces solutés sont des molécules organiques, polaires, de faible poids moléculaire, hautement solubles dans l'eau à de fortes concentrations et dont la plupart ne possèdent pas de charges nettes (zwitterions ou composés non chargés neutres) (Roberts, 2005).

Dans le cytoplasme, les solutés accumulés n'interfèrent pas avec les protéines et les réactions enzymatiques. Ces composés agissent en augmentant la tension superficielle de l'eau en formant à

la surface des protéines un maillage épais duquel les solutés compatibles sont exclus (Santos et Da Costa, 2002).

La plupart des cellules utilisent différents solutés organiques plutôt qu'un système basé sur un seul composé organique (Müller et Oren, 2003). Une variété remarquable de solutés compatibles utilisés au maintien cellulaire qui peuvent être des acides aminés et dérivés d'acides aminés (proline, acide glutamique, glutamine, acide aminobutyrique, glycine bêtaïne, éctoïne), des sucres (saccharose, tréhalose), des dérivés de sucres (sulfotréhalose, glucosylglycérol), ou encore des polyols (glycérol, arabitol, mannitol) (Figure 5). L'ectoïne est synthétisée par une grande variété de micro-organismes halophiles et halotolérants comme les cyanobactéries, les bactéries aérobies hétérotrophes et les archées méthanogènes, tandis que la glycine bêtaïne est synthétisée exclusivement par des procaryotes photosynthétiques et accumulée à partir du milieu par des bactéries hétérotrophes (Roberts, 2005).

La concentration intracellulaire des solutés organiques étant régulée en fonction de la salinité du milieu extérieur et l'utilisation de cette stratégie d'osmorégulation permet une grande flexibilité d'adaptation à une large gamme de concentrations salines avec une adaptation rapide aux changements de salinité du milieu extérieur (Oren, 2006a). Grâce à l'effet protecteur des solutés compatibles, la stabilité remarquable de la structure protéique permet d'augmenter la tolérance des microorganismes halophiles vis-à-vis du sel qui peut atteindre des concentrations extrêmes (250 g/l de NaCl) (Ventosa *et al.*, 1998).

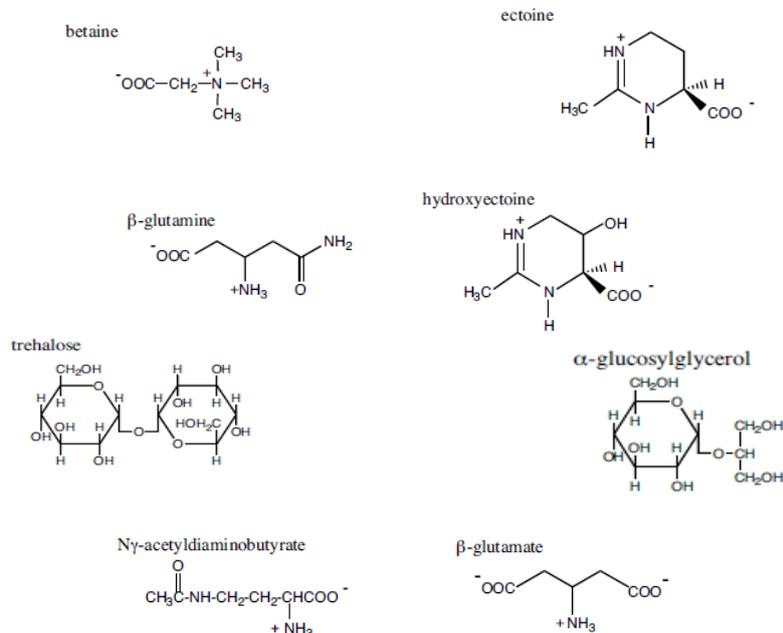


Figure 5. Exemples de quelques solutés compatibles (Roberts, 2005).

2.4. Microorganismes halophiles

De nombreux microorganismes, procaryotes comme eucaryotes, ont appris à faire face à la présence de fortes concentrations de sels dans leur environnement. En effet, les écosystèmes salés dont les concentrations de sel approchent de la saturation, peuvent être habités par des communautés denses et différentes de microorganismes halophiles et halotolérants (Oren, 2004). Ces microorganismes halophiles peuvent être trouvés dans chacun des trois domaines de la vie : *Archaea*, *Bacteria* et *Eucarya* (Figure 6). Cependant, la plupart des halophiles sont des représentants procaryotes (Ventosa *et al.*, 2005).

Par définition, un organisme halophile est un organisme qui tolère ou a besoin de sel pour sa croissance. Il convient de rappeler qu'il existe un continuum de concentrations de sel ; plus faibles, optimales et maximales pour la croissance que l'on trouve dans le monde microbien, et que, par conséquent, toutes les classifications de micro-organismes en fonction de leurs exigences et de leur tolérance au sel sont dans une large mesure arbitraires (DasSarma, 2006). La classification la plus largement adoptée est celle proposée par Kushner en 1978 et qui a été légèrement modifiée par la suite (de la Haba *et al.*, 2011a) où deux types d'halophilie sont à distinguer parmi l'ensemble des microorganismes halophiles (halophilie strict ou obligatoire et l'halophilie simple ou halotolérance) :

- **Non-halophile** : Prolifération optimale dans un milieu contenant moins de 1% de sel.
- **Halotolérant** : Non halophiles qui tolère des concentrations modérées de NaCl mais non obligatoire pour sa croissance (halotolérants extrêmes si la concentration en sel dépasse 15%)
- **Halophile faible** : Prolifération optimale dans un milieu contenant 1-3% de sel (la plupart des bactéries marines).
- **Halophile modéré** : Prolifération optimale dans un milieu contenant 3-15 % de sel.
- **Halophile extrême** : Prolifération optimale dans un milieu additionné à plus de 15% de sel.

dans des niches écologiques inattendues où la concentration en sels est très faible (4-6%) (*Haladaptatus paucihalophilus* et *Haloferax sulfurifontis*) et qui sont donc considérés comme halophiles modérés (Elshahed *et al.*, 2004 ; Savage *et al.*, 2007). D'autres études sur le tractus gastro-intestinal humain ont suggéré que de nouvelles espèces similaires au haloarchaea pourraient être isoler (Oxley *et al.*, 2010).

La découverte de nouveaux genres et espèces parmi les halophiles extrêmes de la classe des *Halobacteria* est en pleine expansion (Amoozegar *et al.*, 2017). En effet, l'analyse des données issues du séquençage des génomes a permis d'affiner les données taxonomiques des archées halophiles et de définir 3 ordres au sein de la classe des *Halobacteria*: les *Halobacteriales*, les *Haloferacales* et les *Natrialbales* divisées en six familles, 55 genres (Tableau 1) et plus de 230 espèces clairement définies et validées par le Comité International de Systématique des Procaryotes (Gupta *et al.*, 2015; LPSN, mai 2019) et très récemment de nouveaux genres ont été isolés (*Halomicrococcus* et *Halococcoides*) (Chen *et al.*, 2019; Sorokin *et al.*, 2019) . Des espèces halophiles et halotolérantes ont également été identifiées dans la classe des *Methanomicrobia*. Il s'agit d'archées méthanogènes, appartenant à la famille *Methanosarcinaceae* (Oren, 2014).

Certaines espèces d'halobactéries se caractérisent par la présence d'une chromoprotéine membranaire rouge orangé du type caroténoïde (bactériorhodopsine) qui joue le rôle d'une pompe à protons transmembranaire photo-dépendante et piloter la synthèse de l'adénosine triphosphate (ATP) (Lanyi, 2004). Les BRs sont initialement identifiées chez *Halobacterium salinarum* composées d'une fraction protéique, une bactériopsine et un chromophore (photopigment), le rétinol, responsable de la couleur rouge des saumures (Oren, 2002). Elles sont induites par une faible tension en oxygène et une intensité lumineuse élevée.

Les différentes familles clustrent des cellules présentant une forme de coques ou de bâtonnets (*Halococcus*, *Halobacterium*), des cellules pléomorphes (*Haloferax*, *Halorubrum*), et même parfois des forme atypique comme c'est le cas pour l'archée carré *Haloquadratum* sp. (Bolhuis *et al.*, 2006 ; Oren, 2006b). Parmi les archées halophiles, certaines sont alcalophiles (espèces appartenant aux genres *Natronobacterium*, *Natronorubrum* et *Natromonas*), d'autres acidophiles (*Halarchaeum acidiphilum*) (Minegishi *et al.*, 2010), d'autres encore psychrotolérantes (*Halorubrum lacusprofundi*) (Oren, 2006b). La concentration de sel intracellulaire d'haloarchaea s'est avérée extrêmement élevée, avec accumulation intracellulaire d'ions K^+ (Roberts, 2005). De plus, la teneur en ions Na^+ semble se situer dans le rang d'un mol, bien que le rapport K^+ / Na^+ du cytoplasme soit élevé. Le gradient K^+ est maintenu par la combinaison d'un antiport Na^+/H^+ et de deux uniport K^+ (Oren, 2002).

Tableau 1. Classification phylogénétique des archées halophiles Classe ‘*Halobacteria*’ (LPSN, mai 2019).

Phylum	<i>"Euryarchaeota"</i>					
Classe	<i>Halobacteria</i>					
Ordre	<i>Haloferacales</i>		<i>Halobacteriales</i>			<i>Natrialbales</i>
Famille	<i>Halorubraceae</i>	<i>Haloferacaceae</i>	<i>Halobacteriaceae</i>	<i>Halococcaceae</i>	<i>Haloarculaceae</i>	<i>Natrialbaceae</i>
	<i>Halobaculum</i>	<i>Halobellus</i>	<i>Haladaptatus</i>	<i>Halococcus</i>	<i>Halapricum</i>	<i>Halobiforma</i>
	<i>Halogranum</i>	<i>Haloferax</i>	<i>Halalkalicoccus</i>		<i>Haloarcula</i>	<i>Halopiger</i>
	<i>Halohasta</i>	<i>Halogeometricum</i>	<i>Halanaeroarchaeum</i>		<i>Halomicroarcula</i>	<i>Halostagnicola</i>
	<i>Halolamina</i>	<i>Haloparvum</i>	<i>Halarchaeum</i>		<i>Halomicrobium</i>	<i>Haloterrigena</i>
	<i>Halonotius</i>	<i>Halopelagius</i>	<i>Haloarchaeobius</i>		<i>Halorhabdus</i>	<i>Halovivax</i>
	<i>Halopenitus</i>	<i>Haloplanus</i>	<i>Halobacterium</i>		<i>Halorientalis</i>	<i>Natrialba</i>
	<i>Halorubrum</i>	<i>Haloprofundus</i>	<i>Halobium</i>		<i>Halosimplex</i>	<i>Natrinema</i>
		<i>Haloquadratum</i>	<i>Halodesulfurarchaeum</i>			<i>Natronobacterium</i>
		<i>Halosarcina</i>	<i>Halomarina</i>			<i>Natronococcus</i>
Genre			<i>Halorubellus</i>			<i>Natronolimnobius</i>
			<i>Halorussus</i>			<i>Natronorubrum</i>
			<i>Halosiccatus</i>			<i>Salinarchaeum</i>
			<i>Halostella</i>			
			<i>Halovarius</i>			
			<i>Halovenus</i>			
			<i>Natribaculum</i>			
			<i>Natronoarchaeum</i>			
			<i>Natronomonas</i>			
			<i>Salarchaeum</i>			
			<i>Salinirubrum</i>			
			<i>Salinirussus</i>			

b. Bactéries halophiles

Le domaine *Bacteria* regroupe la plus grande diversité des halophiles qui sont majoritairement représentés par des espèces halotolérantes et halophiles modérées que des halophiles extrêmes (Anton *et al.*, 2002). Elles sont identifiées dans de nombreux phyla répartissant dans un grand nombre de groupes phylogénétiques très hétérogènes : *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Gammaproteobacteria* et *Spirochaetes* (de la Haba *et al.*, 2011). Toutefois, la plupart des bactéries halophiles modérées pouvant être aussi bien à Gram positif, qu'à Gram négatif, hétérotrophes, aérobies ou anaérobies facultatives.

Les actinobactéries constituent l'un des principaux groupes du domaine *Bacteria* (Subramani, et Sipkema, 2019) dont une diversité phylogénique spécifique très hétérogène des actinobactéries halophiles a été décrite et classée dans diverses familles et divers genres (de la Haba *et al.*, 2011) à savoir *Actinopolyspora*, *Nocardiopsis*, *Streptomonospora*, *Haloactinospora*, *Salinactinospora*, *Thermobifida*, *Saccharopolyspora*, *Saccharomonospora*, *Prauserella*, *Haloechothrix* et *Yuhushiella*. Ces bactéries sont largement distribuées dans différents habitats tels que les déserts, les marais salants, les mines salées, les sols salés, les lacs hypersalés et les étangs. En outre, de nombreuses espèces d'actinobactéries halophiles et surtout halotolérantes ont été citées dans la littérature à titre d'exemple les espèces halophiles du genre *Amycolatopsis*, *Micromonospora*, *Haloactinopolyspora*, *Haloglycomyces*, ainsi que *Glycomyces* (Tang *et al.*, 2010 ; Guan *et al.*, 2011 ; Mohammed *et al.*, 2018).

Seulement un petit nombre de bactéries sont halophiles extrêmes, elles sont représentées essentiellement par le genre *Salinibacter* et l'espèce *Salinibacter ruber* du phylum des *Bacteroidetes* (Antón *et al.*, 2002). Cet organisme partage beaucoup de caractéristiques avec ses homologues archéens halophiles colonisant les mêmes habitats hypersalins, où il requiert une concentration en sels aussi élevée que l'archée la plus halophile (croissance optimale à une concentration saline de 200-300 g/l). En effet, *Salinibacter ruber* présente de nombreux pigments rétinien de type bacteriorubérine, et utilise le même mécanisme d'accumulation de KCl (stratégie « salt-in ») que les archées halophiles aérobies pour maintenir l'équilibre osmotique intracellulaire (Antón *et al.*, 2008).

Les cyanobactéries représentent une part importante du biote phototrophique des environnements hypersalins dont plusieurs espèces halotolérantes et halophiles extrêmes, unicellulaires ou filamenteuses ont été parfois isolées de la surface de sédiments des milieux hypersalés où elles forment des tapis microbiens. Il s'agit surtout de cyanobactéries et de bactéries anoxygéniques pourpres.

La majorité des isolats de bactéries pourpres ont été décrits comme des *Ectothiorhodospira*, *Rhodospirillum*, *Chromatium* et *Thiocapsa* (Oren, 2015). Les espèces de cyanobactéries filamenteuses les plus souvent retrouvées dans les milieux hypersalins sont *Microcoleus chthonoplastes* et *Halospirulina tapeticola*. Les cyanobactéries sont une composante caractéristique du microbiote des lacs salés et aux plus hautes salinités, des espèces unicellulaires ‘*Aphanothece halophytica*’ et d’autres filamenteuses, comme *Phormidium*, *Oscillatoria*, *Microcoleus*, *Spirulina* et *Nodularia* sont retrouvés dans des sédiments peu profonds des Lac Salés (Seckbach et Oren, 2007).

Le phylum *Proteobacteria* regroupe cinq classes majeurs (*Alpha*, *Beta*, *Gamma*, *Delta*, *Epsilon*) (Garrity *et al.*, 2006). Les microorganismes appartenant à ce phylum sont très ubiquitaires et hétérogènes, avec des propriétés physiologiques diverses, et à l’exception de la classe *Betaproteobacteria*, toutes les autres classes incluent les bactéries halophiles (de la Haba *et al.*, 2011). La classe *Gammaproteobacteria* regroupe le plus grand nombre de genres et d’espèces modérément halophiles. La famille *Halomonadaceae* est la plus importante en nombre d’espèces halophiles et certains de ses représentants comptent parmi les bactéries halophiles extrêmes (Ventosa *et al.*, 1998 ; de la Haba *et al.*, 2011). Une diversité phylogénique remarquable des *Halomonadaceae* halophiles a été décrite et divers genres ont été identifiés dont le genre *Halomonas* qui présentent le groupe majeur des bactéries halophiles comptant plus de 102 espèces validées (LPSN, mai 2019). D’autres genres de cette famille présentent des espèces halophiles et halotolérantes à savoir *Aidingimonas*, *Carnimonas*, *Chromohalobacter*, *Cobetia*, *Kushneria*, *Modicisalibacter* et *Salinicola* (de la Haba *et al.*, 2011). Des membres de la famille *Halomonadaceae* ont été isolés des habitats très différents, tels que les eaux marines, les lacs hypersalins et / ou alcalins, les sols salins, les salines solaires, les environnements hydrothermaux, les eaux usées, les champs de pétrole, les aliments, les plantes etc. (Kim *et al.*, 2010). De plus d’autres familles à savoir *Oceanospirillaceae*, *Alteromonadaceae* contiennent d’autres membres des halophiles et halotolérants (*Alcanivorax*, *Nitrincola*, *Oleispira*, *Saccharospirillum*, *Salicola* et *Halovibrio*).

Les membres du phylum *Firmicutes* ont une morphologie et une physiologie très diverses, pouvant habiter une grande variété d’environnements, tels que les habitats hypersalins. Au sein de ce phylum, les classes *Bacilli* et *Clostridia* ont un grand nombre d’espèces halophiles isolées de différents environnements salins et hypersalins. Les halophiles sont trouvés majoritairement dans la famille des *Bacillaceae* avec 21 genres incluant des espèces halophiles obligatoires (de la Haba *et al.*, 2011) dont *Bacillus*, *Halobacillus*, *Lentibacillus*, *Oceanobacillus* et *Virgibacillus* sont les genres les plus importants. Au sein de la famille des *Bacillaceae*, de nombreux genres ne

contiennent qu'une ou quelques espèces modérément halophiles et la majorité d'entre elles ont été décrites sur la base d'une seule souche. A titre d'exemple : *Aquisalibacillus*, *Filobacillus*, *Halalkalibacillus*, *Halolactibacillus*, *Ornithinibacillus*, *Paraliobacillus*, *Sediminibacillus* et *Thalassobacillus*. Ces organismes halophiles ont été isolés de divers environnements salins et / ou alcalins et certains d'entre eux montrent donc une réponse non seulement halophile mais également alcaliphile (Aino *et al.*, 2008). Les micro-organismes halophiles anaérobies appartiennent à la classe *Clostridia*, l'ordre *Halanaerobiales* qui comprend deux familles les *Halanaerobiaceae* et les *Halobacteroidaceae* (Oren, 2004).

2.4.2. Eucaryotes halophiles

Dans le domaine *Eukarya*, les microorganismes halophiles sont rares. En fait, parmi les eucaryotes halophiles, on retrouve des microorganismes comme des champignons et des algues (Oren, 2002). La plupart des eucaryotes halophiles sont des halophiles modérés ou des halotolérants, mais quelques espèces halophiles extrêmes ont été identifiées (Oren, 2004). On peut distinguer les champignons filamenteux du genre *Hortaea*, *Wallemia* et *Aureobasidium*, la levure *Debaryomyces* et des algues du genre *Dunaliella* et *Asteromonas* (Oren, 2008). En outre, le seul microorganisme eucaryote d'importance, et presque omniprésent dans la plupart d'environnements hypersalins est l'algue verte '*Dunaliella*' qui présente le principal ou l'unique producteur primaire des lacs et étangs hypersalins (Oren, 2011). Il existe différentes espèces de *Dunaliella* et certaines synthétisent de grandes quantités de β -carotène, une propriété exploitée dans le cadre biotechnologique.

3. APPLICATIONS BIOTECHNOLOGIQUES DES HALOPHILES

Les microorganismes halophiles (bactéries et archées) sont capables de survivre dans des environnements variés à de fortes concentrations en sel comme les lacs salés, sols salés et d'autres niches écologiques hypersalines (Oren, 2014). Grâce à leur métabolisme original et leur capacité à évoluer dans ces environnements extrêmes hypersalins, les halophiles produisent des métabolites uniques qui peuvent être exploités pour des fins biotechnologiques comme : les biopolymères, les enzymes hydrolytiques, les solutés compatibles, les antioxydants, les peptides antimicrobiens, et autres.

3.1. Polyhydroxyalkanoates et exopolysaccharides

Deux types de biopolymères sont synthétisés naturellement par les bactéries et archées halophiles qui offrent de nombreuses opportunités en termes d'applications biotechnologiques, les polyhydroxyalkanoates (PHA) et les exopolysaccharides (EPS) (Charlesworth et Burns 2015).

Les PHA qui sont des polyesters biodégradables composés d'acides gras hydroxylés, sont synthétisés et stockés sous forme d'inclusions lipidiques intracellulaires et utilisés par la cellule en tant que moyen de réserve et source de carbone et d'énergie (Reddy *et al.*, 2003). Les PHA sont produits par différentes bactéries halophiles (*Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Cobetia*, *Kushneria*, *Marinobacter* et *Planomicrobium*) et archées appartenant aux genres *Haloferax*, *Haloarcula*, *Natrialba*, *Haloterrigena*, *Halococcus*, et *Halobacterium* (Quillaguamán *et al.*, 2010 ; Martinez-Gutierrez *et al.*, 2018)

Les PHA sont dotés de nombreuses propriétés thermoplastiques et biocompatibles, biorésorbables et biodégradables, apparaissent comme des candidats prometteurs pour offrir une alternative aux polymères thermoplastiques issus de la pétrochimie (Reddy *et al.*, 2003). En tant que matériau biocompatible, les PHA sont capables d'assurer une fonction avec une réponse appropriée et sans effets indésirables sur l'environnement biologique dans lequel il est appelé à fonctionner pour des applications allant des films d'emballage biodégradables aux matériaux de structure utilisés en médecine tels que les valves cardiaques, les implants osseux, génie tissulaire et les systèmes d'administration de médicaments etc. (Poli *et al.*, 2011). Malgré le potentiel évident que ces microorganismes halophile peuvent avoir en tant que producteurs potentiel de PHA, aucune tentative n'a encore été faite pour utiliser ces organismes dans une production de plastiques biodégradables à l'échelle pilote commercialisée.

Autre polymère, les exopolysaccharides (EPS) sont des glucides de haut poids moléculaires sécrétés dans le milieu et constituent une composante importante des polymères extracellulaires entourant la plupart des cellules bactériennes et d'archées (Quesada *et al.*, 2004). Ils peuvent être

étroitement associés à leur surface sous forme de capsule ou bien être largués dans l'environnement. Ces composés jouent généralement un grand nombre de fonctions biologiques, notamment la prévention de la dessiccation, la protection contre les agressions environnementales, l'adhérence aux surfaces. En outre, l'EPS peut séquestrer les substances nutritives de l'environnement, faciliter la formation de biofilms et empêcher l'accès des agents antimicrobiens (Nwodo *et al.*, 2012). La production d'EPS par les halophiles a été étudiée surtout chez les bactéries que chez les archées (Poli *et al.*, 2011). Parmi les bactéries halophiles, les principaux producteurs d'EPS, sont des espèces appartenant aux familles d'*Halomonadaceae* et *Alteromonadaceae*, l'espèce type des genres *Salipiger*, *Palleronia* et la cyanobactérie halophile *Aphanotece halophytica*. Parmi ces polymères on citera notamment : le mauran, produit par *Halomonas maura*, les polymères produits par *Halomonas eurihalina*, qui gélifient à pH acide et ont un pouvoir émulsifiant élevé ; les EPS produit par *Halomonas ventosae*, *Halomonas anticariensis*, *Idiomarina fontislapidosi*, *Idiomarina ramblicola* et *Alteromonas hispanica*, qui ont des propriétés émulsionnantes d'un grand intérêt industriel dans les domaines de la cosmétique et de l'alimentation (Quesada *et al.*, 2004). La pluparts des EPS produits par les bactéries halophiles ont en commun une forte teneur en sulfate, ce qui est inhabituel pour les EPS des procaryotes (Mata *et al.*, 2006). Plusieurs souches productrices d'EPS parmi les genres d'archées halophiles ont été décrites (*Haloferax*, *Haloarcula*, *Halococcus*, *Natronococcus* et *Halobacterium* (Poli *et al.*, 2011).

Ces molécules ont de nombreuses applications environnementales, biotechnologiques, cliniques et industrielles, en particulier dans l'industrie alimentaire en tant qu'agents gélifiants ou émulsifiants (Lyer *et al.*, 2006), confèrent des propriétés immunostimulantes, antitumorales et anti-inflammatoires (Fanning *et al.*, 2012). La pollution par les métaux lourds représente un véritable problème environnemental en raison de leur toxicité élevée. De ce fait, la détoxification (biosorption) des métaux par l'intermédiaire d'EPS représente une méthode de dépollution à faibles coûts et biologique alternative aux moyens chimiques. Puisque les halophiles qui exigent des concentrations élevées en sel pour leur croissance, leur utilisation est une alternative sûre pour éliminer les composés toxiques dans des milieux fortement concentrés en sel (Popescu et Dumitru, 2009).

3.2. Enzymes hydrolytiques

Très peu d'enzymes halophiles ont trouvé des applications en biotechnologie, en comparaison avec les enzymes des autres extrêmophiles. Les bactéries halophiles sont métaboliquement actives que les archées, et leurs activités enzymatiques sont plus diversifiées

(lipases, protéases, amylases, cellulases, nucléases...) (Oren, 2002). Ces enzymes sont de bons candidats pour des applications industrielles du fait de leur capacité d'activité en présence de fortes concentrations en sel, de tolérer des températures relativement élevées et des variations de pH etc. (Amoozegar *et al.*, 2017).

L'utilisation de ces molécules est particulièrement importante car elles sont caractérisées par des propriétés structurales spécifiques, une activité élevée, un large spectre d'utilisation, une spécificité de substrat et surtout une stabilité et une résistance à la dénaturation exceptionnelle conduisant à un maintien de leur fonctionnalité dans des conditions même défavorables. De plus, ces enzymes halophiles actives dans des milieux organiques peuvent être utilisées comme biocatalyseurs en présence de solvants organiques (Kumar *et al.*, 2011).

3.2.1. Lipases et estérases

Les enzymes hydrolysant les esters carboxyliques sont ubiquistes et ont été trouvées dans les trois domaines du vivant. Ces enzymes peuvent agir en tant qu'hydrolases qui catalysent l'hydrolyse des triglycérides en acides gras et en glycérol (Schreck et Grunden, 2014). Dans un solvant organique, elles peuvent catalyser la réaction inverse ou une trans-estérification. Ils sont largement utilisés comme biocatalyseurs en raison de leur capacité à produire des composés purs. Les estérases se distinguent des lipases par leur préférence pour les chaînes carbonées courtes. Elles ont trouvé de multiples applications dans les industries médicales, agroalimentaires, de production d'énergie, grâce à leurs propriétés en synthèse organique (d'arômes, de détergents et de biodiesel notamment) (Raddadi *et al.*, 2015).

Plusieurs études se sont intéressées à la production et à la caractérisation des lipases et d'estérases des archées halophiles, cependant l'intérêt biotechnologique de ces enzymes a été mieux étudié chez les bactéries halophiles (Ozcan *et al.*, 2009, Litchfiel, 2011). Des espèces appartenant aux genres *Marinobacter*, *Halomonas*, *Chromohalobacter* et *Geomicrobium* se sont révélées être de puissants producteurs de lipase (Kumar *et al.*, 2012). Jusqu'à présent, très peu de lipases halophiles ont été caractérisées, celles-ci proviennent de *Salicola* sp. IC10 (de Lourdes Moreno *et al.*, 2009), *Salinivibrio* sp. souche SA-2 (Amoozegar *et al.*, 2008), *Marinobacter lipolyticus* SM19 (Perez *et al.*, 2011) et *Bacillus atrophaeus* (Ameri *et al.*, 2015). Ces enzymes sont également actives sur les pNP-esters et présentent un intérêt pour la détoxification des pesticides. Des études ont permis d'isoler de nombreuses souches d'archées halophiles productrices de lipases appartenant à différents genres *d'Haloarcula*, *Natronococcus*, et *Halobacterium* (Boutaiba *et al.*, 2006 ; Ozcan *et al.*, 2009 ; Del Campo *et al.*, 2015). Ces enzymes présentent des activités optimales à des concentrations en NaCl de 30

à 300 g/l, de pH entre 8 et 9 et des températures de 40 à 60°C (Litchfield, 2011). Ces activités sont remarquablement bien conservées en présence de détergents, d'urée et de solvants organiques d'usage courant.

3.2.2. Amylases

Les enzymes de la famille des glycosylases, impliquées dans le métabolisme des glucides, revêtent un intérêt industriel important. En particulier, celles qui convertissent l'amidon sont fondamentales dans les procédés de production de biocarburants, textiles, l'alimentation et autres. Les halophiles constituent un gisement extrêmement varié d'enzymes intéressantes pour la dégradation de l'amidon : les amylases, glucoamylases et α -glucosidases (Dey *et al.*, 2016). Ces enzymes ont pour rôle de catalyser la dégradation des polymères d'amidon pour produire des dextrans et différents gluco-oligosaccharides (Saxena *et al.*, 2007). Les alpha-amylases de plusieurs espèces de bactéries appartenant aux genres (*Halobacillus*, *Halothermothrix*, *Marinobacter*, *Nesterenkonia* et *Thalassobacillus*) (Coronado *et al.*, 2000 ; Mijts et Patel, 2002; Amoozegar *et al.*, 2003 ; Santorelli *et al.*, 2016) et archées halophiles (*Haloferax*, *Haloarcula* et *Haloterrigena*) ont été caractérisées (Perez-Pomares *et al.*, 2003; Onodera *et al.*, 2013). Leurs conditions de production ont été optimisées et des activités maximales ont été obtenues pour des concentrations de 10-200 g/l de NaCl, de pH entre 7 et 8, et à des températures entre 50 et 60°C.

3.2.3. Protéases

Bien d'autres enzymes des halophiles sont intéressantes. Les protéases et haloprotéases, dont l'intérêt majeur réside dans leur grande stabilité et leur aptitude à fonctionner en présence de détergents et d'agents dénaturants. Ces enzymes sont de bons candidats pour une utilisation dans les processus industriels. Les protéases peuvent avoir une action spécifique, qui est à l'origine de leur exploitation et leur application biotechnologique (Litchfield, 2011). Ces enzymes sont utilisées dans les industries alimentaires, les produits laitiers, dans les industries de tannage de cuir, comme détergents et aussi pour la gestion des déchets (Karbalaeei-Heidari *et al.*, 2009).

Peu d'études ont été effectuées sur la caractérisation et l'identification des protéases extracellulaires chez les bactéries halophiles signalant à titre d'exemple des protéases des espèces d'*Halobacillus*, *Halomonas*, *Pseudoalteromonas* et *Salicola* (Moreno *et al.*, 2013) et archées halophiles comme celle des espèces appartenant aux genres *Halobacterium*, *Halogeometricum*, *Halorubrum* et *Natrialba* (D'Alessandro *et al.*, 2007 ; Elabana *et al.*, 2015 ; Dammak *et al.*, 2016). Ces études ont montré que ces protéases sont actives à des concentrations optimales de

NaCl proches de saturation. Des essais ont été réalisés visant à identifier les halophiles modérés des lacs hypersalins dont plusieurs espèces des genres *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Halobacterium*, *Virgibacillus*, *Thalassobacillus*, *Aeromonas* et *Salicola* présentant une activité protéolytique, et comparativement aux bactéries à Gram négatif, ces bactéries ont montré de fortes activités protéolytiques (Sanchez-Porro *et al.*, 2003 ; Ghasemi *et al.*, 2011).

3.3. Bactériorhodopsines

Les principaux photorécepteurs rencontrés chez les archées sont les bactériorhodopsines. Ce sont des protéines qui ont été découvertes chez les archées halophiles, au niveau de la membrane pourpre d'*Halbacterium salinarum* (Oesterhelt *et al.*, 1991).

Les bactériorhodopsines ont pour fonction essentielle la conversion photochimique et jouent un rôle de pompe à protons utilisant l'énergie lumineuse pour générer un gradient de protons à travers la membrane cellulaire (Oren, 2002). Un intérêt appliqué possible de la bactériorhodopsine réside dans la construction d'éléments bioélectroniques pour un stockage de données dans la mesure où elle pourrait servir d'unité de stockage extrêmement miniaturisée pilotable par des impulsions lumineuses, et dans la fabrication de biopuces (Oren, 2004). Une étude a montré qu'une légère modification de la séquence en acides aminés de la bactériorhodopsine entraîne une variété de nouveaux matériaux avec des propriétés optiques adaptées à des besoins particuliers, la reconnaissance de motifs halographiques et le stockage de données optiques (Hampp *et al.*, 2000).

3.4. Pigments caroténoïdes et antioxydants

La coloration rouge et orangée développée dans les environnements hypersalins est causée par des microorganismes halophiles riches en pigments caroténoïdes, notamment *Dunaliella*, riche en β -carotène, *Haloarchaea* (*Halobacterium salinarum*, *Halobaculum gomorense*, *Haloferax mediterranei* et *Haloarcula marismortui*), dont le pigment principal est la bactériuberine, et certaines bactéries halophiles, telles que *Salinibacter ruber*, riche en salinixanthine (Jehlička *et al.*, 2013).

Ces pigments sont fortement demandés en tant qu'agents anti-oxydants dans la lutte contre les espèces réactives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet et les radicaux libres (Squillaci *et al.*, 2017). Les caroténoïdes sont utilisés comme des agents de coloration ou additifs alimentaires. Les caroténoïdes les plus explorés sont le β -carotène, α -bactériuberin, xanthophylles, lycopene, l'astaxantine, la canthaxanthine et salinixanthine (Saini *et al.*, 2017). La plupart des caroténoïdes utilisés sont d'origine bactérienne (halophile ou non halophile), tandis que de nombreuses études

ont été effectuées sur les pigments des archées halophiles mais leurs applications biotechnologiques restent encore peu explorées (Rodrigo-Baños *et al.*, 2015). Par conséquent, les recherches sur la production de caroténoïdes à partir des halophiles pourrait considérée comme une source commerciale alternative.

3.5. Solutés compatibles

L'exclusion du sodium et la synthèse ou l'accumulation dans le cytoplasme de grande variété de composés organiques de faibles poids moléculaires (solutés compatibles) sont des réponses au stress hyper-osmotique adoptés par de nombreux microorganismes bactériens, mais aussi par des archées halophiles méthanogènes (Dassarma et Dassarma, 2017). Les mieux connus sont la glycine bêtaïne, les sucres simples tels que le sucrose et le tréhalose, et différents dérivés d'acides aminés (Roberts, 2005). Ils sont utilisés par de nombreux microorganismes halophiles et halotolérants tels que les cyanobactéries, les bactéries aérobies hétérotrophes et les archées méthanogènes.

Certains de ces solutés osmotiques ont trouvé des applications en biotechnologie. L'ectoïne (l'acide 1,4,5,6-tétrahydro-2-méthyle-4-pyrimidinecarboxylique) et l'hydroxyectoïne sont actuellement produits et commercialisés pour leur forte action stabilisante sur beaucoup d'enzymes labiles *in vitro* par augmentation de la durée de vie et de l'activité des préparations enzymatiques (Lentzen et Schwarz, 2006). Des solutés (notamment la bêtaïne, l'ectoïne) se sont révélés utiles pour l'amplification par PCR des séquences d'ADN riches en GC (T_m élevée) (Schnoor *et al.*, 2004). Cette fonction sert de base à la production commerciale d'ectoïne et l'hydroxyectoïne à partir d'*Halomonas elongata* et *Nocardiopsis halophila* (Shivanand et Mugeraya, 2011).

3.6. Substances bioactives et antimicrobiennes

En plus des enzymes, des recherches récentes indiquent que les halophiles peuvent produire une vaste gamme de petits peptides et de métabolites secondaires, qui pourraient présenter un intérêt considérable pour la biotechnologie ; les dicétopipérazines (DCPs) (Tommonaro *et al.*, 2012), les phénazines (Charlesworth et Burns, 2015), les lipopeptides, polyketides, terpènes, macrolactines (Auckloo et Wu, 2016), et les halocines et autres types de bactériocines (Kumar *et al.*, 2016). Les DCPs ont été identifiées chez plusieurs espèces de bactéries et actinomycètes halophiles appartenant aux genres (*Halobacillus*, *Actinopolyspora*, *Nocardiopsis*, *Salinispora*) et archées halophiles (*Haloterrigena*, *Natronococcus*) (Paggi *et al.*, 2003 ; Tommonaro *et al.*, 2012 ; Hamedí *et al.*, 2013). Elles sont produites par des voies enzymatiques 'synthétase' non

ribosomiques (NRPS) (Belin *et al.*, 2012). Les DCPs présentent une pléthore de bioactivités potentiellement importantes pour des utilités industrielles et médicales, notamment des activités antibactériennes, antifongiques et antivirales (Charlesworth et Burns, 2015) ainsi que des activités antitumorales. D'autres activités relatives à la physiologie humaine ont également été examinées (Martins and Carvalho, 2007). Elles sont capables d'activer ou d'inhiber les systèmes de détection du quorum-sensing des bactéries pour empêcher la croissance des biofilms exemple chez (*Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*) (Hentzer *et al.*, 2003; Raad *et al.*, 2007). Les archéocines sont des peptides antimicrobiens provenant d'archées largement répandues parmi les haloarchaea (appelées halocines) et plus récemment du genre *Sulfolobus* (sulfolobicines) (Shand et Leyva, 2007).

4. MÉTHODES D'ANALYSE EN ÉCOLOGIE MICROBIENNE

L'un des plus grands enjeux en écologie microbienne est de déterminer et estimer la diversité des populations bactériennes et archéennes d'un environnement. Le concept de diversité microbienne d'un écosystème donné comporte deux notions, la *richesse spécifique* et la *structure des espèces*. Pouvoir apprécier et /ou estimer la diversité des communautés microbiennes est un moyen pour suivre leur évolution dans leur environnement et cela permet de répondre à la question de la modulation de ces communautés microbiennes par les facteurs environnementaux (Fierer et Jackson, 2006). Plusieurs approches sont possibles afin d'étudier les différentes communautés microbiennes au sein d'un habitat, ainsi que le rôle de ces flores dans leur écosystème.

4.1 Approches microbiologiques classiques

Il est possible d'étudier la flore microbienne présente dans un milieu complexe en procédant à des étapes d'enrichissements et d'isolement sur milieux de culture ordinaires et spécifiques adaptés pour un type donné de microorganisme (cultivable) en fonction des conditions physiques et nutritionnelles du milieu préalablement identifiées (Kirk *et al.*, 2004). Ces approches ont pour principal avantage de pouvoir isoler des souches en particulier afin de pouvoir les étudier en culture pure par la suite (caractéristiques phénotypiques, physiologiques, capacités de synthèse, etc.). Donc, la plupart de nos connaissances sur les microorganismes proviennent d'études réalisées sur des cultures pures isolées de l'environnement (Hill *et al.*, 2000).

Néanmoins, ces méthodes présentent l'inconvénient majeur de ne pas rendre compte exhaustivement de la composition de la communauté microbienne présente dans un écosystème donné, et un certain facteur aléatoire demeure du fait des conditions de culture spécifiques nécessaires à de nombreuses flores en particulier pour l'étape de culture (pH, température, métabolisme, type respiratoire, etc.) (Elis *et al.*, 2003). L'utilisation des milieux de cultures pour étudier la composition microbienne fait l'objet d'important débats (Hill *et al.*, 2000). Même si ces méthodes donnent des résultats peu représentatifs des communautés, elles sont toujours utilisées afin d'étudier la contribution écologique de certaines espèces ou groupes particuliers de populations microbiennes (Pham et Kim, 2012).

4.2. Méthodes moléculaires et analyse génétique des populations microbiennes

Une analyse plus fine de la diversité des espèces composant les communautés microbiennes du sol est possible grâce aux méthodes de séquençage. L'ADN génomique

obtenu est analysé soit par amplification directe (PCR) et ciblée sur des gènes sélectionnés pour leur intérêt en analyse taxonomique (gène ADNr 16S) ou pour des fonctions écologiques particulières, soit par clonage dans un hôte cultivable avant sélection des clones d'intérêt. Ces approches ont permis la caractérisation de l'abondance, de la structure et de la diversité des communautés microbiennes dans de multiples environnements (Theron et Cloette, 2000). Avec le développement de ces moyens dits « d'écologie moléculaire », le nombre d'études portant sur la caractérisation des communautés microbiennes dans divers environnements a augmenté de façon exponentielle.

4.2.1. Clonage moléculaire et séquençage

Les premières techniques à avoir été employées en écologie microbienne pour s'affranchir de toute étape de culture, appelées clonage-séquençage. Ces méthodes consistent à amplifier sélectivement des séquences d'ADN cibles (gènes codant pour l'ARN ribosomique) à l'aide d'amorces universelles, pour les intégrer ensuite dans des clones à l'aide de vecteurs de clonage (Kirk *et al.*, 2004). Les inserts pourront ensuite être séquencés et analysés suite à une comparaison à des séquences répertoriées dans des bases de données (NCBI, RDP, etc.). Ces techniques offrent une haute résolution phylogénétique permettant l'identification des espèces présentes au sein d'une communauté (Nocker *et al.*, 2007), mais elle se limite généralement au séquençage d'un faible nombre de clones (environ 100 clones par échantillon) sur un faible nombre d'échantillons et ne permet donc pas d'estimer réellement la diversité microbienne.

4.2.2. Techniques d'empreintes moléculaires (Fingerprinting)

L'utilisation de la biologie moléculaire dans l'étude de la microflore et la microbiologie environnementale en générale, a amené des changements considérables, apportant un large éventail de techniques. Ces méthodes ont permis d'élargir les champs d'investigations ainsi l'horizon des connaissances, contribuant à une vision différente sur les communautés microbiennes qui habitent différents écosystèmes naturels (Torsvik et Øvreås, 2002). La possibilité de détecter un marqueur moléculaire cible (ubiquitaire et porteur de variabilité taxonomique), a permis de s'abstraire de l'obligation d'utiliser les techniques conventionnelles de mise en culture des microorganismes (Nocker *et al.*, 2007). Une des objections majeures est le fait que d'une part, ces techniques ne font pas la différence entre l'ADN des cellules viables ou mortes, or, seules les cellules viables sont d'intérêt. Et d'autre part, seules les flores

majoritaires seront mises en évidence (ces méthodes étant qualifiées de semi-quantitatives) (Rowe *et al.*, 2017).

Les approches de la biologie moléculaire permettent de rendre compte plus exhaustivement d'une population microbienne complexe en utilisant des techniques de génotypages ou l'empreinte (fingerprint) des gènes ciblés. Par la suite les amplifiants sont traités de façon à pouvoir être distingués, illustrant ainsi la diversité sous forme d'un profil, à l'échelle de la communauté microbienne totale (Torsvik et Øvreås, 2002) ou de groupes phylogénétiques ou fonctionnels particuliers (Dahllöf, 2002).

Plusieurs techniques développées sont couramment utilisées. Ces techniques sont basées sur le principe de migration électrophorétique de fragments d'ADN extraits (préalablement amplifiés par PCR) sur gels d'agarose ou de polyacrylamide suivant leurs polymorphismes de tailles comme: RISA (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis), réalisation de banques de clones et séquençage des gènes codant l'ARNr 16S (Bing-Ru *et al.*, 2006), Terminal-Restriction-Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) (Osborn *et al.*, 2000), ARDRA (Amplified rDNA Restriction Analysis) (Paul *et al.*, 2018), SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) (Tebee *et al.*, 2015), ou de séquences : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) et Temporal Temperature Gel Electrophoresis (TTGE) (Bing-Ru *et al.*, 2006),

Décrire la diversité microbienne d'un environnement à l'aide de ces techniques permet d'avoir une image à un temps donné de la plupart des communautés présentes ainsi d'évaluer les changements structurels et la diversité d'un groupe microbien donnée. En outre, ces approches doivent être combinées à d'autres mesures (consommation d'un substrat carboné ou O₂, production de CO₂ ou métabolites, etc.) afin de déterminer l'impact des facteurs environnementaux reliés aux changements des communautés (Baumgartner *et al.*, 2009). Chacune de ces approches comportent des avantages et des inconvénients mais dans l'ensemble, elles sont rapides, reproductibles, peu coûteuses, et permettent d'analyser en parallèle plusieurs échantillons. Cependant, ces techniques de génotypages ne permettent pas d'identifier par exactitude les taxons ou groupes de taxons microbiens présents (espèces, genres, phylums) et souffrent d'un manque de résolution (Ranjard *et al.*, 2000).

4.2.3. Recherche des gènes fonctionnels (Génomique fonctionnelle)

La caractérisation phylogénétique des microorganismes présents dans un écosystème en ciblant les gènes dits fonctionnels associés à des fonctions métaboliques spécifiques (*rpoB*, *nifH*, *nirS*, etc.), ce qui est couramment effectuée par PCR, est intéressante d'un point de vue

écologique. La détection de ces gènes est souvent rendue difficile en raison de la conservation génétique parfois faible des séquences, il faut alors utiliser des amorces dégénérées avec un succès plus ou moins grand (Rowe *et al.*, 2017). En effet, la plasticité des génomes microbiens dus en partie aux transferts de gène horizontaux joue un rôle important dans l'écologie des microorganismes.

Il est nécessaire de s'intéresser à l'expression des gènes pour permettre de conclure à la fois sur la présence et sur la viabilité des gènes et la molécule de choix pour cela est l'ARN messager (ARNm) (Huybens *et al.*, 2009). Toutefois, l'étude et la manipulation de cette molécule informative comportent plusieurs difficultés y compris (extraction délicate, durée de vie courte, forte contamination, sensibilité aux enzymes de dégradation...), ce qui rend l'étude des transcrits plus difficile que la recherche des séquences d'ADN données (Selinger *et al.*, 2003).

4.2.4. Approches métagénomiques

Récemment, la microbiologie environnementale s'est dotée d'un nouveau concept en restreignant l'étude des microorganismes à leur ADN directement extrait de l'environnement (Daniel, 2005). Aujourd'hui, de nouvelles technologies facilitent l'étude de l'ADN génomique en proposant de séquencer directement l'ADN extrait s'affranchissant ainsi des étapes de clonage ou d'amplification.

La métagénomique et l'arrivée du séquençage de nouvelle génération (*NGS: Next Generation Sequencing*) fut présentée comme la panacée pouvant apporter une réponse satisfaisante aux questions concernant l'écologie microbienne (Schloss et Handelsman, 2003). Avec l'évolution de ces techniques, les approches métagénomiques sont désormais de plus en plus utilisées afin d'étudier les communautés microbiennes au sein d'un environnement donné. C'est donc l'ensemble d'une communauté qui en théorie devient accessible grâce à ces approches, permettant ainsi de définir de possibles interactions entre les différentes populations, de définir la spécificité ou au contraire la redondance des fonctions potentielles et la diversité des gènes codant ces fonctions (Riesenfeld *et al.*, 2003).

Actuellement, les analyses métagénomiques s'intéressent à de très nombreux types de microbiotes colonisant une grande variété d'environnements et occupant un nombre considérable de niches, soit en interaction avec d'autres organismes uni- ou multicellulaires (surfaces animales, rhizosphères, feuilles, etc.), soit libres, dans des milieux naturels, comme les sols et les eaux. Dans l'ensemble, l'ADN génomique total des organismes présents dans une niche environnementale donnée est extrait directement, et ceci sans aucune étape de

culture et isolement au préalable (Riesenfeld *et al.*, 2003). Les communautés bactériennes et archéennes sont ainsi devenues des sujets d'études majeurs illustrant leur importance dans les domaines de la santé et de l'environnement.

Plusieurs techniques de séquençage haut débit pourront ensuite être appliquées afin de séquencer et analyser l'intégralité des acides nucléiques présents dans l'échantillon prélevé, notamment la **Technologie 454 (Shotgun) ou** (Pyroséquençage, Roche 454) (Petrosino *et al.*, 2009), dont le génome est découpé de façon aléatoire en fragments de petites tailles, sans étape préalable de PCR. Les extrémités de ces fragments sont ensuite séquencées, puis ces séquences sont assemblées sur la base de leurs alignements avec référence pour essayer de produire une séquence complète grâce à des outils de bioinformatiques spécifiques. En théorie, il est possible si la diversité n'est pas trop élevée, d'obtenir la totalité d'un métagénome. En association avec des techniques telles que la RT-qPCR (real time quantitative PCR), il est également possible de relier les communautés microbiennes et les fonctions biologiques (Yergeau *et al.*, 2012), même si à l'heure actuelle, cela reste encore difficile pour les communautés du sol.

L'autre technologie de la **CRT Solexa/ illumina** dite « Séquençage par synthèse », dont le principe de séquençage est basé sur l'incorporation réversible des nucléotides fluorescents (CRT : *cyclic reversible termination*) et par lecture optique de la fluorescence (Metzker, 2010). Il s'agit là également, d'un séquençage en temps réel, basé sur la détection de la fluorescence mais en présence des 4 nucléotides marqués (ce qui constitue un avantage par rapport à la technologie 454). Des séquences de 25 paires de bases sont produites puis alignées, grâce à des logiciels, et comparées à une séquence de référence pour reconstituer la séquence recherchée. Cette technologie permet d'obtenir plusieurs centaines de milliers de séquences d'ADN, à partir d'un seul échantillon extrait d'un environnement donné. Actuellement, elle représente la méthode la plus puissante pour quantifier précisément et caractériser la diversité microbienne dans des environnements complexes (Claesson *et al.*, 2010).

4.2.5. Autres approches

Des techniques de marquage comme les études avec des isotopes stables (Stable Isotope Probing, SIP) (Dumont et Murrell, 2005) reposent sur l'utilisation de substrat marqué au ^{13}C pour déterminer les microorganismes présent dans une communauté qui utilisent activement un substrat marqué au ^{13}C et qui permet de faire le lien entre la caractérisation phylogénétique et l'activité métabolique à l'échelle d'une cellule microbienne.

Parmi les outils prometteurs permettant de rendre compte la diversité microbienne, les puces à ADN taxonomiques (microarrays), qui peuvent permettre la mise en évidence même des groupes minoritaires dans une population ainsi que d'autres non détectés par clonage direct des gènes codant l'ARNr 16S (Gentry *et al.*, 2006). Ces biopuces permettent une évaluation plus rapide des échantillons étudiés, ce qui est un avantage important dans la caractérisation des sites par utilisation des fragments d'ADNc ou de sondes de petites tailles à partir de séquences génétiques répertoriées dans des banques de gènes (Genbank, RDP) (Zhou *et al.*, 2015). Cet outil a été utilisé lors des études d'écologie microbienne pour déterminer la phylogénie des populations présentes, ainsi les gènes fonctionnels présents dans les conditions de l'étude.

CHAPITRE 2

‘Matériel et Méthodes’

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. ZONE D'ÉTUDE

Dans ce travail, portant sur l'importance des zones humides algériennes, nous nous sommes intéressés à prospecter d'un point de vue microbiologique sept stations d'études (Figure 7), qui sont de vastes dépressions salées continentales "Sebkhas et Chotts", représentatives et rares de type zone humides naturelles de la région méditerranéenne. Cinq (5) stations sont situées à la région des Hautes plaines et Sud-Constantinoise au Nord-Est algérien, s'étendant sur une superficie de plus de 20.000 hectares. Une région au climat méditerranéen semi-aride typique, tempéré et caractérisé par une saison humide douce et un été chaud sec. Cette région est représentée le plus souvent par des lacs endoréiques salés, généralement peu profonds et temporaires (Bechim et Bacha, 2005). En outre, deux (2) autres stations sont situées dans des terres hyperarides chaudes (désert du Sahara, Nord-Est), où le climat est typiquement désertique, caractérisé par la chaleur et la sécheresse, ce qui contribue à une aridité très prononcée.

L'approvisionnement en eau dépend fortement des précipitations et la majorité de ces zones humides s'assèchent pendant l'été de Juin-Août (Aliate, 2016). Ces écosystèmes présentent un type d'environnement athalassohalin largement distribué en Afrique du Nord où la flore est constituée de beaucoup d'espèces halophiles très bien adaptées à l'aridité et à la salinité (essentiellement des chénopodiacées des genres *Salsola*, *Suaeda*, *Salicornia*, *Atriplex*...), distribuées en ceintures de végétation selon les caractères physico-chimiques du sol (salinité) et de l'importance (durée et profondeur) des inondations (Whigham *et al.*, 1993).

Trois de ces zones humides ; **Chott Tinsilt** (CTI), **Chott El Beïdha-Hammam Essoukhna** (CHS) et **Sebkha El Hamiet** (SE) sont classées comme zones humides d'importance internationale dans le cadre de la convention de Ramsar (Site officiel de la Convention de Ramsar, www.ramsar.org), présentant d'importantes réserves naturelles, à l'exception de **Sebkha Djendli** (SDJ), **Sebkha Medghacen** (SMD), **Sebkha Oumache** (SOM) et **Chott Karalla** (KAR).

- **Chott Tinsilt** (35° 53'N, 06° 29'E): Le chott fait partie des zones humides des Hautes plaines de la région constantinoise. Il s'étend sur 4 km de long et 2,5 km de large (2154 Ha) avec une profondeur qui varie assez régulièrement (0 à 0,5m). Son alimentation se fait par les eaux pluviales acheminées par les oueds des monts qui l'entourent, avec un apport important de sédiments, et par les eaux usées de la ville de Souk Naâmane. Il est classé comme site Ramsar depuis décembre 2004. Le site fait

partie, sur le plan administratif, de la Wilaya de Oum El Bouaghi. Il se situe à 5 km de la Commune de Souk-Naâmane et à 17 Km au Sud de la ville de Aïn-M'lila, il longe la route nationale 3 desservant Constantine et Batna et la voie ferrée Constantine-Biskra.

- **Chott El Beïdha-Hammam Essoukhna** (35° 55'N, 05° 45'E) : Le site qui chevauche sur deux wilayas 'Sétif et Batna', se situe à 4 km au Sud du village, chef lieu de Daira de Hammam Sokhna. La plus grande partie, située au Nord, revient à Sétif et plus particulièrement à la commune de Hammam Sokhna, et celle au Sud à la commune de M'Sil et fait partie de la wilaya de Batna. Le Chott est un lac salé saisonnier avec une prairie permanente couverte par une végétation halophyte s'étendue sur une superficie de plus de 12.223Ha. Il s'inonde en période pluvieuse et s'assèche totalement en été. Le site est classé comme site Ramsar depuis le 12 décembre 2004.
- **Sebkha El Hamiet** (35° 55'N, 05° 33'E) : C'est un lac salé naturel endoréique, temporaire qui s'inonde en temps de crues et s'assèche en saison estivale et d'une prairie humide sur son pourtour avec une superficie de 2509Ha. Le niveau d'eau, très variable selon les saisons, n'excède pas 1,5 mètre de profondeur. Le site fait partie, sur le plan administratif, de la Wilaya de Sétif et il est limité au Nord par le Douar d'Aïn El-Hadjar et Mechtet Ouled Mefla, au Sud par Merdjet El Hamiet et Mechtet Lekhtatla.
- **Sebkha Djendli** (35° 42'N, 06° 31'E) : Elle s'étendue sur une surface de 3700Ha. Le site fait partie, sur le plan administratif, de la Wilaya de Batna, à 46km au Nord du chef lieu de la wilaya. Il se trouve entourée de trois chaînes montagneuses de Djebel Bou Arif au Sud, Djebel Toumbait et Tafraout au Nord et à l'Est, elle s'ouvre sur les plaines de Boulhilet et de Chemorah. Sebkha Djendli est alimentée principalement par les eaux pluviales acheminées par les oueds des monts qui l'entourent (Principalement de Chemorah) (Chenchouni *et al.*, 2015).
- **Sebkha Medghacen** (35°44'N, 06°22'E) (wilaya de Batna), **Sebkha Oumache** (34°35'N, 05°46'E) (Biskra) et **Chott Karalla** (34° 01'N, 07° 20'E) (El Oued) qui sont de vastes dépressions salées généralement peu profonds et temporaires. Leur alimentation se fait par les eaux pluviales acheminées par les oueds des monts qui l'entourent.

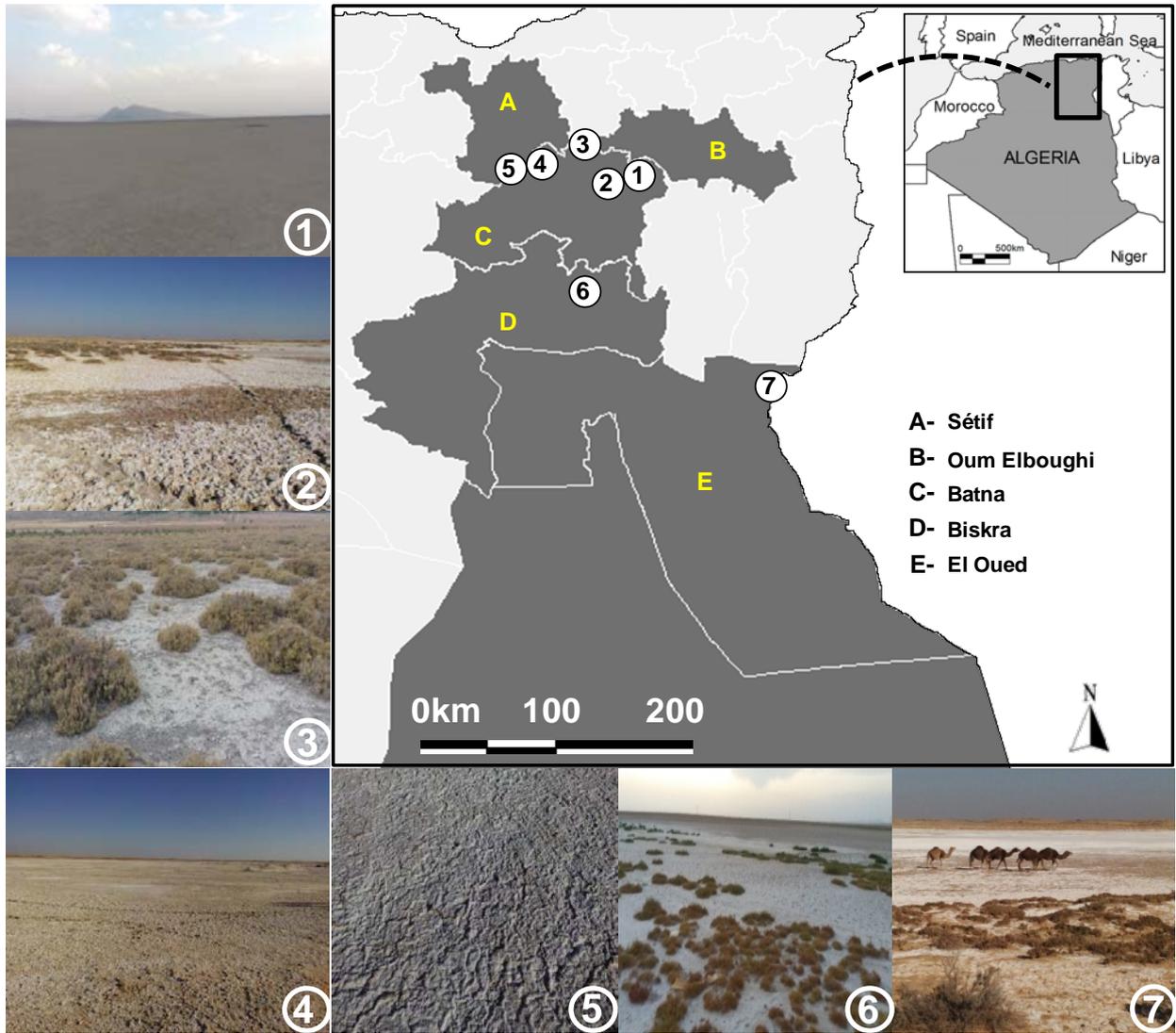


Figure 7. Carte de localisation des sites échantillonnés (Nord-Est de l'Algérie)

1. Sebkhha Djendli (**SDJ**) ($35^{\circ}42'N$, $06^{\circ}31'E$) ; **2.** Sebkhha Medghassen (**SMD**) ($35^{\circ}44'N$, $06^{\circ}22'E$) ; **3.** Chott Tinsilt (**CTI**) ($35^{\circ}53'N$, $06^{\circ}29'E$) ; **4.** Chott El Beïdha–Hammam Essoukhna (**CHS**) ($35^{\circ}55'N$, $05^{\circ}45'E$) ; **5.** Sebkhhet El Hamiet (**SEH**) ($35^{\circ}55'N$, $05^{\circ}33'E$) ; **6.** Sebkhha Oumache (**SOM**) ($34^{\circ}35'N$, $05^{\circ}46'E$) ; **7.** Chott Karalla (**CKA**) ($34^{\circ}01'N$, $07^{\circ}20'E$).

2. ANALYSE MÉTAGÉNOMIQUE ET ÉCOLOGIE MOLÉCULAIRE

2.1. Échantillonnage

Le prélèvement d'un échantillon du sol salin (sédiment) est une opération délicate, à laquelle le plus grand soin doit être apporté parce qu'il conditionne les analyses à effectuer, les résultats analytiques et l'interprétation qui en seront donnés. Ainsi, nous avons essayé de répondre à certains critères jugés d'importance lors de l'échantillonnage [points d'échantillonnage, période d'échantillonnage, et les paramètres à analyser (physicochimiques et microbiologiques)].

Deux sites Ramsar ont été sélectionnés pour une analyse métagénomique (Chott Tinsilt, **Site A**; Chott El Beïdha–Hammam Essoukhna, **Site B**). En parallèle et pour chaque Chott deux niveaux de prélèvement ont été effectués selon : (i) l'horizon (en **surface** de 3-5cm) et (en **profondeur** de 20-25 cm), et (ii) le transect de la périphérie au centre, à raison de cinq prélèvements par niveau (G1-G5) et avec un total de dix prélèvements par site. Les prélèvements ont été collectés de manière aseptique pendant la période estivale entre Juin et Août 2016, et environ 1,5kg de sol salin a été placé dans des sacs stériles puis transportés au laboratoire dans des glacières (température maintenue entre 4°C et 6°C).

2.2. Analyse pédologique et physicochimique des sédiments

Les analyses du laboratoire n'ont guère de valeur, si l'échantillon n'est pas vraiment représentatif de la qualité du sol existante. Les différentes analyses des paramètres physico-chimiques ont été effectuées au niveau du laboratoire agronomique et technique (Fertial, Annaba, Algérie). Environ 1kg de sol prélevé a été préparé pour l'analyse pédologique. Les grosses mottes ont été brisées manuellement et les sols ont été mis à sécher au préalable (air ambiant) pendant une semaine et à l'abri de la poussière. Après séchage, les petites pierres et les débris végétaux ont été retirés et les agrégats ont été réduits à l'aide d'un mortier. Les échantillons de sol séchés ont été tamisés à 2 mm et toutes les analyses ont été réalisées sur la terre fine.

Au total, seize paramètres édaphiques ont été déterminés pour les deux stations retenues : pH, conductivité électrique (CE), matière organique (MO%), carbone organique total (C%), carbone actif (C), l'azote total (%N), éléments minéraux (meq/100g) (K, Na, Cl, Mg, Ca), phosphore total (ppm), et la texture du sol (%) [(sable (S), limon (L), et argile (A))] (Partie complémentaire placée en annexe (1) pour détail d'analyse).

- ✓ Le pH et la conductivité électrique (CE) ont été mesurés sur une suspension sol-eau (1/5) (ISO.10390 ; ISO.11265),
- ✓ Dosage du calcium (Ca^{+2}), sodium (Na^{+}) et du potassium (K^{+}) par photométrie de flamme.
- ✓ Dosage du magnésium (Mg^{+2}) par complexométrie en présence du noir ériochrome T (NET).
- ✓ Dosage des chlorures (Cl^{-}) par colorimétrie à 470 nm en présence du thiocyanate mercurique et de l'alun ferrique.
- ✓ Le dosage du phosphore total (%) repose sur l'oxydation de la matière organique et la conversion de phosphate en orthophosphate soluble, par l'action de persulfate de potassium et d'acide sulfurique.
- ✓ Le carbone organique a été dosé par la méthode d'Anne décrite par Bonneau et Souchier, (1994) par oxydation avec le bichromate de potassium en excès ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) en milieu acide et le taux de la matière organique a été estimé en multipliant le taux de carbone par 1,72 (Mathieu *et al.*, 2003).
- ✓ Le calcaire total a été analysé par acidification en milieu fermé par l'acide chlorhydrique. En présence de carbonates, il y a dégagement de CO_2 correspondant au taux de carbonates.
- ✓ Le calcaire actif : La terre a été mise en contact avec un réactif spécifique (oxalate d'ammonium), qui attaque une fraction fine du calcaire total seulement. Le calcium extrait a été ensuite dosé. Cette méthode d'analyse est décrite selon la norme AFNOR NF X31-106
- ✓ L'azote total (N%) a été déterminé par la méthode de Kjeldahl décrite par Bonneau et Souchier (1994). Elle consiste à une minéralisation de la matière organique azotée par l'acide sulfurique concentré à chaud.
- ✓ La texture indique l'abondance relative, dans le sol, de particules de dimensions variées : sable, limon ou argile. Les proportions de ces éléments ont été déterminées selon les protocoles préconisés par l'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) :

http://www.fao.org/tempref/FI/CDrom/FAO_Training/FAO_Training/General/x6706f/x6706f06.htm

2.3. Extraction directe d'ADN total

L'extraction directe d'ADNs environnementaux est basée sur une lyse mécanique et chimique des cellules microbiennes à l'aide d'un kit «**DNeasy®PowerSoil DNA Isolation Kit**». Le processus d'extraction consiste en une homogénéisation de l'échantillon de sol dans un premier temps dans un tube contenant à la fois des micro grains (microbilles) ainsi qu'un tampon de lyse (éliminant également d'éventuels agents inhibiteurs de PCR), qui est agité

durant une dizaine de minutes afin d'homogénéiser le mix et de lyser les cellules microbiennes. Ensuite plusieurs cycles de centrifugation sur colonne sont effectués avec les solutions fournies dans le kit afin de purifier l'ADN (**Figure 8**). Le kit d'extraction d'ADN de Qiagen permet d'obtenir de l'ADN de bonne qualité pour des applications ultérieures. Il s'agit d'un kit complet qui ne nécessite aucun réactif supplémentaire. Le protocole utilisé correspond à celui recommandé par le fabricant avec toutefois de légères modifications (<https://www.qiagen.com/us/shop/sample-technologies/dna/genomic-dna/dneasy-powersoil-kit/#resources>). Les extractions d'ADN ont été menées à partir de 10g d'échantillon naturel. Les échantillons ont été d'abord homogénéisés, et par la suite l'ADN a été extrait avec des tampons de lyse contenant des sels chaotropiques, des agents dénaturants et des détergents. Une lyse homogène a été garantie par une agitation intense (5,0 m/s pendant 30 secondes) avec le FastPrep 24 classic-instrument (*MP Biomedicals*) ou avec un vortex pendant 30 minutes. L'ADN a été ensuite fixé sur la membrane en silicate NucleoSpin® avec un agent liant et de l'éthanol. Il a été lavé avec 2 tampons différents pour enlever les inhibiteurs potentiels de PCR. L'ADN peut enfin être élué et repris dans 900µL de l'eau MilliQ stérile ou un tampon salin (TE) (Tris-HCL, 10mM ; EDTA, 0,5mM, pH 8) puis conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

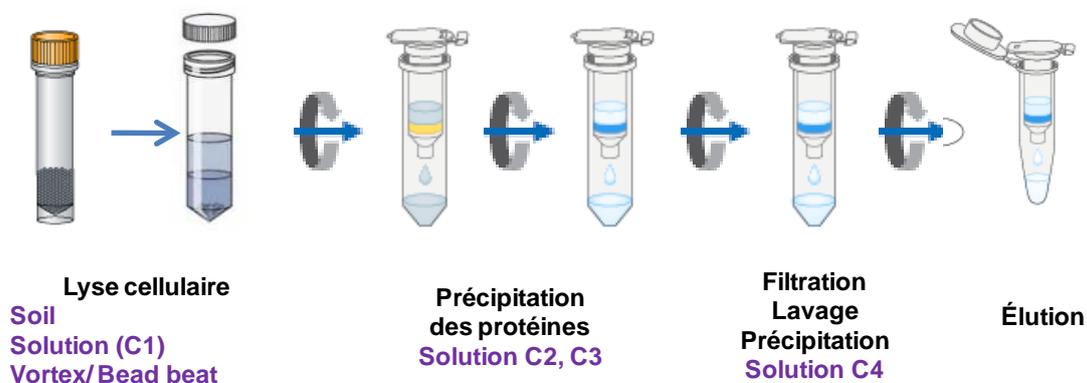


Figure 8. Procédure d'extraction d'AND génomique (kit DNeasy®PowerLyzer®PowerSoil).

2.4 Contrôle de la pureté et détermination de la concentration de l'ADN

La quantité et la pureté de l'ADN ont été mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop®1000 (Thermo Scientific) (1µl de dépôt). La pureté de l'ADN a été évaluée par mesure des absorbances $Abs_{230}/Abs_{260}/Abs_{280}$ et détermination des rapports Abs_{260}/Abs_{280} . Idéalement, le rapport $A_{260}/280$ doit être compris entre 1,8 et 2,0. Un rapport inférieur à 1,8 indique une contamination par des protéines ou du phénol et lorsqu'il est supérieur à 2,0, la

contamination est due à la présence d'ARN. Le rapport A260/230 doit être compris entre 0,3 et 0,9. Il est supérieur à 0,9 lors d'une contamination par des sels.

2.5. Analyse métagénomique « Illumina sequencing »

Le séquençage haut-débit d'Illumina (Illumina-Miseq) a été effectué pour l'étude de la diversité et de l'abondance relative des bactéries et archées totales. Une PCR a donc été réalisée avec une paire d'amorces universelles, une directe (**515F**) (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') et autre inverse (**806R**) (5'-GTNTTACNGCGGCKGC-3') (Caporaso *et al.*, 2012) pour amplifier la région hypervariable V4 du gène de l'ARNr 16S (<https://bio-protocol.org/e2884>). Le séquençage d'Illumina a été procédé à l'aide d'un équipement Miseq (Illumina, Hayward, CA, États-Unis) associé au processus de séquençage iTag. Les conditions d'amplification PCR pour le processus de séquençage à haut débit ont débuté avec un cycle de 3 min à 95° C, puis avec 32 cycles de 30 secondes à 30 ° C, 40 secondes à 60°C et 60 secondes à 72° C. L'amplification s'est terminée par une étape d'élongation de 5 min à 72°C.

2.6 Analyse statistique et bioinformatique

2.6.1. Caractéristiques des sols

Pour décrire les caractéristiques du sol de chaque site et à chaque point de prélèvement, la moyenne (\pm écart type) a été calculée pour chaque paramètre de sol sur la base de toutes les observations. La variabilité des paramètres du sol entre les deux sites ont été testées à l'aide de l'analyse de variance (ANOVA) à trois facteurs (*Site*, *Gradient* et *Horizon*). Les tests ont été réalisés à l'aide du logiciel statistique R version 3.2.2 (R-Core Team, 2015). De plus, des tests de corrélation de Pearson ont été effectués entre les paramètres du sol afin de comprendre les tendances des relations entre eux. La matrice de corrélation a été tracée en utilisant le package 'corrplot' et 'ggplot2' de R (Chang, 2013).

2.6.2. Identification des unités taxonomiques opérationnelles (OTU)

Après un séquençage à haut débit, l'ensembles des séquences obtenues ont été modifiées, corrigées et alignées en utilisant un panel de logiciels bioinformatiques. Le seuil de similarité des séquences SSU appartenant à la même unité taxonomique opérationnelle (OTU) a été fixé à 97% pour déterminer les groupes spécifiques. Les lectures (reads) sens et antisens ont été utilisées pour chaque séquence au format FASTQ puis les contigs ont été obtenues à l'aide de PEAR Illumina paired-end read merger (Zhang *et al.*, 2013). Par la suite, ces derniers ont été

convertis en fichiers de séquence et de qualité au format FASTA. Les séquences <100 pb de longueur ne sont pas écrites dans le fichier de sortie. Toutefois, aucune restriction de taille minimale de cluster n'a été appliquée. La sélection d'unité OTU a été effectuée à l'aide de l'algorithme de sélection UPARSE OTU (Edgar, 2013) pour classer le grand nombre de clusters en unités OTU. Afin de déterminer les informations taxonomiques, les séquences obtenues ont été exécutées via le programme d'alignement global USEARCH (Edgar, 2010). Les données ont été identifiées à l'aide d'une base de données de séquences de haute qualité dérivées du NCBI pour trouver les six correspondances les plus proches pour une séquence donnée. A partir de ces 6 séquences, nous avons attribué une valeur de confiance à chaque niveau taxonomique (règne, phylum, classe, ordre, famille, genre et espèce). La présence de chimères sur les OTUs sélectionnées a été inspectée à l'aide du logiciel de détection de chimère UCHIME exécuté en mode de novo (Edgar *et al.*, 2010). Les séquences ont été alignées de façon multiple en utilisant le logiciel MUSCLE (Edgar, 2004). Le regroupement à une divergence de 4% a été effectué à l'aide de l'algorithme de regroupement USEARCH. Les clusters à 2 membres (clusters singleton) ne sont pas ajoutés au fichier de sortie, ce qui les supprime de l'ensemble des données.

2.6.3. Analyse de la diversité

Le nombre de séquences assignées pour chaque classe et genre présent était d'abord calculé pour chaque point de prélèvement des deux sites (abondance). Des courbes de raréfactions ont été générées et différents indices de diversité (*Alpha*, *Shannon*, *Équitabilité* et *Chao*) ont été calculés afin de décrire la diversité microbienne.

L'abondance d'un taxon est le nombre d'individus de ce taxon par unité d'espace. Associée à deux autres concepts qui sont la répartition et la dominance, l'abondance correspond à une mesure de base en écologie et reflètent l'influence de plusieurs facteurs biologiques et environnementaux sur un organisme. Elle permet également de définir les tendances à l'installation ou à la raréfaction des individus des taxons. Ainsi, l'abondance relative correspond au nombre d'individus par unité d'espace pour une espèce donnée par rapport au nombre total d'individus toutes espèces confondues (Magurran, 2004). Le nombre des OTUs (n_i) a été déterminé pour chaque espèce identifiée dans chaque échantillon de sol des deux sites, puis la fréquence ou l'abondance a été calculée comme la proportion de l'espèce (i) par rapport au nombre total des OTUs (N). Des tests du Chi-carré de Pearson (χ^2) ont été utilisés pour comparer les valeurs de l'abondance des principaux groupes microbiens

selon les différents facteurs (*Site*, *Gradient* et *Horizon*). Pour décrire les schémas spatiaux dans la biodiversité microbienne, une mesure de la diversité *alpha* (S) qui correspond au nombre absolu (richesse) de taxa observés dans chaque échantillon de sol (Magurran, 2004).

La diversité microbienne des chotts a été mesurée en utilisant l'indice de Shannon ($H' = -\sum(pi \times \log_2 pi)$) et l'équitabilité ($E = H'/H_{max} \times 100$, avec $H_{max} = \log_2 S$), où pi est la proportion de l'espèce (i). L'indice de Shannon (H) (Shannon et Weaver, 1963) quantifie l'hétérogénéité de la biodiversité présente et varie entre 1 et $\ln S$. L'interprétation de l'indice de Shannon étant dépendante de la taille de l'échantillon, cet indice est couplé à l'indice d'équitabilité (E) (Lloyd et Ghelardi, 1964) correspondant au ratio entre l'indice de Shannon et sa valeur maximale. Celui-ci varie donc entre 0 et 1, plus la valeur est proche de 1 plus les abondances relatives des différents taxa sont homogènes. La richesse en espèces estimée a été calculée avec le programme EstimateS 9.1.0 (Colwell, 2013). L'estimation de la richesse en espèces bactériennes et archéennes (S_{est}) a été évaluée en appliquant les méthodes suivantes : Estimateurs : Chao 2 (S_{Chao2}), Jackknife du premier order (S_{Jack1}), bootstrap et S_{est} (analytique). Les courbes de raréfaction, les courbes représentant le nombre de singletons (espèces à un seul individu), les doubletons (espèces à seulement deux individus), espèce unique (espèce qui se produisent dans un seul échantillon), et les doublons (espèces présentes dans seulement deux échantillons) ont été aussi tracées. L'estimateur de Chao (Chao, 1984) quand à lui permet d'estimer le nombre total de taxa normalement présents dans l'environnement en calculant le nombre de taxa non observés à partir de ceux comptabilisés. Une analyse de la variance a été utilisée pour l'analyse de l'effet des paramètres physicochimiques et déterminer si les co-variables (*Site*, *Gradient*, et *Horizon*) possèdent un effet significatif sur la structure de communauté. Des modèles linéaires généralisés (GLMs) ont été appliqués pour tester les variations spatiales des abondances des ordres taxonomiques suivant les effets de (*Paramètres édaphiques*, *Site*, *Gradient*, *Horizon*) et de leur interaction. Afin d'investiguer les relations entre le sol et les communautés microbiennes, une méthode descriptive multidimensionnelle (factorielle) ou l'analyse canonique des correspondances a été générée en utilisant une matrice de corrélation. L'ACC relie les données provenant des assemblages et les paramètres environnementaux (Ter Braak, 1986). L'ordination produit un diagramme où les classes sont représentées par des points et les variables environnementales par des vecteurs. La projection des points perpendiculairement aux vecteurs permet de relier chaque groupe microbien par rapport à chaque variable.

3. ANALYSE DE LA FLORE HALOPHILE CULTIVABLE DES CHOTTS ET SEBKHAS

3.1 Échantillonnage et mise en culture

Des prélèvements de sols salés (sédiments) ont été recueillis et collectés de manière aseptique à la surface d'environ 5-10 cm après avoir écarté les trois premiers centimètres pendant la période estivale (Juin et Août 2016). Les sols ont été placés dans des sacs stériles puis transportés dans une glacière (la température a été maintenue entre 4°C à 6°C) et acheminés au laboratoire. Au total, vingt huit (28) échantillons ont été prélevés selon les quatre points cardinaux de sept sites choisis et la position géographique des points de prélèvement a été déterminée à l'aide d'un appareil GPS (système de positionnement global) et des supports cartographiques (Figure 7).

Il est connu que les bactéries/archées halophiles et halotolérantes ont des exigences nutritionnelles variables et leur étude nécessite l'utilisation de plus d'un milieu de culture (Oren *et al.*, 1997b). Une dizaine de milieux spécifiques aux halophiles sont définis mais seulement deux milieux salés riches ont été choisis pour cultiver les procaryotes halophiles aérobies. Ces deux milieux ont servi, à la fois, pour l'isolement, et aussi de base pour les tests d'identification physiologique et biochimique des isolats halophiles.

- (i) **Milieu 1 Halophilic medium (HM)** (Ventosa *et al.*, 1982) composé de (g/l) (5, d'extrait de levure ; 5, de protéose peptone n°5 et de 1, glucose) supplémentés par différentes concentrations salines (5, 10, 15, 20, 25, et 30% de composition de sel équilibrée).
- (ii) **Milieu 2** adapté de la formule d'Oren (Oren, 1983) composé de (g/l) (NaCl, 125 ; MgCl₂·6H₂O, 100 ; CaCl₂·2H₂O, 0,13 ; K₂SO₄, 1g ; tryptone, 1g ; amidon soluble, 2).

La solution mère de sel a été préparée comme décrit par Subov (1931), contenant par litre : NaCl, 234 g; MgCl₂·6H₂O, 42g; MgSO₄·7H₂O, 60g; CaCl₂·2H₂O, 1g; KCl, 6g; NaCO₃H, 0,2g; NaBr, 0,7g; FeCl₃, 0,005g.

Un gramme de sédiment a été mis en suspension dans 9 ml d'eau saline stérile (10%) puis soumis à agitation par vortex pendant 2 min. La suspension a été diluée en série décimale et 100µl a été étalé sur les deux milieux nutritifs additionnés de différentes concentrations de sels totaux. En parallèle, des cultures d'enrichissement ont été réalisées dans 100 ml de HM inoculé avec 10g de sédiment et après croissance, les cultures ont été étalées sur du HM solide. Les milieux de culture solides ont été obtenus par addition de 15-20 g/l de Bacto-Agar

(Difco) aux milieux liquides et stérilisés à 121°C pendant 30 minutes. Le pH a été ajusté à 7,3-7,5 à l'aide d'une solution concentrée de NaOH 4M.

3.2. Conservation et nomenclature des isolats

Les eubactéries halophiles et halotolérantes non actinomycètes sont connues par une croissance rapide, par rapport aux actinomycètes et archées halophiles qui présentent une croissance lente. Afin de favoriser leurs développements en évitant l'évaporation des milieux salés, l'ensemble des boîtes ont été recouvertes de plastique puis incubées à 35°C. La lecture a été effectuée chaque jour pendant quatre semaines et les colonies à différents aspects macroscopiques ont été sélectionnées, purifiées par repiquages successifs sur le même milieu d'isolement et conservées à 4°C et -20°C sur glycérol à 20%.

Chaque isolat a reçu un nom en fonction de son origine et sa nature (**B**, Eubactérie, **Ar**, Archée). Chott Tinsilt (**CTI**) ; Chott Karalla (**CKA**) ; Sebkha Djendli (**SDJ**) ; Sebkha Medghassen (**SMD**) ; Sebkha Oumache (**SOM**) ; Chott El Beïdha–Hammam Essoukhna (**CHS**) ; Sebkhet El Hamiet (**SEH**).

3.3. Caractérisation phénotypique préliminaire des isolats

La caractérisation phénotypique a été réalisée dans les conditions optimales pour chaque isolat (salinité, température et pH). Elle a été effectuée sur la base des tests et protocoles proposés pour la description d'archée (ordre des *Halobacteriales*) (Oren *et al.*, 1997b), et eubactéries halophiles (Ventosa *et al.*, 1982; Arahal *et al.*, 2007). Sauf indication, l'incubation des cultures a été réalisée à 35°C pendant 2 à 15 jours et le pH des milieux de culture a été ajusté à 7,5.

Chaque colonie représentative a été caractérisée par sa morphologie générale (aspect, pigmentation, taille, etc.) sur un milieu de culture solide correspondant à chaque isolat. La morphologie et l'arrangement cellulaire ont été déterminés par la coloration de Gram selon la méthode de Burke (Murray *et al.*, 1994) et le test KOH (Buck, 1982).

La croissance à différentes concentrations de sel a été examinée sur milieu HM additionné de 0 à 30% (p/v) de sel total (à des intervalles de 2,5%). Le pH de croissance a été déterminé par ensemencement sur milieu HM ajusté avant la stérilisation sur une gamme s'étalant de 4 à 10 (0,5 d'unité). Pour la température de croissance, les cultures ont été testées sur une gamme de température (4, 10, 20, 30, 35, 40, et 50°C). Les activités de la catalase, l'oxydase, la production d'indole et la réduction de nitrate ont été réalisés selon les recommandations de Smibert et Krieg (1994).

3.4. Identification moléculaire et analyse phylogénétique

3.4.1. Extraction de l'ADN génomique

Des cultures représentatives de bactéries et archées en phase exponentielle ont été préparées dans 20mL du bouillon HM additionné de 10% et 20% de sel total respectivement. Les cellules ont été récupérées par centrifugation à 4°C pendant 40 minutes à 8000rpm (Centrifugeuse BEKMAN GS-15R), et l'ADN génomique a été extrait en utilisant un kit de purification (kit Qiagen DNeasy, Allemagne) selon un protocole adapté d'une part et d'autre pour les bactéries et archées. Le culot a été traité par 200µl d'une *solution enzymatique de lyse* [Tris-HCL, pH 8,0 (200 µl/ml); Na-EDTA (400µl/ml); Triton X-100 (200 µl/ml) ; Lysozyme (10mg/ml), Eau MiliQ (q.s.p 50ml)], additionnée de la protéinase K (600 mAU/ml) (25µl). Le tout a été placé dans un bain marie à 60°C pendant 30 minutes. Deux volumes d'éthanal (96-100%) ont été ajoutés afin de précipiter l'ADN génomique suivi d'agitation par vortex. L'ensemble a été pipeté dans une colonne filtrante (*Mini Spin Columns*) (Figure 9) suivi d'une centrifugation à 8000rpm/1min. Deux étapes de lavage sont recommandées afin d'éliminer le maximum des débris cellulaires et impuretés en utilisant des solutions de lavage tamponnées (AW1 et AW2) [à base d'éthanol pour éliminer toute trace de sel], suivi d'une double centrifugation à 14000rpm/2min. L'ADN génomique a été récupéré et re-suspendu dans 300µl de l'eau MilliQ ou de Tampon TE suivi d'une centrifugation (8000rpm/1min) dans un Eppendorf stérile. La quantité et la pureté de l'ADN ont été ensuite mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre 1000 NanoDrop® (Thermo Scientific) puis conservé à - 20°C pour des utilisations ultérieures.

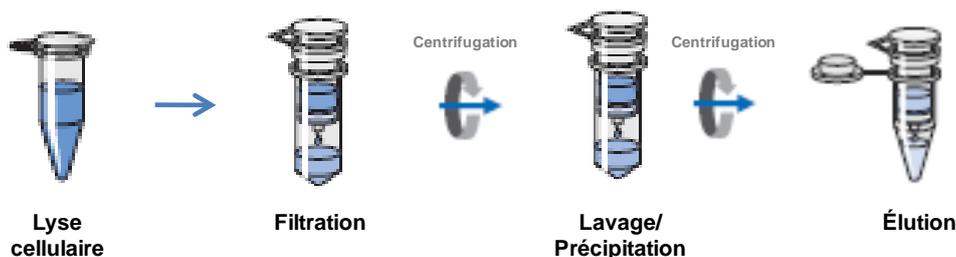


Figure 9. Extraction d'ADN cellulaire « DNeasy®Mini-procedure, Qiagen ».

3.4.2. Réaction de polymérisation par PCR

Afin d'identifier les isolats, le gène codant pour l'ARNr 16S de ceux-ci a été amplifié par PCR. L'amplification du gène de l'ARNr 16S a été réalisée en utilisant un mélange réactionnel [HotStarTaq®MasterMix (Qiagen) (ADN Polymérase HotStarTaq ; 5Unités/µl; tampon PCR (1X); dNTP, 20mM; MgCl₂, 25mM) (12,5µl); ADN (50-200ng/4-5µl), H₂O (MilliQ) (qsp

21µl]. Deux couples d'amorces ont été utilisés pour l'amplification à raison de **4µl**, un spécifique aux archées composé d'une amorce directe la **D30** et la reverse **D56** (Arahal *et al.*, 1996), ainsi que l'amorce directe **16F27** et la reverse **1525R** utilisées pour les eubactéries (Aguilera *et al.*, 2001) (Tableau 2). Les cycles de PCR pour les deux différentes amorces sont détaillés dans le tableau 2. Les produits de la PCR sont ensuite visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose puis conservés à -20°C/-80°C pour être envoyés au séquençage après purification.

Tableau 2. Programme de PCR et cycle employés

Couple d'amorce	Étapes	Température/temps	Cycle
D30/D56 Archée	Pré-dénaturation	97°C – 45 s	1
	Dénaturation	97°C- 15 min	
	Association/hybridation	55 °C – 60 s	35
	Élongation/polymérisation	72 °C -2 min	
	Fin d'amplification	72°C – 7 min	1
16F27/1525R Bactérie	Pré-dénaturation	95°C – 45 s	1
	Dénaturation	95°C- 15 min	
	Association/hybridation	55 °C – 60 s	35
	Élongation/ polymérisation	72 °C -2 min	
	Fin d'amplification	72°C – 7 min	1

3.4.3. Électrophorèse sur gel d'agarose, purification et séquençage

Les produits de PCR ont été contrôlés sur gel d'agarose-TAE à 0,8% (Tris-HCl ; acétate de sodium ; EDTA à 0,5x). Le mélange d'agarose et la solution tampon (TAE) a été chauffé jusqu'à ébullition pour dissoudre l'agarose. Du BET (Bromure d'éthidium) (10mg/mL) a été ajouté pour atteindre une concentration de 200 µl/L dans le gel. Le gel a été ensuite coulé dans un moule avec un peigne pour délimiter les puits de chargement. Un mélange de 5 µL du produit PCR additionné de 1 µl de tampon de charge (bleu de bromophénol 0,25 % (p/v) ; xylène cyanol 0,25 % (p/v) ; EDTA 25 mM ; glycérol 50 % (v/v)) a été introduit dans chaque puits. Un marqueur de taille ou Ladder 1kb (Gene Ruler™ DNA Ladder, Thermo Scientific®) de 10000 à 250 paires de bases) (3µL) était aussi coulé dans le premier et dernier puits afin de ce référer. Une différence de potentiel de 100 V a été appliquée pendant 30 min pour permettre la migration de l'ADN. Le gel a été finalement exposé à la lumière UV pour mettre en évidence le BET fixé sur l'ADN. Par la suite, une étape de purification éliminant les impuretés réactionnelles a été appliquée en utilisant des dispositifs de filtration centrifuge Amicon® Ultra0.5 (Merck, Irlande).

Tableau 3. Séquences des amorces pour PCR

Amorce	Séquence (5'-3')	Amplicon	Spécificité	Utilisation
D30	ATTCCGTTGATCCTGC	1472pb	Archaea	Amplification/Séquençage
D56	GYTACCTTGTTACGAC		Archaea	Amplification/Séquençage
16F27	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	1520pb	Bacteria	Amplification
1525R	AAGGAGGTGWTCCARCC		Bacteria	Amplification
16SF357	CTCCTACGGGAGGCAGCA	1520pb	Bacteria	Séquençage
16SR519	GWATTACCGCGGCKGCTG		Bacteria	Séquençage
16SF945	GGGCCCGCACAAAGCGGTGG		Bacteria	Séquençage

(K= G ou T ; M=A ou C ; R = G ou A ; Y = T ou C ; W= A ou T)

La réaction de séquençage utilise la technique du « Big Dye Terminator » (Applied Biosystem). Un séquençage direct a été effectué en utilisant un séquenceur d'ADN PRISM TaqDye Deoxy "Applied Biosystems" au Centre d'Instrumentation Scientifique (CSIC), Grenade, Espagne.

3.4.4. Analyse phylogénétique

L'analyse phylogénétique a été réalisée en utilisant la version 6 du logiciel MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (Tamura *et al.*, 2013) et les séquences complètes de gènes de l'ADNr 16S ont été alignées en utilisant le programme CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994) contre des séquences correspondantes des bases de données GenBank et du serveur EzTaxon (Kim *et al.*, 2012). Des matrices de distances évolutives ont été générées et des arbres phylogénétiques ont été construits en utilisant la méthode d'assemblage voisin (*Neighbor-joining method*) (Saitou et Nei, 1987). Les distances ont été calculées en rapportant le nombre des sites variables sur le nombre total des sites par comparaison des séquences deux à deux. Ces distances permettent de regrouper les séquences par paires et de choisir, à chaque étape, celles qui minimisent la longueur totale de l'arbre. Les topologies des liens phylogénétiques ont été évaluées par un test de robustesse (*Bootstrap*) exprimé en pourcentage de 1000 répétitions (Felsenstein, 1985), qui permet de mesurer si les regroupements obtenus à partir de la méthode du Neighbour-Joining, sont solides ou non.

3.5. Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires

La production des enzymes hydrolytiques extracellulaires (hydrolases) a été recherchée qualitativement sur milieu solide de base additionné de substrat-test en utilisant la méthode (drop technique) après incubation à 35°C pendant 4 jours pour les eubactéries et de 2 à 4 semaines pour les archées halophiles (Oren *et al.*, 1997b). Les cultures starters utilisées pour le criblage

enzymatique ont été obtenues en cultivant les halophiles dans 10ml de bouillon HM additionné de sel total correspondant à chaque isolat sous agitation constante à 120tr / min. Après croissance, dix (10 µl) de culture a été déposée sur un milieu approprié. Les résultats ont été exprimés qualitativement sous forme de niveaux d'activités enzymatiques (LEA= levels of enzymatic activities) présentés par les isolats testés (activité élevée, activité moyenne, activité faible et pas d'activité) (Latorre *et al.*, 2016) en utilisant la formule : LEA = diamètre de la zone d'activité /diamètre de la colonie en millimètres. Toutes les expériences ont été conduites selon les protocoles standards décrits ci-dessous.

3.5.1 Activité amylolytique

L'activité de l'amylase a été déterminée sur un milieu à base d'amidon contenant (g/l): amidon soluble, 2; peptone, 5; extrait de levure, 1; agar, 20; supplémenté avec 5, 10 et 20% de sels totaux en fonction de chaque groupe bactérien. L'hydrolyse de l'amidon a été détectée en inondant les boîtes de solution d'iode-iodure de potassium (solution d'iode de Lugol) (1,0 g d'iode, 5,0 g d'iodure de potassium et 330 ml d'H₂O). Une zone claire autour de la colonie indiquant l'hydrolyse de l'amidon (Montalvo-Rodriguez *et al.*, 1998).

3.5.2 Activité cellulolytique (CMCase)

Pour le criblage de l'activité cellulolytique des isolats halophiles, un milieu à base de carboxyméthylcellulose (CMC) a été préparé, contenant (g/l) : carboxyméthylcellulose (CMC), 5 ; NaNO₃, 1; K₂HPO₄, 2; extrait de levure, 0,5; glucose, 1; agar, 20, supplémenté de sel total correspondant à chaque isolat. Après incubation, les boîtes ont été inondées avec une solution à 0,1% de rouge Congo ou une solution d'iode de Lugol. L'apparition de zone claire autour des colonies indique l'activité de la cellulase (Teather et Wood, 1982).

3.5.3 Activité lipolytique

L'activité lipolytique (estérases) a été détectée selon la méthode de diffusion sur gélose à base de Tween contenant (g/l) : 0,1% de Tween (40, 60 ou 80), extrait de levure, 1 ; agar, 20 supplémenté de sel total correspondant à chaque isolat. Un halo ou un précipité autour des colonies témoigne une lipolyse (Sierra, 1957).

3.5.4 Recherche de la gélatinase

Le test d'hydrolyse de la gélatine a été effectué selon le procédé de Frazier (1926) en utilisant une gélose à base de gélatine contenant (g/l) : gélatine, 10 ; extrait de levure, 1; agar, 20 ; additionné de sel total correspondant à chaque isolat. Après incubation, l'hydrolyse a été révélée par addition du réactif de Frazier [HgCl₂ à 15% (p/v), dans du HCL concentré à 20% (v / v)]. La gélatinase est enregistrée lorsque des zones claires sont apparues autour des colonies.

3.5.5 Recherche de protéase (caséinase)

L'activité protéolytique ou caséinolytique des halophiles a été testée sur milieu à base de lait écrémé contenant (g/l) : lait écrémé, 10 ; extrait de levure, 1 ; agar, 20. Des zones claires autour des colonies après incubations indiquent une activité protéolytique (Gonzalez *et al.*, 1978).

3.5.6 Recherche de nucléase

L'activité ADNase des isolats halophiles a été révélée à l'aide d'un milieu gélose à ADN (Merck), additionné de sel total correspondant à chaque isolat. Après incubation à 35°C, les boîtes ont été révélées avec une solution de HCl (1N). Un halo clair autour des colonies témoigne une activité nucléasique (Jeffreis *et al.*, 1957).

3.5.7 Production d'inulinase

L'activité d'inulinase a été criblée dans un milieu gélosé contenant (g/L) : inuline, 2 ; (NH₄)₂SO₄, 0,5 ; KH₂PO₄, 3 ; agar, 20; supplémenté de sel total correspondant à chaque isolat. La croissance des isolats indique la production d'inulinase (Allais *et al.*, 1986).

3.5.8 Production de pectinase

L'activité pectinolytique a été déterminée sur un milieu gélosé à base de la pectine contenant (g/L) : pectine, 10 ; (NH₄)₂SO₄, 1,4; K₂HPO₄, 2; solution nutritive, 1 (FeSO₄·7H₂O, 0,005; MnSO₄·H₂O, 1,6; ZnSO₄·7H₂O, 1,4; CaCl₂·2H₂O, 0,1); agar, 20; supplémenté de sel total correspondant à chaque isolat. Après une incubation, les boîtes ont été inondées avec une solution d'iodure de potassium. Les zones claires autour des colonies montrent une activité pectinolytique (Soares Marcia *et al.*, 1999).

3.5.9 Production de xylanase

L'activité xylanase des isolats a été détectée sur un milieu salin gélosé à 1% de xylane. Le milieu contenait les éléments suivants (g/L): xylane, 10 ; extrait de levure, 10; peptone, 2; supplémenté de sel total correspondant à chaque isolat. Après une incubation, les cultures ont été révélées avec une solution à 0,1% de rouge Congo et l'activité de xylanase apparaît sous forme de zones claires autour des colonies (Ghio *et al.*, 2012).

3.6. Tolérance aux métaux lourds

La tolérance aux métaux lourds des isolats (eubactéries halophiles non actinomycètes) au plomb, au cadmium, au zinc, au cuivre et au nickel a été testée sur des plaques de microtitration en polystyrène à 96 puits en utilisant un milieu liquide (HM) additionné de sel total correspondant à chaque isolat, comme décrit par Mohamad *et al.* (2017). Des solutions mères de [Pb (NO₃)₂, Cd (NO₃)₂, ZnCl₂, CuCl₂ et NiCl₂] ont été préparées dans de l'eau distillée puis stérilisées par

filtration (0,22 µm). Le milieu a été complété à une concentration spécifique de 0,05 à 10 mM de sels métalliques. Deux cent microlitres de milieu HM contenant des concentrations croissantes de métaux à tester ont étéensemencés avec 4 µl d'isolats à une densité optique de (0,1). Des cultures sans métal ont servi de contrôle positif. Les microplaques par la suite ont été incubées à 35°C pendant 5 à 8 jours et la croissance a été contrôlée par mesure de la densité optique (DO_{600nm}) en utilisant un lecteur de microplaques Multiskan EX (Thermo Labsystems). La concentration minimale inhibitrice des sels métalliques a été définie comme la plus faible concentration inhibant la croissance.

3.7. Mise en évidence de l'activité antifongique

L'activité antagoniste des isolats (eubactéries non actinomycètes) halophiles a été déterminée sur milieu gélosé PDA (gélose de pomme de terre) en utilisant un test de confrontation ou le test d'inhibition d'extension hyphal (Roberts et Selitrennikoff, 1988), vis-à-vis de champignons phytopathogènes (*Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *F. verticillioides* et *Phytophthora capsici*).

Les isolats bactériens ont été cultivés sur gélose HM appropriée pendant 5 jours à 35°C, par la suite des disques de différentes cultures ont été prélevés et déposés à égale distance sur la surface des boîtes de PDA, préalablement inoculées avec les organismes indicateurs à l'aide d'un disque mycélien de cultures fongiques jeunes. Des boîtes de contrôle (témoin) ont également été maintenues avec des cultures de champignons testes sans bactéries. Les activités antagonistes ont été ensuite suivies après une incubation de 7 jours à 30°C en mesurant la croissance d'inhibition fongique selon la formule suivante :

Inhibition de la croissance (IC) = $(R1-R2) / R1 \times 100$, où R1 représente la distance (mm) entre le point d'implantation du disque fongique et le côté de la plaque de Pétri, et R2 la distance de croissance des champignons et le point de l'inoculation bactérienne.

3.8. Analyse des données

La réponse aux métaux lourds des souches bactériennes a été testée par une analyse en composantes principales (ACP) et le traçage a été effectué à l'aide d'une mise à l'échelle corrélative. L'inhibition fongique a été déterminée par moyennes ± écarts-types et les différences entre les moyennes ont été testées à l'aide de l'analyse post-hoc de Tukey afin de distinguer les groupes homogènes/ hétérogènes parmi différentes variables. Les comparaisons multiples des moyennes ont été considérées au niveau de probabilité $p = 0,05$. Tous les calculs ont été effectués à l'aide de XLSTAT (Addinsoft's, 2014).

4-ANALYSE TAXONOMIQUE DES EUBACTERIES ET ARCHÉES HALOPHILES

4.1. Collection de bactéries et archées

Les isolats sélectionnés pour une analyse taxonomique, ainsi que les souches types bactériennes et archéennes utilisées sont répertoriés dans le Tableau 4. Leur culture a été effectuée sur le milieu HM à une concentration saline finale appropriée pour chaque isolat.

Tableau 4. Isolats halophiles et souches de références utilisés

Espèce	Souche	Type	Source	Milieu	Condition de culture (% sel, T°C, temps)
Isolat 1	BCHS25	Bact	Sebkha El Beida	HM	5% sel total, 35°C, 7j
Isolat 2	ArSDJ4	Arch	Sebkha Djendli	HM	20% sel total, 35°C, 20j
<i>Lentibacillus persicus</i>	DSM22530 ^T	Bact	Sánchez-Porro <i>et al.</i> 2010	HM	5% sel total, 35°C, 3j
<i>Haladaptatus paucihalophilus</i>	DSM18195 ^T	Arch	Savage <i>et al.</i> 2007	HM	20% sel total, 35°C, 20j

DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen. /**Bact** : eubactérie non actinomycète, **Arch** : archée

4.2. Étude des caractères phénotypiques

L'identification et la caractérisation des isolats ont été effectuées conformément aux recommandations proposées par Ventosa *et al.* (1982), Oren *et al.* (1997b) et Logan *et al.* (2009) pour la description de nouveaux taxons d'eubactéries et archées halophiles.

4.2.1. Détermination des caractères phénotypiques

a. Caractères morphologiques et culturels

L'aspect macroscopique a été déterminé sur la gélose HM à des concentrations en sel appropriées et à différents temps d'incubation. Un examen à l'état frais a été effectué sur les isolats sélectionnés et souches apparentées afin de rechercher la mobilité des souches. Une coloration de Gram a été réalisée selon la méthode de (Dussault, 1955).

b. Analyse de l'ultrastructure bactérienne

L'étude de l'ultrastructure des isolats, qui se sont avérés être de nouveaux taxons, ont fait l'objet d'une observation par microscopie électronique à transmission et à balayage (Scanning Electronic Microscopy) (Transmission Electronic Microscopy). L'analyse microscopique a été réalisée au sein du Service de Microscopie Électronique du centre d'instrumentations scientifiques de l'université de Granada, Espagne.

- Pour TEM à la coloration négative, des échantillons de cultures liquides sur HM approprié des eubactéries non actinomycètes (Isolat 2, 3 et 4) ayant poussés pendant (5j)

pour les eubactéries et (20j) pour l'archée halophile à 35°C et sous agitation de 180rpm/min. Des culots cellulaires ont été repris après une étape de centrifugation (4000 rpm/5min) et les cellules ont été fixées dans un tampon en présence de 1% de tetroxyde d'osmium durant 1h. Une étape de déshydratation a été appliquée par une série de lavages avec de l'éthanol (en gradient de 70 à 100%) et fixés dans une résine monomérique suivie de l'ajout d'une solution de sel de métal lourd diluée (acétate d'uranyle). Les produits ont été déposés sur une grille d'or (Formvar®films-Gold) et observés avec un Microscope Electronique à Transmission (Zeiss EM 902 à 80 kV).

- SEM a été appliquée pour l'isolat 1 (ACTI7). Des cellules provenant de cultures en phase exponentielle ont été liées à des lames revêtues de poly-lysine suivie d'un processus de fixation, qui a été effectué pendant une nuit à 4°C dans une atmosphère saturée de vapeur de glutaraldéhyde. Après lavage dans du cacodylate de sodium, du rouge de ruthénium a été ajouté pendant 4h. Les cellules ont été déshydratées dans une série d'éthanol (en gradient de 30 à 100%) à température ambiante, et chaque étape de déshydratation a duré 20 minutes. Les échantillons ont été revêtus d'or par pulvérisation cathodique. Des micrographies électroniques ont été obtenues en utilisant un Microscope Électronique à Balayage -GEMINI (FESEM) CARL ZEISS.

c. Caractères physiologiques et biochimiques

L'analyse des caractères physiologiques a été réalisée par ensemencement de 100µl de cultures en phase exponentielle sur milieu HM solide (concentration saline finale appropriée) selon les tests. Toutes les cultures ont été incubées à 35°C sauf indiqué.

✓ Salinité

L'analyse des concentrations de sel nécessaires à la croissance des isolats a été déterminée sur milieu HM (pH 7,2) contenant un mélange équilibré de sels (Subov, 1931) de 0 à 30% (w/v) (avec 2,5% d'intervalle). L'exigence minimale en Mg^{2+} a été effectuée sur milieu solide additionné de quantités variables de $MgCl_2$ (p/v): 0 ; 0,005 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,8 ; 1,6 à 3,2 % (Rodriguez-Valera *et al.*, 1983).

✓ Température de croissance

La température de croissance a été testée en incubant des cultures solidesensemencées sur HM (concentration saline finale appropriée) (pH 7,2) à 4, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 37, 40, 45 et 50°C (Pérez-Davó *et al.*, 2015).

✓ **pH**

Le pH de croissance a été déterminé par ensemencement sur HM solide (concentration saline finale appropriée) à pH variable (4 à 9) avec un intervalle de 0,5 ajusté avec trois solutions tampons différentes (concentration finale, 10 mM) : tampon acétate, pH 4-5,5 ; tampon phosphate, pH 6,0 à 8,0 ; Tampon Tris, pH 8,5-10.

✓ **Utilisation de substrats carbonés**

L'utilisation des substrats carbonés comme seule source de carbone et d'énergie a été étudiée sur milieu salé de base décrit par Subov (1931) (concentration saline finale appropriée pour chaque isolat) dépourvus de toute source organique, additionné de NH₄Cl (0,5 g/l), KH₂PO₄ (0,005 g/l), dont le pH a été ajusté à 7,2. Les substrats ont été ajoutés au milieu à une concentration finale de 1% pour les sucres et 0,1% pour les alcools, les acides organiques et les acides aminés (Ventosa *et al.*, 1992 ; Oren *et al.*, 1997b). Les différents substrats carbonés testés sont : arabinose, cellulose, fructose, galactose, glucose, lactose, tréhalose, maltose, mannose, raffinose, ribose, sucrose, xylose, adonitol, dulcitol, glycérol, mannitol, sorbitol, citrate, fumarate, malate, lactate, pyruvate, succinate, arginine, alanine, acide aspartique, cystine, lysine, leucine, méthionine. Après inoculation et incubation de 5 à 20j à 30°C, la croissance a été estimée par l'apparition de turbidité sur tube contenant les différentes sources nutritionnelles par rapport à celle obtenue sur le milieu sans source (témoin négatif).

✓ **Production d'acides à partir de substrats carbonés**

La production d'acides à partir des sucres et d'alcools a été vérifiée sur les milieux liquides précédemment décrits non tamponnés et additionnés de rouge de phénol. L'acidification des milieux après culture est indiquée par virage de couleur au jaune.

✓ **Autres tests biochimiques**

L'hydrolyse de l'ADN, amidon, caséine, esculine, gélatine a été réalisée selon les méthodes décrites par Frazier (1926) ; Jeffreis *et al.* (1957) ; Gonzalez *et al.* (1978) et Montalvo-Rodriguez *et al.* (1998). L'hydrolyse du Tween 20, du Tween 40, et du Tween 80 a été testée selon la technique de Sierra, (1957). La production de la catalase et du cytochrome oxydase ont été déterminée selon le protocole de Lee *et al.* (1994). La réduction des nitrates a été examinée par utilisation d'acide sulphanilique et α -naphtylamine selon Smibert *et Krieg* (1981).

4.3. Étude phylogénétique

4.3.1. Extraction de l'ADN total (Technique de Marmur, 1961)

Des cultures représentatives de bactéries et archées en phase exponentielle ont été préparées sur 400mL du bouillon HM additionné de sel total approprié. Les cellules ont été ensuite récupérées par centrifugation à 4°C pendant 30minutes à 8000rpm (Centrifugeuse BEKMAN GS-15R), et l'ADN génomique a été extrait selon un protocole adapté d'une part et d'autre pour les bactéries et archées (Marmur, 1961). Le culot a été lavé deux fois par une solution saline (25%) pour archée et (10%) pour bactérie suivi d'une centrifugation de 30min à 8000 rpm. Le culot a été dissous dans 50 ml d'eau MilliQ stérile additionnée de SDS à 25 % (p/v) afin d'avoir une concentration finale de 1 % et 200µl de lysozyme à une forte concentration de (10mg/ml) (cas de bactéries). Le tout a été placé dans un bain marie à 60°C pendant 10 minutes. Une solution de NaCl 5M a été rajoutée pour avoir une concentration finale de 1M suivi d'addition d'un volume de (chloroforme/alcool isoamélique) (20:1, v/v). L'ensemble a été mis sous agitation pendant 30min suivi d'une centrifugation à 8000rpm/15min. 0,1 volume d'acétate-Na (3 M, pH 5,2) et 0,56 volume d'isopropanol ou (2V d'éthanol) froid a été rajoutés au surnageant. Le tout a été placé à -80°C durant 1h, et l'ADN a été récupéré/suspendu dans 1ml de citrate de sodium (1X de SSC). 50µl d'une solution d'ARNase (60µg/ml) a été ajoutée et l'ensemble a été incubé pendant 1 heure à 60°C. Après refroidissement, 50µl d'une solution de protéinase K (10mg/ml) a été additionnée suivi d'une incubation à 37°C pour 1 heure. Un volume de (chloroforme, alcool isoamélique, phénol/ 24:1:1) a été ajouté, suivi d'une centrifugation pendant 15 minutes à 7000rpm et le surnageant a été récupéré dans un nouveau tube eppendorf (2ml). Finalement, l'ADN a été extrait par l'ajout de 0,1 volume d'acétate-Na et 0,56 volume d'isopropanol froid (ou 1 volume d'éthanol). Le mélange a été incubé à froid (-80°C/1h) ou (-20°C/24h). L'ADN précipité a été récupéré par centrifugation à 13000rpm/15min puis suspendu dans 500µl d'eau MilliQ stérile après évaporation et séchage sous hotte à une température ambiante. La quantité et la pureté de l'ADN ont été ensuite mesurées puis conservé à - 20°C pour utilisations ultérieures.

4.3.2. Détermination du GC%

Le contenu en GC (%) d'un ADN génomique a été déterminé par la mesure de la température de fusion (T_m /melting temperature) dans le cas de la dénaturation pour pouvoir effectuer ultérieurement une hybridation ADN-ADN. En chauffant une solution d'ADN, les liaisons sont rompues et parallèlement la densité optique de la solution à 206nm augmente en sigmoïde. La séparation des chaînes s'accompagne d'une augmentation sensible de l'absorbance

(absorption maximale de l'ADN), ce qui peut être facilement mesuré par spectrophotomètre. Quand un échantillon d'ADN se réchauffe progressivement, le point d'inflexion de la courbe détermine la T_m 50% de l'ADN à simple brin. La T_m est d'autant plus élevé que le GC% est grand (Marmur et Dotey, 1962).

Le contenu en GC a été déterminé graphiquement par la méthode Ferragut et Leclerc (1976) à partir du T_m selon l'équation d'Owen et Hill (1979). 1 μ l de l'ADN à analyser a été mis en suspension dans 1ml d'un tampon SSC 1X (0,15 M NaCl et 0,015 M tri-sodium citrate, pH 7,0). La solution d'ADN a été ensuite chauffée progressivement de (30°C à 105°C) dans un système analyseur, programmeur de température et enregistreur de type recorder R100A couplé à un spectrophotomètre de type Perkin-Elmer UV-Vis Lambda 3B. Les changements d'absorbance ont été enregistrés chaque 2°C d'élévation et le contenu en G+C a été calculé après traçage de la courbe de dénaturation comme suit :

$$T_m = 69,3 + 0,41 (G+C) \text{ mol \%}$$

4.3.3. Réaction de polymérisation par PCR

A. Amplification des séquences des ADNr

Le gène codant pour l'ARNr 16S a été amplifié par PCR élective *in vitro* par l'utilisation des couples d'amorces spécifiques aux archées composés d'une amorce directe la **D30** et la reverse **D56** (Arahal *et al.*, 1996), ainsi que l'amorce directe **16F27** et la reverse **1525R** utilisées pour les eubactéries (Aguilera *et al.*, 2001).

B. Amplification/séquençage du gène de ménage *rpoB*

Le gène de la sous unité B de l'ARN polymérase (*rpoB*) (1827–1842pb) est également intéressant comme molécule cible ou marqueur génétique supplémentaire pour l'analyse phylogénétique. Il a été montré qu'il convient davantage à l'identification des archées halophiles (du moins en l'état actuel des connaissances) (Minegishi *et al.*, 2010). Chez les membres des *Halobacteriaceae*, la sous-unité B est l'un des composants importants de l'appareil de transcription et le gène (*rpoB*) est un gène hautement conservé en une seule copie chez l'ensemble de toutes les archées (Acinas *et al.*, 2004).

Le gène codant pour la sous unité B a été amplifié par PCR en utilisant le mélange réactionnel suivant [HotStarTaq@MasterMix (Qiagen) (ADN Polymérase HotStarTaq ; 5Unités/ μ l; tampon PCR (1X); dNTP, 20mM; MgCl₂, 25mM) (**12,5 μ l**); ADN (**50-200ng/4-5 μ l**), H₂O (MilliQ) (**qsp 21 μ l**)]. Deux couples d'amorces ont été utilisés (Tableau 5) pour l'amplification à raison de 4 μ l, **HrpoB2/1420F** et **HrpoA/153R** (Minegishi *et al.*, 2010). Les

cycles de PCR ont commencé par une étape de dénaturation initiale (7 min, 96°C) suivie de 35 cycles de dénaturation (1 min, 96°C), d'hybridation (1 min, 48°C) et de polymérisation (2,5 min, 72°C), suivie d'une dernière étape d'extension ou fin d'amplification (7 min, 72°C). Les produits de la PCR ont été ensuite visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose pour être envoyés au séquençage après purification.

Les fragments d'ADN purifiés ont été séquencés en utilisant le kit de séquençage BigDye Terminator (Applied Biosystem) un séquenceur d'ADN type PRISM TaqDye Deoxy "Applied Biosystems". Six amorces de séquençage ont été utilisées dans cette étude : HrpoB-458F, HrpoB-671R ; HrpoB-721F ; HrpoB-1148F ; HrpoB-1166R ; HrpoB-1457R.

Tableau 5. Séquences des amorces pour amplification/séquencage du *rpoB*

Amorce	Séquence (5'-3')	Amplicon	Spécificité	Utilisation
HrpoB2 1420F HrpoA 153R	TGTGGGCTNGTGAAGAACTT GGGTCCATCAGCCCCATGTC	1830pb		Amplification
HrpoB-458F HrpoB-671R	TTACSATGGGNKCRGGGATG GCGTCCTCGATGTTGAANCCC			
HrpoB-721F HrpoB-1148F	TTCTCCGNCANTACGAGGG AGGAGGACATGCCNTTYACC	1830pb	Archée	Séquencage
HrpoB-1166R HrpoB-1457R	GTRAASGGCATGTCCTCTG ACCATGTGRTASAGYTTSTG			

(K= G ou T ; R = G ou A ; Y = T ou C ; S=G ou C, N= ATCou G)

4.3.4. Analyses phylogénétiques

L'analyse phylogénétique a été réalisée en utilisant la version 6 du logiciel MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (Tamura *et al.*, 2013) et les séquences complètes de gènes de l'ADNr 16S et *rpoB* ont été alignées en utilisant le programme CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994) contre des séquences correspondantes des bases de données du serveur EzTaxon pour ARNr (Kim *et al.*, 2012) et GenBank pour *rpoB*. Des matrices de distances évolutives ont été générées et des arbres phylogénétiques ont été construits en utilisant la méthode d'assemblage voisin (*Neighbor-joining method*) (Saitou and Nei, 1987). Les topologies et la validation des liens phylogénétiques ont été évaluées par re-échantillonnage (*Bootstrap*) exprimé en pourcentage de 1000 répétitions (Felsenstein, 1985).

4.3.5. Hybridation ADN-ADN

Il est indiqué que la méthode d'identification définitive d'une espèce est l'hybridation de l'ADN-ADN (Tindall *et al.*, 2010). Les autres techniques moléculaires qui utilisent également le génome entier, fournissent des informations qui confirment les données obtenues avec la

réassociation ADN-ADN entre deux souches, mais sont trop nouvelles pour avoir été universellement acceptées et incluses dans le processus de classification et de délimitation d'une espèce.

Cette méthode consiste en la réassociation des brins linéaires complémentaires d'ADN cibles et les brins de la sonde marquée. La méthode utilisée est celle préconisée par De Ley *et al.* (1970) modifiée par Huss *et al.* (1983). Le but est d'hybrider deux ADN de deux souches proches, en calculant par la suite, le pourcentage de renaturation entre les deux ADN. La technique d'hybridation utilisée est celle d'absorption d'ADN marqué sur un gel de phosphate de calcium ou l'hydroxyapatite $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ décrite par Urdain(2008) et qui est une modification de la technique de Lind et Ursing (1986). Elle consiste à utiliser le kit DIG-DNA (Nick translation Kit) (Roche®) pour faire un double marquage de la sonde par la digoxygénine-11-2'-dioxo-uridine-5'-triphosphate (DIG-11- dUTP) et la biotine 16-2'-dioxo-uridine-5'-triphosphate (biotine-16-dUTP). La détection a été basée sur l'utilisation d'anticorps anti-digoxygénine ayant une activité phosphatase alcaline (Anti-DIG-AP) qui se fixent sur des dNTP marqués à la digoxygénine (DIG) contenus dans la sonde. La phosphatase alcaline avec un substrat, le para-nitrophénylphosphate induit l'apparition d'une couleur jaune, révélant ainsi le fragment nucléotidique recherché (Partie complémentaire placée en annexe (2) pour détail d'analyse).

CHAPITRE 3

‘Résultats et Discussion’

I.

“Analyse métagénomique de la diversité microbienne des écosystèmes hypersalés”

Étude de l'effet des paramètres physicochimiques des sols hypersalés
(Chotts) sur la diversité microbienne (Eubactéries et Archées
halophiles)

II.

*“Diversité de la flore halophile et
halotolérante (Eubactérienne/Archéenne)
viables et cultivables des écosystèmes
hypersalés (Chott et Sebkha, Nord-est
Algérien”*

Les résultats de cette partie sont structurés en trois volets traitant la diversité de manière culture-dépendante des procaryotes halophiles «archées halophiles extrêmes, eubactéries halophiles et halotolérantes non actinomycètes et actinomycètes halophiles». Pour ce faire, vingt huit échantillons de sédiments (Sol) des Sebkhass et Chotts ont été sélectionnés pour une mise en culture sur deux milieux spécifiques salés. Les isolats ont finalement été prélevés et identifiés par séquençage de l'ADN codant pour l'ARNr 16S. En parallèle, un criblage des activités biologiques à intérêt biotechnologique (recherche des enzymes hydrolytiques, résistance aux métaux lourds et antagonisme antifongique) ont été aussi évaluées pour l'ensemble des isolats en respectant les méthodes détaillées (partie matériel et méthodes).

La diversité cultivable archéenne et eubactérienne (non actinomycètes) halophile et halotolérante a été présentée par deux articles publiés dans «*Microbiological Research*» et «*World Journal of Microbiology and Biotechnology*» :

- [1]. **Menasria T et al. 2018.** Diversity and bioprospecting of extremely halophilic archaea isolated from Algerian arid and semi-arid wetland ecosystems for halophilic-active hydrolytic enzymes. *Microbiol Res*; 207: 289-298. doi.org/10.1016/j.micres.2017.12.011
- [2]. **Menasria T et al. 2019.** Culturable halophilic bacteria inhabiting Algerian saline ecosystems: A source of promising features and potentialities. *World J Microbiol Biotechnol* ; 35(9): 1-16. [doi.org/ 10.1007/s11274-019-2705-y](https://doi.org/10.1007/s11274-019-2705-y)

1. Paramètres physicochimiques des sols prélevés

Le choix du site d'échantillonnage constitue un paramètre déterminant pour les études de la diversité taxonomique et même biotechnologique. Plusieurs nouveaux taxons ont été décrits dans des écosystèmes peu ou pas exploités notamment des souches halophiles produisant des molécules d'intérêt biotechnologique (Kharroub, 2007).

Vingt huit échantillons de sols ont été prélevés au niveau de sept sites différents constituant des environnements extrêmes salés à raison de quatre prélèvements par site. Ces échantillons ont servis pour l'isolement des halophiles. Les paramètres (pH et conductivité) de chaque prélèvement sont représentés dans tableau 9.

Les paramètres étudiés montrent une variabilité d'un échantillon à l'autre. Les résultats montrent que les pH varient de 6,8 à 8,03. En générale, la mesure du pH est en relation étroite avec la température et la conductivité (Rodier, 1996). La conductivité des échantillons varie de 22,1 à 180 ms/cm. La mesure du pH et de la conductivité pour les différents prélèvements montre que les sols des Chotts et Sebkhass en période estivale représente les caractéristiques des sols (salés à hyper salés) avec un pH légèrement alcalin à alcalin selon la classification de Durand (1983) (Annexe 4-Tableaux 1 et 2).

Tableau 9. Valeurs moyennes du pH et de la conductivité électrique des sols analysés

Site/prélèvement	Date	pH	CE ms/cm	Site/prélèvement	Date	pH	CE ms/cm		
	01	06/2016	8,2±0,2	39,5±2	Chott	15	07/2016	8,0±0,2	58,3±2,1
Chott El	02	06/2016	7,6±0,2	40,3±2,5	Tinsilt	16	07/2016	8,1±0,1	54,3±4
Beïdha	03	06/2016	8,1±0,1	120±4		17	07/2016	8,0±0,2	23,5±1
	04	06/2016	7,8±0,3	192±5	Sebkha	18	07/2016	7,8±0,2	22±1,2
	05	06/2016	8,1±0,2	25,2±1,5	Djendli	19	07/2016	7,8±0,4	32±2
Sebkha El	06	06/2016	7,6±0,2	28,5±0,5		20	07/2016	7,6±0,3	38±0,5
Hamiet	07	06/2016	7,8±0,3	38±1,5		21	07/2016	7,5±0,1	62,5±3
	08	06/2016	8,0±0,1	35±2,5	Chott	22	07/2016	7,7±0,3	75,1±1,5
	09	06/2016	7,2±0,0	55±2,25	Karalla	23	07/2016	7,9±0,1	151±4,2
Sebkha	10	06/2016	8,3±0,1	42,5±2,5		24	07/2016	7,2±0,3	180±5,1
Medghassen	11	06/2016	7,6±0,3	62±3,2		25	06/2016	6,9±0,3	28±0,5
	12	06/2016	7,7±0,3	92,1±3,5	Sebkha	26	06/2016	8,3±0,2	38±1
Chott	13	07/2016	7,8±0,2	22,4±3,2	Oumache	27	06/2016	6,8±0,3	42±1,2
Tinsilt	14	07/2016	7,8±0,1	49,1±5,6		28	06/2016	7,2±0,3	35±2

Les données rapportées en bibliographie sur la nature et la composition des sols des Chotts et Sebkhas de l'écocomplexe de zones humides de la région des Hauts Plateaux (Nord-Est de l'Algérie) indiquent des propriétés communes; sols salés à très salés ($CE_{moy} = 36,6 \pm 2,44$ mS/cm), pH neutre à alcalin (6,9-8,1), une importante minéralisation, et un faciès chimique qui présente un contenu important en chlorures et sulfates, avec de légères teneurs en bicarbonate (Aliat *et al.*, 2016).

Ces sols accumulent de grandes quantités de sels solubles, liés à la rareté de la pluie qui empêche l'infiltration (Rengasamy, 2006), alors qu'en présence d'eau, la dissolution des sels et la remontée capillaire sont rapides en raison de la forte évaporation. Cela conduit à des sols salins avec des complexes de calcium où certains de leurs sels dissous sont facilement amenés à la surface et d'autres sont précipités (FAO, 2005). Il semble donc que l'aridité du climat dans cette région de l'Algérie favorise la concentration de solutions et la cristallisation des sels à la fois en surface et en profondeur. Selon Biggs *et al.* (2010), la variabilité de la salinité et d'autres caractéristiques dépend de l'hydropédologie et de la géomorphologie de l'habitat. Ces paramètres influencent grandement la structure et l'abondance des communautés microbiennes notamment les halophiles (Fierer *et al.*, 2003).

2. Isolement et sélection des halophiles

Les échantillons de sol salés ont été servis comme matrice pour l'isolement des bactéries (Eubacteries et Archées) aérobies halophiles sur deux milieux de cultures solides. Au terme de trois semaines d'incubation à 35°C, deux à trois colonies par échantillons et par milieu ont été

sélectionnées. Comme il est difficile de différencier les colonies d'archées de celles des bactéries, plusieurs colonies (représentatives de la variabilité morphologique) ont été choisies afin de maximiser les différences phénotypiques entre elles pour chacun des milieux. L'ensemble des colonies ont été purifiées par repiquage au moins deux fois sur le même milieu d'isolement. Le choix de la température d'isolement est justifié par le fait que la plus part des halophiles aérobies sont mésophiles à thermotolérantes possédant des températures de croissance optimales entre 30 à 40°C (Oren, 2004)

La purification des cultures a été vérifiée par observation microscopique après coloration de Gram. Une collection de 300 isolats a été retenue au premier isolement et après purification 171 isolats ont été retenus pour une identification moléculaire et analyse du potentiel biochimique. Les caractères cultureux et microscopiques de l'ensemble des isolats sont présentés dans le (Tableau 10).

Les colonies produites chez les isolats suspectés archées halophiles (**68 isolats**) sont généralement rondes d'un diamètre d'environ 1 à 2 mm dans l'ensemble, mucoïdes, translucides après 7 à 10 jours d'incubation à 35 °C sur le HM additionné de 15-30% (Figure 22). Elles sont toutes opaques pigmentées en rouge, rose, pourpre ou orange. La pigmentation est l'un des caractères déterminant des archées halophiles extrêmes qui est due à la présence d'un pigment de type caroténoïde (bactériorubérine) (Oren, 2006b). Une variation de pigmentation des colonies a été notée chez ces isolats extrêmes en fonction de la salinité des milieux de culture, où elle devient moins intense avec l'augmentation de la concentration des sels dans le milieu. La coloration de Gram a donné un résultat négatif pour l'ensemble de ces isolats, avec des formes cellulaires variables allant des formes sphériques aux bâtonnets réguliers et irréguliers, même des cellules pléomorphes.

Pour les isolats à croissance rapide (24-48h) (**74 isolats**) suspectés eubactéries halophiles, la plupart forment sur HM (2,5-10%) des colonies crémeuses, mucoïdes et translucides avec une pigmentation blanche, jaune pâle ou orange et par fois opaques, à surface lisse, circulaires, à bords réguliers, dont le diamètre varie de 1 à 4 mm. En dépit de leur très grande diversité et variabilité morphologique, un nombre important d'halophiles à Gram positif, de forme allongée en bâtonnets, formant des endospores, à extrémités arrondies et souvent disposés en paires ou en chaînettes ont été isolés. Ces bactéries ont une tendance à voir une croissance rapide sur milieux de culture ordinaires riches additionnés de peptone, extrait de viande, extrait de levure, glucose, etc (Oren, 2011). D'autres formes coccoïdales et coccobacillaires ont été aussi observées.

Un autre aspect a été noté chez des isolats qui ont formé après 15 jours d'incubation à 35°C sur HM (10-15%), des colonies à croissance mycélienne de taille et couleur variables. Ces

bactéries ont présenté des mycéliums aériens (blanchâtre à blanc beige, gris et marron), mycéliums de substrat (non coloré ou de couleur jaune clair) ainsi que certains isolats ont montré une production de pigments diffusibles dans le milieu (marron et bleu/violacé), qui peuvent être des pigments de type mélanoides (Barka *et al.*, 2016).



Figure 22. Différents aspects phénotypiques des halophiles (Archées) après mise en culture sur gélose (HM20%).

3. Fréquence d'isolement et répartition des isolats halophiles

Lors de l'étude de la flore microbienne halophile des milieux extrêmes salés, il s'avérait que 28.1% soit (40/142) de la totalité des souches proviennent des sols du Chott El Beida (CHS), suivie de Sebkhya Medghassen (SMD), Sebkhya Djendli (SDJ) et Sebkhya Karalla (SKA) avec 15,79%, 14,62% et 14,04% respectivement (Figure 23B). Une fréquence d'isolement de 14,7% soit (21/142) a été notée à partir des échantillons telluriques du Chott Tinsilt (CTI) et 14,0% (20/142) de Sebkhya ElHamiet (SEH). En dernière position, Sebkhya Oumache (SOM) a présentée un faible taux d'isolement avec seulement 7.04% soit (10/142) de l'ensemble des isolats.

Une très grande variabilité de richesse en archées et eubactéries halophiles et halotolérantes a été notée en fonction des sols prélevés, de milieu et de la concentration en sel total utilisée (Tableau 10). Ces résultats démontrent que la distribution des souches sur la totalité des sols est faite de manière hétérogène. Ceci pourrait être expliqué par les : (i)

conditions physicochimiques des sols salés qui influenceraient fortement la flore microbienne qualitativement et quantitativement, mais aussi et surtout (ii) la disponibilité en matière organique (richesse/pauvreté) des échantillons collectés, et (iii) conditions de culture utilisées (milieu, T°C, pH...). Il est ainsi clair que ces facteurs ne sont pas les seuls acteurs qui gèrent la variété de la population microbienne, mais aussi la capacité de certains microorganismes qualifiés extrémophiles capables à supporter des conditions extrêmes notamment en matière nutritives et autres. Il a été signalé que l'abondance et la richesse des communautés microbiennes des environnements salés et hyper salés sont variables d'un environnement à un autre (Amoozegar *et al.*, 2017).

Les résultats font apparaître une variation en fréquence d'isolement des archées dont le milieu HM à 20% de sel total permet l'isolement spécifique des archées halophiles extrêmes (75% de l'ensemble des isolats) par rapport aux eubactéries (Figure 23A). Cette classe de microorganisme est considéré comme halophile strict par excellence, aérobie en générale qui requièrent des concentrations en sels supérieures à 15% pour leur prolifération dont leur optimum de croissance varie de 3,4 à 4,2M de sel (20-25%, p/v) (Oren, 2011). Dans l'ensemble les halobactéries subissent des dommages irréversibles voir une lyse cellulaire, si la concentration saline est inférieure à 10%.

En ce qui concerne les bactéries non actinomycètes, le milieu HM additionné de (2,5 ; 5 ; 7,5 et 10% de sel total) permet la croissance et l'isolement de la totalité des bactéries contrairement aux milieux HM à forte concentration > 15%. En effet, le milieu HM à (5 et 10%) a favorisé une croissance sélective de 31,1% et 52,7% de la totalité des bactéries aérobies isolées respectivement. Le domaine *Bacteria* regroupe la plus grande diversité des halophiles qui sont majoritairement représentées par des espèces halotolérantes et halophiles modérées (dont leur optimum de croissance varie de 3 à 15% p/v de sel) que des halophiles extrêmes (Anton *et al.*, 2002). Elles sont identifiées dans de nombreux phyla répartissant dans un grand nombre de groupes phylogénétiques très hétérogènes (de la Haba *et al.*, 2011). Toutefois, la plupart des bactéries halophiles modérées pouvant être aussi bien à Gram positif, qu'à Gram négatif, hétérotrophes, aérobies ou anaérobies facultatives. Les résultats révèlent qu'un nombre de **16**(21,6%), **12**(16,2%), **11**(14,8%), **10**(13,51%), **10** (13,51%), **8**(10,8%) et **7**(9,4%) bactéries ont été respectivement isolées des sols de CHS, SDJ, CTI, SMD, CKA, SEH et SOM (Figure 23C, et D).

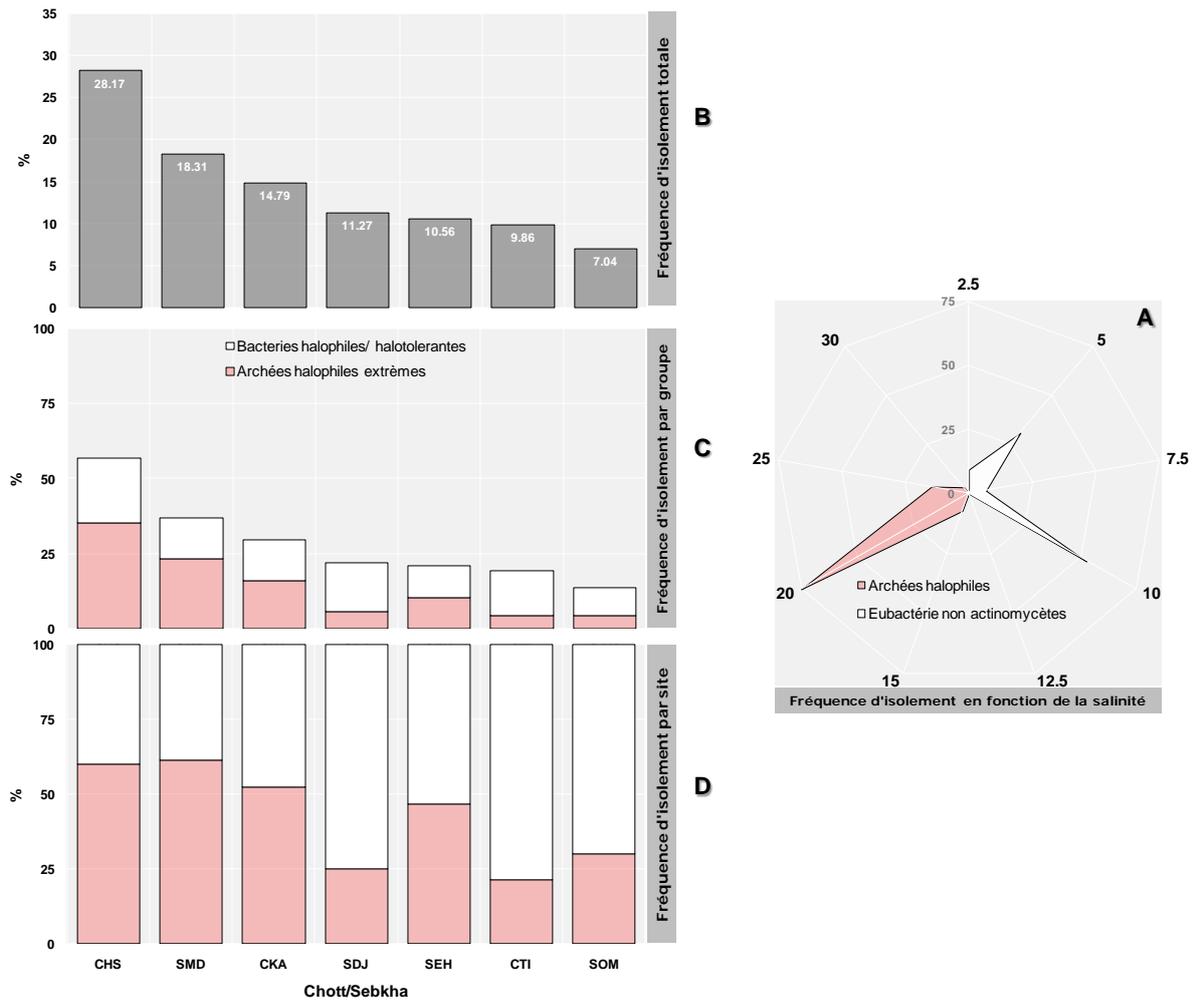


Figure 23. Fréquence d'isolement des halophiles en fonction de la salinité du milieu (A), Fréquence d'isolement totale (B), par groupe de microorganismes (C), et par site de prélèvement (D). Sebkhja Djendli (SDJ), Sebkhja Medghassen (SMD), Chott Tinsilt (CTI), Chott El Beïdha–Hammam Essoukhna (CHS), Sebkhjet El Hamiet (SEH), Sebkhja Oumache (SOM), Chott Karalla (CKA).

Tableau 10. Milieu d'isolement et caractères microscopiques des isolats

Isolat	Site	Milieu %	Gram	Forme	Isolat	Site	Milieu %	Gram	Forme	Isolat	Site	Milieu%	Gram	Forme	Isolat	Site	Milieu%	Gram	Forme
ArCHS3	CHS	20	-	P	ArCTI2	CTI	20	-	P	BSDJ19	SDJ	10	+	Ba	ArKAR4	KAR	25	-	C
ArCHS4	CHS	15	-	P	ArCTI4	CTI	20	-	P	BSDJ27	SDJ	5	+	C	ArKAR5	KAR	25	ND	P
ArCHS5	CHS	25	-	C	ArCTI1	CTI	20	-	C	BSDJ31	SDJ	2.5	+	Ba	ArKAR6	KAR	20	-	P
ArCHS6	CHS	30	-	C	BCTI2	CTI	5	+	CB						ArKAR7	KAR	20	-	P
ArCHS7	CHS	30	-	C	BCTI5	CTI	2.5	ND	CB	ArSMD2	SMD	15	-	C	ArKAR8	KAR	15	ND	P
ArCHS8	CHS	20	-	P	BCTI7	CTI	5	+	Ba	ArSMD4	SMD	20	-	C	ArKAR9	KAR	20	-	P
ArCHS9	CHS	20	ND	P	BCTI10	CTI	5	+	Ba	ArSMD5	SMD	25	-	P	ArKAR10	KAR	20	-	C
ArCHS10	CHS	20	-	P	BCTI11	CTI	2.5	+	Ba	ArSMD6	SMD	25	-	P	ArKAR11	KAR	20	-	C
ArCHS11	CHS	20	-	C	BCTI13	CTI	5	-	Ba	ArSMD7	SMD	20	-	P	ArKAR12	KAR	20	-	P
ArCHS13	CHS	20	-	C	BCTI15	CTI	5	ND	Ba	ArSMD8	SMD	20	-	C	BKAR1	KAR	5	+	Ba
ArCHS14	CHS	20	-	Ba	BCTI17	CTI	2.5	+	CB	ArSMD9	SMD	25	-	C	BKAR5	KAR	10	+	Ba
ArCHS15	CHS	20	ND	Ba	BCTI18	CTI	2.5	+	CB	ArSMD10	SMD	25	-	Ba	BKAR6	KAR	10	+	Ba
ArCHS16	CHS	20	-	C	BCTI19	CTI	5	-	Ba	ArSMD11	SMD	20	-	Ba	BKAR10	KAR	7.5	+	Ba
ArCHS17	CHS	20	-	C	BCTI20	CTI	5	+	Ba	ArSMD12	SMD	20	-	C	BKAR13	KAR	10	+	Ba
ArCHS18	CHS	25	-	C						ArSMD13	SMD	20	-	C	BKAR14	KAR	10	+	Ba
ArCHS19	CHS	20	-	P	ArSEH1	SEH	20	-	C	ArSMD14	SMD	15	-	C	BKAR17	KAR	10	-	CB
ArCHS20	CHS	20	-	P	ArSEH2	SEH	20	-	C	ArSMD16	SMD	20	-	P	BKAR18	KAR	5	+	Ba
ArCHS21	CHS	20	-	P	ArSEH5	SEH	20	-	P	ArSMD17	SMD	20	-	P	BKAR21	KAR	5	+	Ba
ArCHS22	CHS	20	-	P	ArSEH6	SEH	20	-	P	ArSMD18	SMD	20	-	P	BKAR23	KAR	10	-	Ba
ArCHS23	CHS	20	-	P	ArSEH4	SEH	20	ND	P	ArSMD20	SMD	20	-	P					
ArCHS24	CHS	20	-	Ba	ArSEH3	SEH	15	-	C	BSMD4	SMD	10	-	Ba					
ArCHS25	CHS	20	-	C	ArSEH7	SEH	20	-	C	BSMD5	SMD	10	-	C					
ArCHS26	CHS	20	-	C	BSEH2	SEH	10	+	Ba	BSMD10	SMD	10	-	BC					
ArCHS27	CHS	25	-	P	BSEH3	SEH	10	-	Ba	BSMD14	SMD	10	+	C					
BCHS1	CHS	10	+	B	BSEH4	SEH	5	+	Ba	BSMD15	SMD	10	+	P					
BCHS2	CHS	5	-	CB	BSEH5	SEH	5	-	Ba	BSMD16	SMD	10	+	Ba					
BCHS3	CHS	10	+	Ba	BSEH7	SEH	5	+	Ba	BSMD18	SMD	2.5	-	C					
BCHS5	CHS	5	-	Ba	BSEH8	SEH	7.5	+	Ba	BSMD19	SMD	10	-	CB					
BCHS6	CHS	5	+	Ba	BSEH9	SEH	7.5	-	Ba	BSMD20	SMD	10	+	Ba					
BCHS8	CHS	10	+	Ba	BSEH10	SEH	10	+	Ba	BSMD21	SMD	10	+	Ba					
BCHS12	CHS	10	+	Ba															
BCHS14	CHS	5	-	CB	ArSDJ7	SDJ	20	-	P	ArSOM1	SOM	20	-	P					
BCHS15	CHS	5	-	CB	BSDJ1	SDJ	10	+	Ba	ArSOM4	SOM	20	-	P					
BCHS20	CHS	10	+	Ba	BSDJ2	SDJ	10	+	C	ArSOM5	SOM	20	-	P					
BCHS21	CHS	7.5	+	Ba	BSDJ3	SDJ	5	-	C	BSOM3	SOM	10	-	CB					
BCHS22	CHS	7.5	+	Ba	BSDJ5	SDJ	5	+	Ba	BSOM4	SOM	10	+	Ba					
BCHS24	CHS	10	-	Ba	BSDJ10	SDJ	10	+	Ba	BSOM5	SOM	10	+	Ba					
BCHS25	CHS	2.5	+	Ba	BSDJ12	SDJ	10	-	Ba	BSOM8	SOM	10	+	Ba					
BCHS26	CHS	5	+	Ba	BSDJ14	SDJ	10	+	CB	BSOM9	SOM	10	+	Ba					
BCHS31	CHS	5	+	Ba	ArSDJ1	SDJ	20	-	CB	BSOM11	SOM	10	+	Ba					
					BSDJ16	SDJ	10	+	Ba	BSOM12	SOM	10	+	Ba					
					BSDJ18	SDJ	10	+	Ba										
					ArSDJ2	SDJ	20	-	C	ArKAR2	KAR	20	-	C					
					ArSDJ3	SDJ	20	-	C	ArKAR3	KAR	25	-	C					

Ba. Bactérie, **Ar.** Archée, **CHS.** Chott El Beida, **CTI.** Chott Tinsilt, **SEH.** Sebkhia Elhamiet, **SMD.** Sebkhia Medghassen, **SDJ.** Sebkhia Djendli, **KAR.** Chott Karalla, **SOM.** Sebkhia Oumache. **P.** Pléomorphe, **Ba.** Bâtonnet, **C.**Coccoïde, **ND.** Non déterminé

4. Identification moléculaire et analyse phylogénétique

La caractérisation morphologique est un paramètre utile lors de l'identification bactérienne par contre elle est déficiente quand à la différence entre les genres qui ont une similarité phénotypique élevée. Le séquençage du gène codant l'acide ribonucléique ribosomique (ARNr 16S) est l'outil de choix si les tests précédemment réalisés n'ont pas permis de définir le genre ou l'espèce auxquels appartient l'isolat bactérien. Un système d'identification mettant en jeu un gène plus variable est préférable si des critères d'orientation sont disponibles.

La plupart des techniques mises en œuvre sont basées sur l'utilisation de l'amplification génique (*polymerase chain reaction* [PCR]) couplée à une réaction de séquençage du fragment obtenu par la technique de Sanger (Kirk *et al.*, 2004). Le séquençage de l'ADNr 16S a été largement étudié afin de déterminer la position taxonomique d'un grand nombre de microorganisme. Le séquençage du gène codant l'ADNr 16S a été effectué sur le brin sens et anti sens de la séquence d'ADN. Ces séquences ont été par la suite traitées avec le logiciel 'Bioedit Sequence Alignment Editor' pour avoir une séquence consensus. Cette dernière a été comparée à deux banques de donnée génomique (GenBank et EzTaxon) afin d'affilier chaque isolat au groupe phylogénétique le plus proche et d'établir le pourcentage de similarité.

L'amplification par PCR du gène ADNr 16S a été réalisée pour l'ensemble de la collection de procaryotes halophiles et halotolérantes (Archées, Bactéries). Les résultats de l'électrophorèse sur gel d'agarose ont montrés la présence de séquence d'ADN d'une taille d'environ 1,5 KB qui correspond à la taille de ce gène (Figure 24). L'identification bactérienne consiste à assigner à un isolat l'identité à une espèce précédemment décrite. La notion d'espèce bactérienne ne pouvant pas être calquée sur celle des êtres vivants sexués. Une définition moléculaire de l'espèce basée sur une communauté chromosomique d'homologie ADN : ADN > 70 % a été proposée et récemment, une recommandation d'homologie de séquence du gène ADNr 16s > 97 % a été proposée (Meier-Kolthoff *et al.*, 2013 ; Vandamme et Peeters, 2014). Ces critères mettent en évidence le fait que l'identification bactérienne repose nécessairement sur une taxonomie, qui est actuellement en transition vers une taxonomie phylogénique.

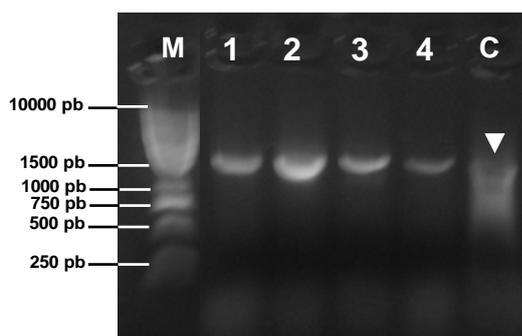


Figure 24. Profil de migration sur gel d'agarose des produits de PCR du gène ADNr16S de quatre isolats archéens. M : marqueur de taille (1kb), C : control positif.

4.1 Bactéries halophiles non actinomycètes

Soixante-quatorze (74) isolats provenant de sédiments salins ont été sélectionnés et soumis à un séquençage complet du gène de l'ARNr 16S (>1400pb). Les séquences et les résultats de l'analyse par BLASTn sont ainsi résumés dans le tableau 11. Les résultats montrent que l'ensemble des isolats appartenant à deux phylums : 52 souches du phylum *Firmicutes* (70,2%) et 22 souches (30,8%) de γ -*Proteobacteria*. Dans l'ensemble, les *Firmicutes* regroupent trois familles, *Bacillaceae*, *Planococcaceae* et *Staphylococcaceae*, dont 49 souches (94,2%) affiliées à la famille *Bacillaceae* avec neuf genres différents (*Bacillus*, *Halobacillus*, *Lentibacillus*, *Oceanobacillus*, *Paraliobacillus*, *Salibacterium*, *Thalassobacillus*, *Terribacillus* et *Virgibacillus*). En outre, la famille des *Planococcaceae* était représentée par un seul genre (*Planomicrobium*) et il n'y avait que deux souches appartenant à *Staphylococcaceae* dans le genre *Salinicoccus*.

Afin d'apporter une meilleure interprétation taxonomique, les résultats du BLASTn ont été couplé à une analyse phylogénétique. Les séquences du gène 16S obtenue ont été alignées avec celles des espèces types les plus proches et un arbre phylogénétique du gène 16S pour la collection des isolats halophiles a été construit par la méthode de Neibor-Joining afin de déterminer la position de chaque isolat par rapport aux souches types. Les associations phylogénétiques des isolats sont présentées séparément pour les *Firmicutes* et γ -*Proteobacteria* (Figures 25 et 26).

Les *Firmicutes* semblent être le groupe le plus dominant, comprenant des bactéries appartenant à différents genres, notamment *Bacillus* (34,6%) et *Halobacillus* (19,2%), suivis par *Oceanobacillus* et *Virgibacillus* avec 13,6% et 9,4% respectivement. Les γ -*Proteobacteria* étaient représentées par deux familles seulement, les *Halomonadaceae* et les *Idiomarinaceae*, dont 19 soit (86%) des souches étaient apparentées aux genres *Halomonas* et *Halovibrio*. En outre, seules trois souches étaient affiliées à *Idiomarina* et *Salicola* (bactéries halophiles extrêmes).

La comparaison de la composition bactérienne halophile des échantillons enquêtés a révélé des différences dans la structure de la diversité d'un biotope à un autre et leur nature devient claire lors de l'analyse. En ce qui concerne la fréquence d'isolement des bactéries halophiles par site, Chott El Beïdha (CHS) était classé en premier lieu avec (16 isolats différents) suivi de Sebkhâ Djendli (SDJ) (12 isolats) Chott Tinsilt (CTI) (11 isolats), Chott Karalla (CKA) (10 isolats), Sebkhâ Medghacen (SMD) (10 isolats), et pour Sebkhâ El Hamiet (SEH) et Sebkhâ Oumache (SOM) (8 isolats et 7 isolats), respectivement.

Tableau 11. Résultat du BLASTn et similarité des séquences ADNr 16S des eubactéries halophiles et halotolérantes isolées à partir de Chotts et Sebkhass sélectionnées

Site	Isolats	Souches apparentées (accession number)	Similarité (%)
Chott El Beïdha– Hammam Essoukhna (CHS) (N=16)	BCHS1	<i>Oceanobacillus picturae</i> LMG 19492 (AJ315060)	99,53
	BCHS2	<i>Halomonas cerina</i> SP4 (EF613112)	99,72
	BCHS3	<i>Bacillus atrophaeus</i> JCM 9070 (AB021181)	98,91
	BCHS5	<i>Halomonas caseinilytica</i> JCM 14802 (BDEP01000022)	100
	BCHS6	<i>Salinicoccus amylolyticus</i> JC304 (LN866629)	99,93
	BCHS8	<i>Virgibacillus salarius</i> SA-Vb1 (AB197851)	99,73
	BCHS12	<i>Bacillus hwajinpoensis</i> SW-72 (AF541966)	99,59
	BCHS14	<i>Salicola salis</i> B2 (DQ129689)	99,59
	BCHS15	<i>Pseudomonas halophila</i> DSM 3050 (AB021383)	99,93
	BCHS20	<i>Halobacillus locisalis</i> MSS-155 (AY190534)	99,53
	BCHS21	<i>Halobacillus alkaliphilus</i> FP5 (AM295006)	99,53
	BCHS22	<i>Halomonas fontilapidosi</i> 5CR (EU541349)	99,93
	BCHS24	<i>Idiomarina abyssalis</i> KMM227 (LGOW01000020)	99,93
	BCHS25	<i>Lentibacillus amyloliquefaciens</i> LAM0015 (CP013862)	97,31
	BCHS26	<i>Salibacterium halotolerans</i> S7 (LN812017)	97,88
	BCHS31	<i>Halobacillus litoralis</i> SL-4 (X94558)	99,6
Chott Tinsilt (CTI) (N=11)	BCTI2	<i>Halobacillus halophilus</i> DSM 2266 (HE71723)	99,46
	BCTI5	<i>Halomonas stenophila</i> N12 (HM242216)	99,66
	BCTI7	<i>Thalassobacillus cyri</i> CCM7597 (jgi,1102298)	100
	BCTI10	<i>Oceanobacillus manasiensis</i> YD3-56 (FJ386518)	99,25
	BCTI11	<i>Bacillus endophyticus</i> 2DT (AF295302)	99,86
	BCTI13	<i>Halomonas cerina</i> SP4 (EF613112)	99,58
	BCTI15	<i>Paraliobacillus quinghaiensis</i> YIM-C158 (EU135728)	99,10
	BCTI17	<i>Halobacillus alkaliphilus</i> FP5 (AM295006)	99,93
	BCTI18	<i>Bacillus salarius</i> BH169 (AY667494)	99,78
	BCTI19	<i>Salicola salis</i> B2 (DQ129689)	99,72
BCTI20	<i>Halobacillus dabanensis</i> D-8 (AY351395)	99,73	
Sebkhass Djendli (SDJ) (N=12)	BSDJ1	<i>Paraliobacillus quinghaiensis</i> YIM-C158 (EU135728)	99,13
	BSDJ2	<i>Halobacillus halophilus</i> DSM 2266 (HE71723)	99,46
	BSDJ3	<i>Halomonas nitroreducens</i> 11S (EF613113)	99,86
	BSDJ5	<i>Bacillus halotolerans</i> ATCC25096 (LPVF01000003)	100
	BSDJ10	<i>Oceanobacillus picturae</i> LMG 19492 (AJ315060)	99,53
	BSDJ12	<i>Halomonas stenophila</i> N12 (HM242216)	99,04
	BSDJ14	<i>Bacillus endophyticus</i> 2DT (AF295302)	100
	BSDJ16	<i>Halobacillus locisalis</i> MSS-155 (AY190534)	99,87
	BSDJ18	<i>Planomicrobium okeanokoites</i> IFO12536 (D55729)	99,25
	BSDJ19	<i>Halobacillus alkaliphilus</i> FP5 (AM295006)	99,39
	BSDJ27	<i>Bacillus atrophaeus</i> JCM9070 (AB021181)	99,66
	BSDJ31	<i>Lentibacillus persicus</i> Amb31 (FN376846)	98,77

Tableau 11. Suite

Site	Isolats	Souches apparentées (accession number)	Similarité (%)	
Sebkha El Hamiet (SEH) (N=8)	BSEH2	<i>Virgibacillus salarius</i> SA-Vb1 (AB197851)	99,87	
	BSEH3	<i>Halomonas cerina</i> SP4 (EF613112)	99,79	
	BSEH4	<i>Virgibacillus dokdonensis</i> DSW-10 (AY822043)	99,93	
	BSEH5	<i>Halomonas fontilapidosi</i> 5CR (EU541349)	98,16	
	BSEH7	<i>Salinicoccus amylolyticus</i> JC304 (LN866629)	99,93	
	BSEH8	<i>Paraliobacillus quinghaiensis</i> YIM-C158 (EU135728)	99,66	
	BSEH9	<i>Halomonas elongata</i> DSM2581 (FN869568)	100	
	BSEH10	<i>Thalassobacillus cyri</i> CCM7597 (jgi.1102298)	99,46	
	Chott Karalla (CKA) (N=10)	BSKA1	<i>Bacillus vallismortis</i> DV1-F-3 (JH600273)	99,8
		BSKA5	<i>Bacillus endophyticus</i> 2DT (AF295302)	100
BSKA6		<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> KCTC 13429(AMXN01000021)	99,86	
BSKA10		<i>Bacillus halotolerans</i> ATCC25096 (LPVF01000003)	100	
BSKA13		<i>Terribacillus aidingensis</i> NBRC105790 (jgi.1085072)	100	
BSKA14		<i>Virgibacillus kapii</i> KN3-8-4 (LC041942)	99,86	
BSKA17		<i>Halomonas sinaiensis</i> DSM18067 (BDEO01000021)	100	
BSKA18		<i>Bacillus aidingensis</i> 17-5 (DQ504377)	99,8	
BSKA21		<i>Oceanobacillus picturae</i> LMG19492 (AJ315060)	99,53	
BSKA23		<i>Halomonas ramblicola</i> RS-16 (GU726750)	99,02	
Sebkha Medghacen (SMD) (N=10)	BSMD4	<i>Halomonas koreensis</i> SS20 (AY382579)	99,86	
	BSMD5	<i>Halomonas elongata</i> DSM2581 (FN869568)	100	
	BSMD10	<i>Halomonas cerina</i> SP4 (EF613112)	99,79	
	BSMD14	<i>Virgibacillus salarius</i> SA-Vb1 (AB197851)	100	
	BSMD15	<i>Bacillus oceanisediminis</i> H2 (GQ292772)	99,93	
	BSMD16	<i>Bacillus haikouensis</i> C-89 (KF548480)	99,19	
	BSMD18	<i>Pseudomonas halophila</i> DSM3050 (AB021383)	99,52	
	BSMD19	<i>Halomonas fontilapidosi</i> 5CR (EU541349)	93,93	
	BSMD20	<i>Oceanobacillus picturae</i> LMG19492 (AJ315060)	99,33	
	BSMD21	<i>Bacillus paralicheniformis</i> KJ-16 (LBMN01000156)	99,92	
Sebkha Oumache (SOM) (N=7)	BSOM3	<i>Halomonas elongata</i> 1H9 (FN869568)	100	
	BSOM4	<i>Bacillus endophyticus</i> 2DT (AF295302)	99,93	
	BSOM5	<i>Oceanobacillus picturae</i> LMG19492 (AJ315060)	99,53	
	BSOM8	<i>Halobacillus dabanensis</i> D-8 (AY351395)	100	
	BSOM9	<i>Bacillus halotolerans</i> ATCC25096 (LPVF01000003)	99,80	
	BSOM11	<i>Oceanobacillus manasiensis</i> YD3-56 (FJ386518)	99,32	
	BSOM12	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> NRRL B-23049 (CP002905)	99,93	

Plusieurs études ont été menées sur l'écologie, la taxonomie et la phylogénie des bactéries halophiles extrêmes et /ou halotolérantes et récemment, leurs applications biotechnologiques (Oren 2002 ; Edbeib *et al.*, 2016). Les halophiles et les halophiles modérées sont isolés de différents environnements salins où la salinité dépasse 1,5M (environ 10%), y compris les eaux

hypersalines, les sols salins et d'autres niches écologiques. Cependant, à notre connaissance, ce travail s'agit du premier essai sur l'isolement de bactéries halophiles et halotolérantes à partir des écosystèmes salins (Chott et Sebkha) situées dans des zones climatiques arides et semi-arides au Nord-Est Algérien. Des bactéries appartenant à α -*Proteobacteria* et *Bacteroidetes*, qui ont déjà été isolés à plusieurs reprises dans des environnements similaires salins (Benlloch *et al.*, 2002), n'ont pas été détectés dans la présente étude et qu'ils nécessitent des stratégies ciblées afin de les isoler. Les différences enregistrées dans la présente étude par rapport à d'autres rapports pourraient être liées à des différences dans les conditions de culture, la composition du milieu et les techniques utilisées pour l'isolement (Burns *et al.*, 2004).

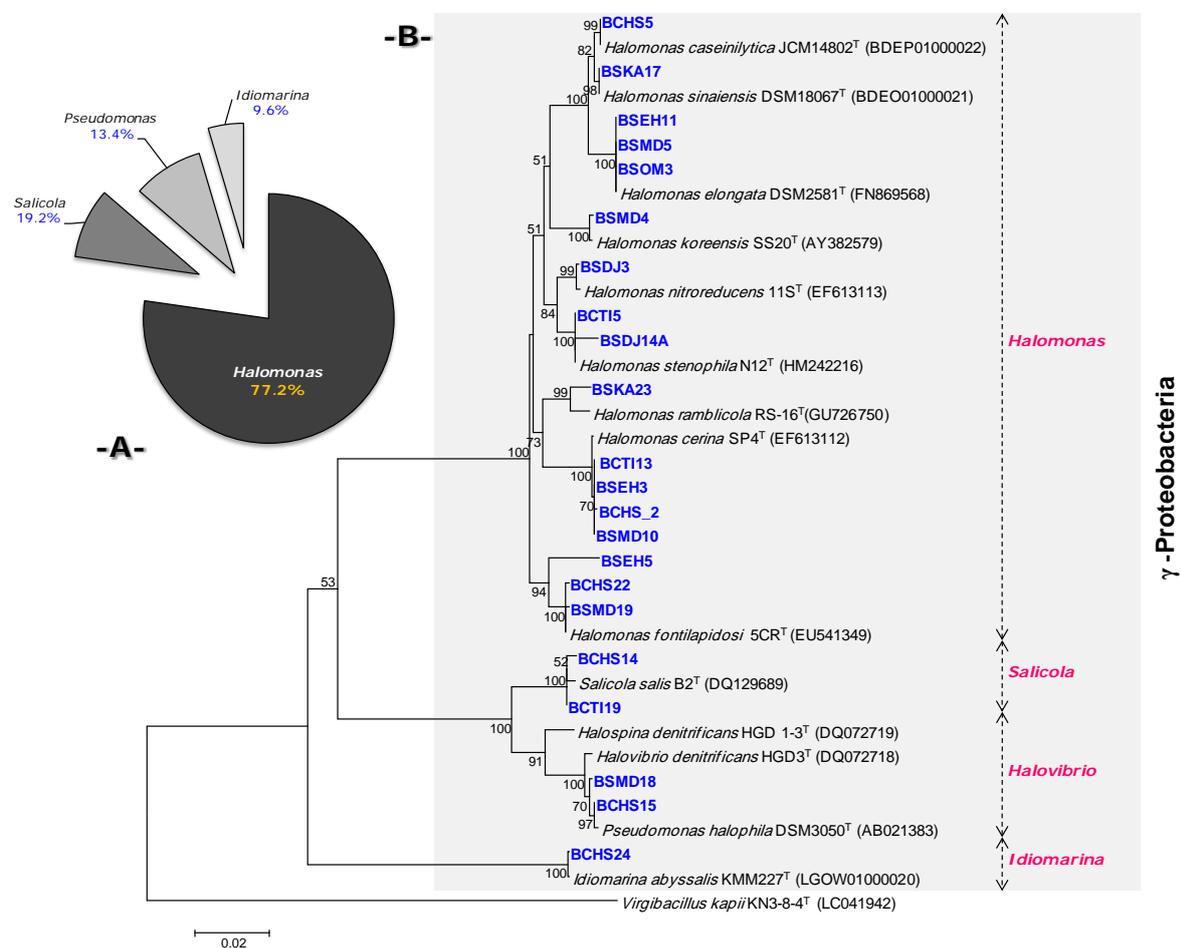


Figure 25. Arbre phylogénétique des isolats bactériens halophiles et halotolérants (Phylum des γ -*Proteobacteria*).

A. Affiliation taxonomique, **B.** Arbre phylogénétique (Neighbor-joining Tree) montrant les liens entre les isolats et les espèces étroitement apparentées basé sur la comparaison des séquences du gène de l'ADNr 16S. Les valeurs du Bootstrap basées sur 1000 analyses (>50%) sont indiquées au niveau des nœuds de l'arbre. La barre d'échelle représente 2% de divergence de séquence estimée.

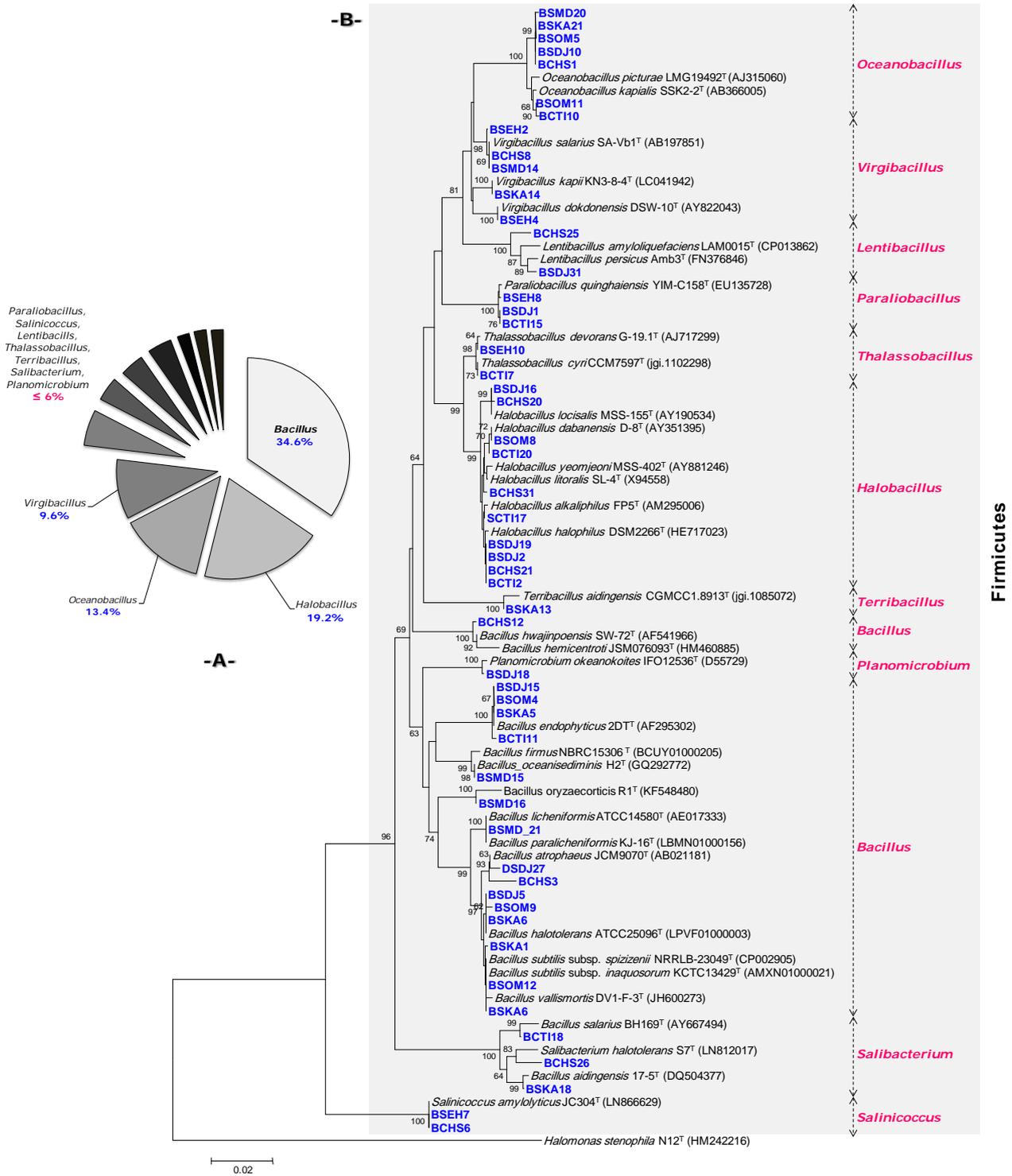


Figure 26. Arbre phylogénétique des isolats bactériens halophiles et halotolérants (Phylum des *Firmicutes*).

A. Affiliation taxonomique, **B.** Arbre phylogénétique (Neighbor-joining Tree) montrant les liens entre les isolats et les espèces étroitement apparentées basé sur la comparaison des séquences du gène de l'ADNr 16S. Les valeurs du Bootstrap basées sur 1000 analyses (>50%) sont indiquées au niveau des nœuds de l'arbre. La barre d'échelle représente 2% de divergence de séquence estimée.

En utilisant des approches dépendantes de la culture, des communautés bactériennes similaires associées aux environnements salins ont également été trouvées, où les *Firmicutes* et γ -*Proteobacteria*, sont les membres dominants parmi l'ensemble des bactéries isolées (Yeon *et al.*, 2005 ; Chen *et al.*, 2010). Plusieurs études ont rapporté que les bactéries du genre *Bacillus* et *Halobacillus* avaient été largement isolées et bien adaptées à différents environnements salins, et dans la plupart des cas, en présence de NaCl jusqu'à 25%, tels que des lacs hypersalins, les sols salins, les salines d'évaporations et autres (Ventosa *et al.*, 2008).

La dominance des genres *Bacillus*, *Halobacillus* et *Filobacillus* a été signalée dans des sols salins de terres arides algériennes utilisant des milieux riches additionnés de différentes concentrations de NaCl (3%, 10% et 15%) (Hacène *et al.*, 2004). De même, Chen *et al.* (2010) ont signalé lors d'une étude sur la biodiversité des halophiles, l'isolement de souches bactériennes à partir de salines d'évaporation solaire présentant des caractéristiques halophiles modérées et leur analyse phylogénétique a indiqué l'appartenance des isolats bactériens aux cinq genres (*Bacillus*, *Halobacillus*, *Planococcus*, *Salinicoccus* et *Halomonas*).

Des études antérieures ont également décrit des communautés bactériennes halophiles similaires isolés dans des salines d'évaporation et d'autres environnements salés par le biais des approches dépendantes de la culture sur des milieux nutritifs riches (Rohban *et al.*, 2009 ; Baati *et al.*, 2010). Des analyses taxonomiques de bactéries halophiles modérées et halophiles extrêmes colonisent des habitats hypersalins en Égypte ont montré que 85% du total des isolats appartiennent au phylum de γ -*Proteobacteria* ; dont cinq genres ont été identifiés : *Pseudoalteromonas*, *Flavobacterium*, *Chromohalobacter*, *Halomonas* et *Salegentibacter* (Ghozlan *et al.*, 2009). Tandis que les bactéries Gram positif ont été représentées par les genres *Halobacillus*, *Salinicoccus*, *Staphylococcus* et *Tetragenococcus*.

Les résultats du BLASTn montrent une distribution variable des pourcentages de similarité des séquences obtenues et celles des souches types de 97 à 100% (Tableau 11) et il est intéressant de noter que plusieurs phylotypes présentent des similitudes de 97 et 98% avec des espèces bactériennes phylogénétiquement plus proches, ce qui indique qu'ils pourraient être de nouveaux taxons et lignées (Vandamme *et al.*, 1996), affiliés à différents genres comme *Bacillus* sp. BCHS3, *Lentibacillus* sp. (BCHS25, BSDJ31), *Paraliobacillus* sp. BSDJ1, *Salibacterium* sp. BCHS26 et *Halomonas* sp. BSEH5

Il est noté que certains auteurs ont proposé qu'un pourcentage de similarité de 98,2% comme limite pour la séparation entre deux espèces (Kim *et al.*, 2014), d'autres travaux ont porté sur l'augmentation du seuil pour la description d'une nouvelle espèce et propose une limite de

98,65% sans avoir recours à l'hybridation ADN/ADN (Meier-Kolthoff *et al.*, 2013). Cependant, au titre d'une définition taxonomique d'une nouvelle espèce, l'hybridation ADN/ADN (DDH) et très récemment, l'identité nucléotidique moyenne (ANI) après séquençage du génome restent les deux méthodes de choix (Chun *et al.*, 2018).

4.2. Archées halophiles extrêmes

Au cours des dernières années, des environnements extrêmes ont été largement explorés et des procaryotes halophiles ont été trouvés dans plusieurs écosystèmes salins. Avec les progrès des approches moléculaires, divers génotypes archéens ont été découverts (Narasingarao *et al.*, 2012 ; DeMaere *et al.*, 2013). Cependant, les méthodes dépendantes de la culture restent une approche nécessaire pour obtenir de nouveaux microbes présentant de nouvelles applications et pour comprendre leurs fonctions écophysologiques et environnementales (Vandamme *et al.*, 1996 ; Sfanos *et al.*, 2005).

Dans la présente étude, plusieurs colonies suspectées archées halophiles, qui ont présenté une croissance lente au moyenne de 2 semaines d'incubation sur milieu HM additionné de 25% de sel total, ont été retenues pour une identification moléculaire avec les amorces spécifiques aux archées. Après lecture sur gel d'électrophorèse et identification par séquençage des amplicons de l'ADN codant pour l'ARNr 16S, **68 isolats** se sont tous révélés être des archées halophiles extrêmes de la classe des *Halobacteria* dans l'embranchement des *Euryarchaeota* avec une similarité de 98 à 99% aux espèces étroitement apparentées. (Tableau 12). Sept genres ont été ainsi trouvés dans l'ensemble des prélèvements, dont le genre *Haloferax* en majorité avec (30 isolats) (44,12%) et une diversité spécifique remarquable ; *Hfx. alexandrinus*, *Hfx. larsenii*, *Hfx. lucentensis*, *Hfx. mediterranei* et *Hfx. volcanii*, suivi de genre *Halococcus* (*Hcc*) (9 isolats, 13,24%). Les genres *Halogeometricum* (*Hgm*) et *Natrinema* (*Nnm*) ont partagé huit isolats pour chacun d'eux (11,76%) et les archées *Haloarcula* (*Har*), *Haloterrigena* (*Htg*) et *Natrialba* (*Nab*) en plus faible proportion avec une abondance inférieure à 8% (Figures 27 et 28).

Le genre *Haloferax* a été trouvé plusieurs fois dans ces environnements hypersalins. Les cellules de ce genre d'archées sont en forme de bacilles ou pléomorphes, mobiles, Gram négatif, neutrophiles et aérobies stricts. Ils ont une croissance optimale en moyenne entre 20-25% de NaCl. Les colonies sont rouges ou roses due à la présence de bactériorubérine.

Tableau 12. Résultat du BLASTn et similarité des séquences ADNr 16S des archées halophiles isolées

Site	Isolats	Souche d'Archées proches (N° d'accension)	Similarité (%)
Chott El Bèïdha– Hammam Essoukhna (CHS) (N=24)	ArCHS3	<i>Hfx. lucentensis</i> JCM9276 (AB081732)	99,52
	ArCHS4	<i>Hfx. mediterranei</i> ATCC33500 (D11107)	99,37
	ArCHS5	<i>Hfx. alexandrinus</i> JCM9276 (AB081732)	99,66
	ArCHS6	<i>Hfx. alexandrinus</i> JCM9276 (AB081732)	99,66
	ArCHS7	<i>Hfx. mediterranei</i> ATCC33500 (D11107)	99,72
	ArCHS9	<i>Hfx. mediterranei</i> ATCC33500 (D11107)	99,37
	ArCHS22	<i>Hfx. mediterranei</i> ATCC33500 (D11107)	99,72
	ArCHS23	<i>Hfx. lucentensis</i> JCM9276 (AB081732)	99,73
	ArCHS8	<i>Hgm. borinquense</i> DSM11551 (AF002984)	99,86
	ArCHS13	<i>Hgm. borinquense</i> DSM11551 (AF002984)	99,66
	ArCHS14	<i>Hgm. borinquense</i> DSM11551 (AF002984)	99,32
	ArCHS15	<i>Hgm. borinquense</i> DSM11551 (AF002984)	100
	ArCHS17	<i>Hgm. borinquense</i> DSM11551 (AF002984)	99,73
	ArCHS18	<i>Hgm. borinquense</i> DSM11551 (AF002984)	99,73
	ArCHS21	<i>Hgm. borinquense</i> DSM11551 (AF002984)	99,45
	ArCHS10	<i>Nnm. altunense</i> AJ2 (AY208972)	99,66
	ArCHS11	<i>Nnm. altunense</i> AJ2 (AY208972)	99,86
	ArCHS24	<i>Nnm. altunense</i> AJ2 (AY208972)	99,80
	ArCHS25	<i>Nnm. altunense</i> AJ2 (AY208972)	99,59
	ArCHS26	<i>Nnm. altunense</i> AJ2 (AY208972)	99,32
	ArCHS27	<i>Nnm. altunense</i> AJ2 (AY208972)	99,32
	ArCHS16	<i>Hcc. hamelinensis</i> 100A6 (DQ017835)	99,71
	ArCHS19	<i>Hcc. hamelinensis</i> 100A6 (DQ017835)	99,71
	ArCHS20	<i>Hcc. hamelinensis</i> 100A6 (DQ017835)	99,71
Sebkha Medghacen (SMD) (N=16)	ArSMD2	<i>Hfx. alexandrinus</i> JCM9276 (AB081732)	99,86
	ArSMD4	<i>Hfx. mediterranei</i> ATCC33500 (D11107)	99,86
	ArSMD5	<i>Hfx. volcanii</i> NCIMB2012 (AY425724)	99,86
	ArSMD6	<i>Hfx. lucentensis</i> JCM9276 (AB081732)	99,86
	ArSMD7	<i>Hfx. lucentensis</i> JCM9276 (AB081732)	99,59
	ArSMD8	<i>Hfx. alexandrinus</i> JCM9276 (AB081732)	99,52
	ArSMD9	<i>Hfx. alexandrinus</i> JCM9276 (AB081732)	99,86
	ArSMD10	<i>Hfx. lucentensis</i> JCM9276 (AB081732)	99,86
	ArSMD12	<i>Hfx. lucentensis</i> JCM9276 (AB081732)	99,86
	ArSMD13	<i>Hfx. alexandrinus</i> JCM9276 (AB081732)	99,86
	ArSMD14	<i>Hfx. mediterranei</i> ATCC33500 (D11107)	99,93
	ArSMD16	<i>Hfx. mediterranei</i> ATCC33500 (D11107)	99,30
	ArSMD17	<i>Hfx. mediterranei</i> ATCC33500 (D11107)	99,44
	ArSMD18	<i>Hfx. mediterranei</i> ATCC33500 (D11107)	99,86
	ArSMD20	<i>Nnm. altunense</i> AJ2(AY208972)	99,39
	ArSMD11	<i>Hcc. hamelinensis</i> 100A6 (DQ017835)	99,93

Tableau 12. suite

Site	Isolats	Souche d'Archées proches	Similarité (%)
Chott Karalla (CKA) (N=11)	ArKAR9	<i>Har. hispanica</i> DSM 4426 (AB090167)	98,0
	ArKAR12	<i>Har. hispanica</i> DSM 4426 (AB090167)	98,0
	ArKAR2	<i>Htg. thermotolerans</i> PR5 (AF115478)	99,52
	ArKAR3	<i>Htg. thermotolerans</i> PR5 (AF115478)	99,52
	ArKAR4	<i>Htg. thermotolerans</i> PR5 (AF115478)	99,52
	ArKAR6	<i>Htg. salina</i> XH-65 (AM942763)	99,22
	ArKAR7	<i>Htg. salina</i> XH-65 (AM942763)	99,44
	ArKAR8	<i>Htg. salina</i> XH-65 (AM942763)	99,15
	ArKAR10	<i>Nab. aegyptiaca</i> DSM13077 (AF251941)	99,79
	ArKAR11	<i>Nab. aegyptiaca</i> DSM13077 (AF251941)	99,79
	ArKAR5	<i>Hcc. hamelinensis</i> 100A6 (DQ017835)	98,19
Sebkha El Hamiet (SEH) (N=7)	ArSEH1	<i>Hfx. mediterranei</i> ATCC33500 (D11107)	99,72
	ArSEH2	<i>Hfx. lucentensis</i> JCM9276 (AB081732)	99,80
	ArSEH5	<i>Hfx. alexandrinus</i> JCM9276 (AB081732)	99,32
	ArSEH6	<i>Hfx. mediterranei</i> ATCC33500 (D11107)	99,79
	ArSEH4	<i>Hgm. borinquense</i> DSM11551 (AF002984)	99,69
	ArSEH3	<i>Nab. asiatica</i> 172P1 (D14123)	99,66
	ArSEH7	<i>Nab. asiatica</i> 172P1 (D14123)	99,66
Sebkha Djendli (SDJ) (N=4)	ArSDJ1	<i>Hcc. hamelinensis</i> 100A6 (DQ017835)	98,19
	ArSDJ2	<i>Hcc. hamelinensis</i> 100A6 (DQ017835)	99,79
	ArSDJ3	<i>Hcc. hamelinensis</i> 100A6 (DQ017835)	98,19
	ArSDJ7	<i>Hcc. hamelinensis</i> 100A6 (DQ017835)	99,51
Sebkha Oumache (SOM)	ArSOM1	<i>Hfx. alexandrinus</i> JCM9276 (AB081732)	99,93
	ArSOM4	<i>Hfx. lucentensis</i> JCM9276 (AB081732)	99,73
	ArSOM5	<i>Hfx. lucentensis</i> JCM9276 (AB081732)	99,93
Chott Tinsilt (CTI) (N=3)	ArCTI2	<i>Hfx. larsenii</i> ZJ206 (AY838278)	99,46
	ArCTI4	<i>Htg. thermotolerans</i> PR5 (AF115478)	99,52
	ArCTI1	<i>Nnm. altunense</i> AJ2(AY208972)	99,32

Hfx : *Haloferax*, *Hgm* : *Halogeometricum*, *Nnm* : *Natrinema*, *Hcc* : *Halococcus*, *Har* : *Haloarcula* ; *Htg* : *Haloterrigena*, *Nab* : *Natrialba*.

Ce genre regroupe actuellement treize espèces validées (LPSN, 2019) qui ont été découvertes dans les marais salants, les lacs hypersalins, les sols salins ou encore les salines d'évaporation (Xu *et al.*, 2007; McDuff *et al.*, 2016).

Le genre *Halococcus* a été aussi retrouvé de nombreuses fois dans les sols prélevés. Les organismes du genre *Halococcus* sont coccoïdes et forment des paires ou des agrégats, Gram négatif principalement. Ils croissent à une température optimale autour des 37- 40°C et à un pH 5,8-8. Les mêmes paramètres d'incubation qui ont été utilisés pour nos analyses. La concentration optimale en NaCl, se situe généralement entre 20 et 25%, c'est pourquoi la plupart des organismes de ce genre ont été rencontrés dans les lacs salés, l'eau de mer, ou autres milieux salins (Namwong *et al.*, 2007). Ce genre regroupe actuellement dix espèces (LPSN, 2019) dont l'espèce type est *Hcc. morrhuae*. Deux espèces ont récemment été isolées à partir de sel commercial et un sédiment marin en chine (*Hcc. sediminicola* et *Hcc. agarilyticus*) (Yim *et al.*, 2014 ; Minegishi *et al.*, 2015). Les cellules de *Hcc. hamelinensis* sont des coques d'une taille moyenne de 0,8 x 1,3µm, Gram négatif, et immobiles. Les colonies sont respectivement orange, rose ou incolore avec une croissance sur milieu riche additionné de 15-30% de sel (croissance optimale à 15%) (Goh *et al.*, 2006).

L'isolement des espèces d'*Haloferax*, *Halococcus*, *Halogeometricum* et *Natarinema* indique qu'elles sont omniprésentes et semblent bien adaptées dans ce type d'environnement par rapport à d'autres groupes, ce qui pourrait indiquer que leur répartition pourrait être limitée par certaines conditions environnementales (pH, T°C,...) (Oren, 2002). À ce jour, les haloarchaea isolés des environnements salins appartenant à la classe monophylétique *Halobacteria* (phylum *Euryarchaeota*) et principalement des genres *Haloarcula*, *Halorubrum* et *Halobacterium* (Abdallah *et al.*, 2016). Bien que, d'autres groupes ont été isolés à partir de différents environnements salins dans le monde, y compris les salines d'évaporations, les lacs salés, les sols salins et autres niches écologiques (Litchfield et Gillevet, 2002).

L'isolement et la caractérisation des archées halophiles extrêmes dans des sols salins algériens sont très rares sauf pour quelques études qui ont déjà montré l'isolement des espèces affiliées aux genres *Halobacterium*, *Haloterrigena*, *Haloferax*, *Halomicrobium*, *Haloarcula*, *Halopiger*, *Halostagnicola*, *Natrinema*, *Natrinalba* et *Natronococcus* (Kharroub *et al.*, 2014; Quadri *et al.*, 2016).

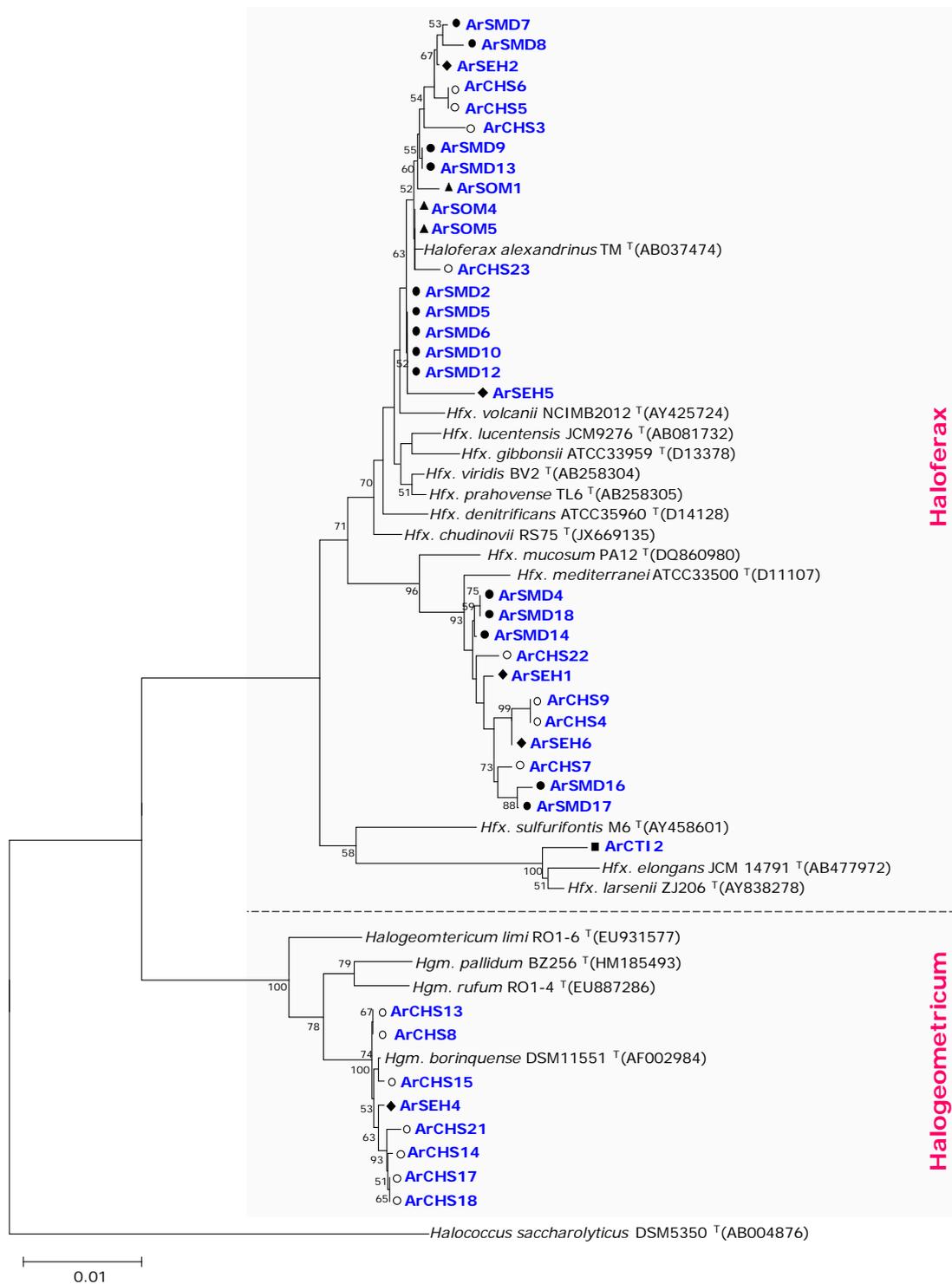


Figure 27. Arbre phylogénétique (Neighbor-joining Tree) montrant les liens entre les isolats archéens (*Haloferax* spp. et *Halogeometricum* spp. et les espèces étroitement apparentées basé sur la comparaison des séquences du gène de l'ADNr 16S. Les valeurs du Bootstrap basées sur 1000 analyses (>50%) sont indiquées au niveau des nœuds de l'arbre. La barre d'échelle représente 2% de divergence de séquence estimée.

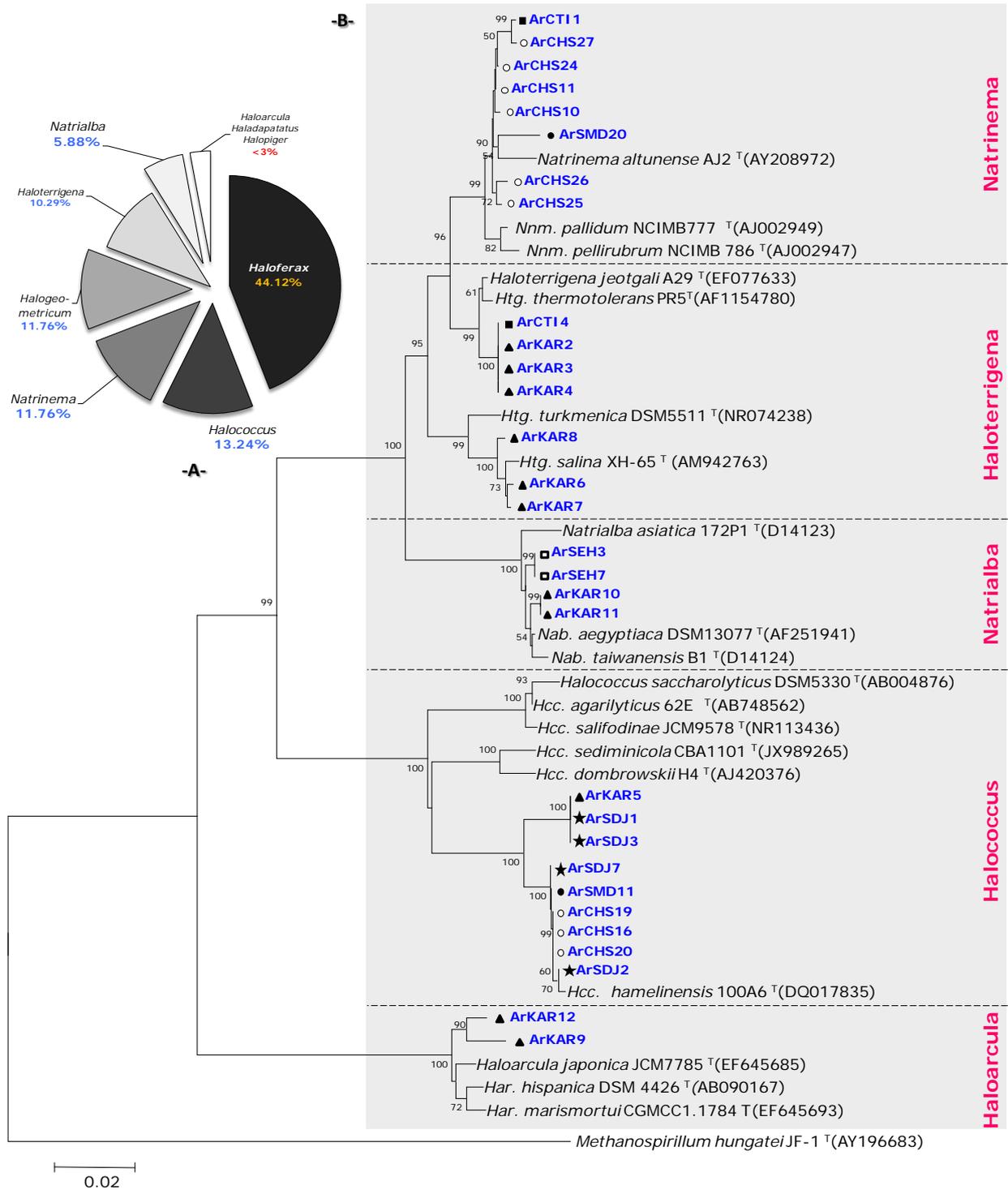


Figure 28. Arbre phylogénétique (Neighbor-joining Tree) montrant les liens entre les isolats archéens (*Haloterrigena* spp., *Natrialba* spp., *Natrinema* spp., *Halococcus* spp., *Haloarcula* spp.) et les espèces étroitement apparentées basé sur la comparaison des séquences du gène de l'ADNr 16S. Les valeurs du Bootstrap basées sur 1000 analyses (>50%) sont indiquées au niveau des nœuds de l'arbre. La barre d'échelle représente 2% de divergence de séquence estimée.

Il faut noter qu'aucun isolat d'*Halobacterium*, *Halorubrum* et *Halosarcina* n'a été isolé dans la présente étude. Le genre *Halorubrum* regroupe 37 espèces validées, il s'agit donc du genre le plus représenté au sein de la classe des *Halobacteria* (LPSN, 2019). Les organismes de ce genre sont généralement halophiles extrêmes, pléomorphes, aérobies, de couleur rouge-orange. La croissance de ces microorganismes a été observée dans des concentrations de NaCl de 1,5 M à 4,5 M. Certaines espèces peuvent cependant être incolore (*Hrr. trapanicum*) (McGenity et Grant, 2015). Les différences enregistrées par rapport à d'autres travaux antérieurs pourraient être attribuées aux différences de conditions de culture, de composition du milieu et des techniques utilisées pour l'isolement (Burns *et al.*, 2004).

Les techniques de culture utilisées pour analyser cette diversité archéenne présente l'inconvénient de ne donner qu'une vue restreinte ou une approximation grossière de la diversité naturelle à raison qu'elles permettent d'accéder individuellement à chaque organisme donc sont entachées d'erreurs inhérentes aux méthodes culturales. Selon plusieurs auteurs entre 0,001% et 15% des procaryotes présents dans un échantillon sont cultivables à l'aide des techniques classiques (Kirk *et al.*, 2004). Cet écart peut être attribué à différentes causes : (i) le milieu de culture choisi ne peut être universel, (ii) l'ensemble des conditions de l'environnement ne peuvent être reproduites sur un seul et même milieu de culture en particulier pour les environnements à forts gradients physico-chimiques, (iii) certaines cellules microbiennes hors de leur environnement peuvent entrer dans un état viable mais non cultivable, (iv) des populations enrichies en liquide peuvent ne pas se développer sur milieu solide, (v) la quantité d'inoculum choisie influence le type de cellules enrichies et cultivées, (vi) des microorganismes différents ayant des conditions de croissance similaires seront difficilement distinguables et (vii) certaines cellules sont impossibles à obtenir en culture pure comme c'est le cas des microorganismes symbiotes et syntrophes (Elis *et al.*, 2003).

5. Analyses physiologiques et screening enzymatique des isolats halophiles

5.1. Archées halophiles

Comme le montre la figure 32, les isolats d'haloarchaea étaient des halophiles extrêmes et ne pouvaient pas croître à moins de 10% du sel total, mais présentent une croissance optimale à un intervalle de 20% à 25% de sel, voire plus, jusqu'à 30% (Oren, 2014). Tous les isolats sont neutrophiles, catalase positive, mésophiles à thermotolérants avec une température de croissance optimale comprise entre 30 et 45 ° C et un pH de 6 à 8, à l'exception de certains isolats montrant une croissance à 50°C et un pH allant jusqu'à 9,5. Dans l'ensemble, les isolats ont montré une large gamme de température de croissance allant de 10 ° C à 50°C.

En raison de leur extrême adaptation, les archées halophiles ont attiré l'attention de la communauté scientifique en raison de leur capacité à produire des enzymes actives, des exopolysaccharides et des pigments avec des applications potentielles en biotechnologie (Antranikian *et al.*, 2005). Le criblage de 68 isolats d'haloarchaea pour la recherche d'enzymes halophiles extracellulaires a montré que 89,7% et 52,9% des isolats produisaient respectivement au moins deux et trois enzymes hydrolytiques. Les souches à activité d'estérase, gélatinase, inulinase et cellulase constituaient le groupe fonctionnel le plus diversifié et le plus abondant.

En ce qui concerne les archées producteurs de nucléase, pectinase et xylanase, ils occupaient la deuxième position en termes d'activités et étaient répartis presque également entre les isolats représentatifs (Figure 32, Tableau 14). Néanmoins, 21 isolats ont présenté une activité amylolytique, dont 12 *Haloferax*, 3 isolats d'*Haococcus*, 3 *Haloarcularia*, 2 *Haloterrigena* et 1 *Natrialba*. Cependant, les activités protéasiques et nucléasiques ont été remarquées moins fréquemment que les autres activités hydrolytiques avec respectivement 30,9% et 32,4% du total des souches isolées. Récemment, l'isolement et le criblage d'enzymes extracellulaires chez les archées halophiles à partir de Sebkha Ouzemoul ont révélé une prédominance de l'activité amylolytique (Kharroub *et al.*, 2014).

Des études antérieures ont montré que des archées halophiles peuvent utiliser plusieurs composés organiques comme seules sources de carbone et d'énergie et produire plusieurs enzymes hydrolytiques (Lizama *et al.*, 2001; Ventosa *et al.*, 2005). Les propriétés catalytiques de ces enzymes halophiles devraient trouver des applications dans de nombreux domaines différents comme additifs dans les détergents, pour les industries alimentaires et d'autres procédés biotechnologiques (Delgado-Garcia *et al.*, 2012). De même, Kakhki *et al.* (2011) ont étudié la diversité des archées halophiles produisant différentes hydrolases d'un lac salé,

concluant qu'*Halorubrum* et *Haloarcula* ont été les genres dominants avec une production d'enzymes à taux élevé comprenant respectivement l'amylase, la DNase et la lipase. Cependant, les études sur ces enzymes sont rares et les biocatalyseurs haloarchéens ne sont pas encore utilisés pour les processus industriels.

Les isolats d'*Haloferax*, *Haloterrigena* et *Natrialba* ont dévoilé un large spectre d'activités enzymatiques, principalement actives à des fortes concentrations de sel et températures élevées. Fait intéressant, de nombreux isolats ont montré toutes les enzymes hydrolytiques détectables, principalement dans les membres des genres *Haloferax* et *Haloarcula*. Au-delà du potentiel biotechnologique, la forte proportion d'isolats appartenant à ces genres et les multiples activités hydrolytiques détectées dans ces groupes permettent de mieux comprendre l'adaptation exceptionnelle du microbiote d'haloarchaea et suggèrent également que ces organismes peuvent contribuer de manière significative à l'hydrolyse du biopolymère majeur dans ces écosystèmes.

Les activités d'estérase et d'inulinase étaient les activités les plus fréquemment détectées, exprimées chez des isolats appartenant aux huit genres (Tableau 14), probablement parce que les biotopes représentent un important réservoir de matières organiques susceptibles de stimuler l'activité métabolique des archées halophiles. Des activités similaires ont été rapportées chez les haloarchaea isolés de différents lacs salés (Boutaiba *et al.*, 2006, Kakhki *et al.*, 2011). Cependant, peu de vraies estérases et lipases des archées halophiles ont été purifiées et caractérisées (Camacho *et al.*, 2009).

Le criblage de la CM-cellulase extracellulaire a montré que 35,29% (24 isolats) présentent une activité cellulolytique remarquable. Les cellulases sont traditionnellement utilisées dans les industries alimentaires et textiles. Ainsi, la dégradation de la cellulose par les archaea halophiles dans de forte concentration en sel démontre leur potentiel biotechnologique (Margesin *et al.*, 2001). Actuellement, les recherches se tournent vers les archées halophiles en tant que sources d'enzymes hydrolytiques, et plusieurs études ont été menées pour évaluer leur applicabilité industrielle, en particulier pour les cellulases, lipases, protéases et nucléases (Boutaiba *et al.*, 2006 ; Manikandan *et al.*, 2009 ; Delgado-García *et al.*, 2012).

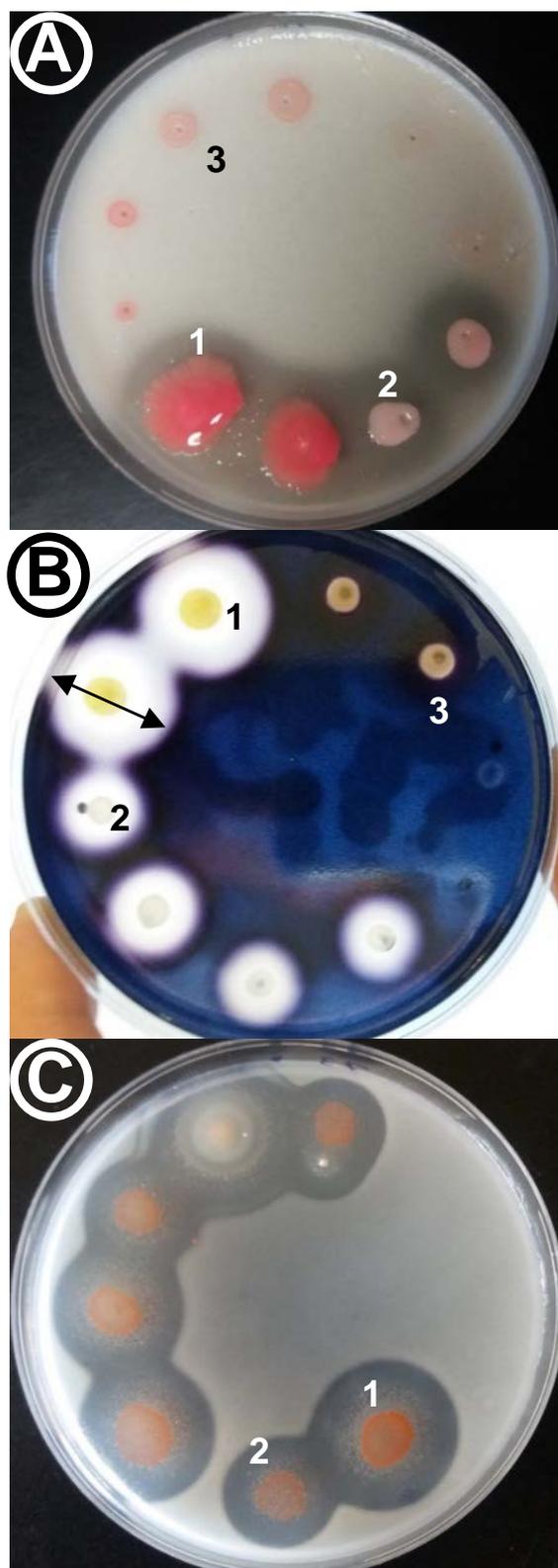


Figure 29. Criblage enzymatique de quelques isolats halophiles (archées)
A. Protéase ; B. Amylase, C. Gélatinase ; 1. Forte activité, 2. Activité moyenne ; 3. Pas d'activité.

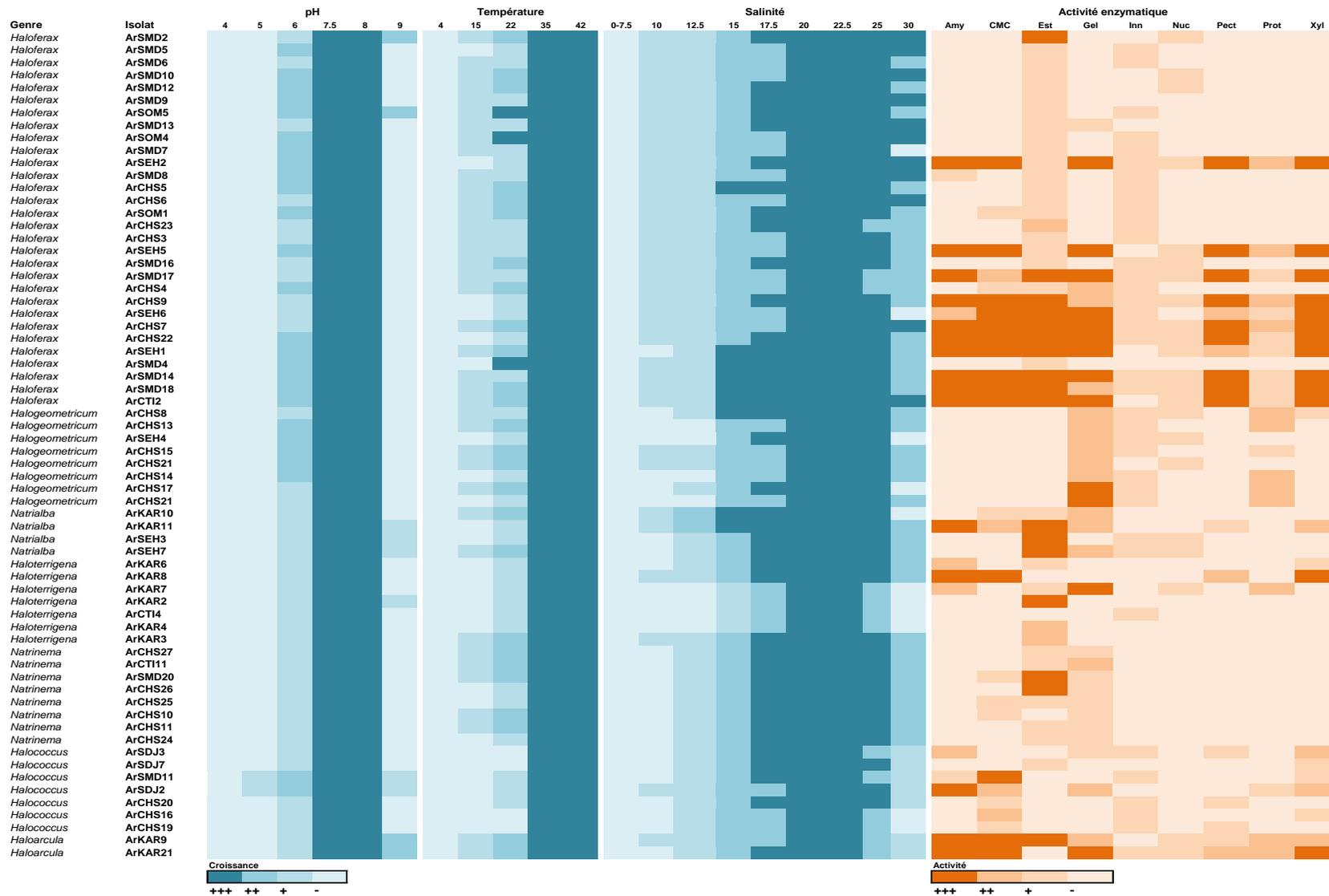


Figure 30. Diagramme représentant les caractéristiques physiologiques et les activités enzymatiques des archées halophiles.

Tableau 13. Résultat du criblage enzymatique des archées halophiles

Genre	Abondance	Activités enzymatiques (N/%)								
		Amylase	CMCase	Estérase	Gélatinase	Inulinase	Nuclease	Pectinase	Protéase	Xylanase
<i>Haloferax</i>	30 (44,1)	12 (40,0)	13 (43,3)	30 (100,0)	13(43,3)	21 (70,0)	14 (46,7)	11 (36,7)	11 (36,7)	11 (36,7)
<i>Halococcus</i>	9 (13,2)	3 (33,33)	5 (55,6)	1 (11,1)	3 (33,3)	6 (66,7)	0	3 (33,3)	1 (11,1)	5 (55,6)
<i>Halogeometricum</i>	8 (11,8)	0	0	0	8 (100)	7 (87,0)	3 (37,5)	0	6 (75,0)	1 (12,5)
<i>Natrinema</i>	8 (11,8)	0	3 (37,5)	7 (87,5)	8 (100)	0	0	0	0	0
<i>Haloterrigena</i>	7 (10,3)	3(42,9)	1 (14,3)	5 (71,4)	1 (14,3)	1 (14,3)	1 (14,3)	1 (14,3)	1 (14,3)	1 (14,3)
<i>Natrialba</i>	4 (5,9)	1 (25,0)	2 (50,0)	4 (100,0)	3 (75,0)	2 (50)	2 (50)	1 (25)	0	1 (25,0)
<i>Haloarcula</i>	2 (2,9)	2 (100,0)	2 (100,0)	2 (100,0)	2 (100,0)	1 (50,0)	2 (100,0)	2 (100,0)	2 (100,0)	2 (100,0)
Total	68 (100)	21 (30,9)	26 (38,2)	49 (72,0)	38 (55,9)	38 (55,9)	22 (32,4)	18 (23,53)	21 (30,9)	21 (30,9)

5.2. Bactéries halophiles

Parmi les 74 bactéries isolées, 81% (soit 60 isolats) ont présenté une croissance maximale sur le milieu HM contenant de 3 à 15% de sel total et peut atteindre 22,5% de sels. Ces isolats ont donc été classés comme halophiles modérés (Ventosa *et al.*, 1998) et environ 19% (14 isolats) sont halotolérants (croissance à 0% de salinité). La majorité de ces bactéries appartiennent aux genres *Bacillus*, *Halobacillus* et *Halomonas*. De plus, la totalité des isolats ont été neutrophiles et mésophiles, avec une température de croissance maximale de 30 à 38°C et un pH de 7,0 à 7,5. Les caractéristiques physiologiques comparatives des souches isolées sont présentées dans la figure 34. Plusieurs études ont été menées sur l'écologie, la taxonomie et la phylogénie des bactéries halophiles modérées et récemment, leurs applications biotechnologiques (Margesin et Schinner 2001 ; Oren 2002; Edbeib *et al.*, 2016). Ces bactéries se trouvent dans différents milieux salins où les salinités dépassent 1,5M (environ 10%), y compris les eaux hypersalines, les sols salins et autres (Ventosa, 2005).

Les halophiles devraient constituer une source potentielle d'enzymes hydrolytiques utiles présentant une stabilité exceptionnelle dans les processus de biotransformation industriels réalisés dans des conditions rigoureuses de pH, de température, de force ionique et / ou de solubilité limitée (Margesin et Schinner, 2001). Le criblage des activités hydrolytiques chez les isolats a été testé qualitativement en utilisant les substrats enzymatiques correspondants. La majorité des isolats producteurs ont été assignés aux *Firmicutes*, comprenant les genres *Bacillus*, *Halobacillus*, *Oceanobacillus* et *Virgibacillus*, avec des niveaux élevés et un large spectre d'activités enzymatiques par rapport aux isolats de *γ-Proteobacteria* (Figure 34).

Des activités élevées d'amylase, estérase, gélatinase et xylanase ont été observées chez les souches de *Bacillus* (BCHS3, BCHS12, BSDJ5, BSDJ14, BSDJ27, BSOM4, BCTI14, BSKA5, BSMD15), *Halobacillus* spp. (BSKA1, BSKA6, BSDJ2, BSDJ19, BCTI2), *Oceanobacillus* spp. (BSMD20, BSDJ1) et *Virgibacillus* spp. (BSEH2, BSMD14, BCHS8), suivies des activités moyennes cellulolytiques et protéasiques. Comme le montre le tableau 16, les activités de la nucléase, gélatinase, estérase et amylase ont été classées au premier rang des hydrolases communes parmi les souches criblées, avec 58,1%, 58,1%; 45,9% et 37,8%, respectivement. Peut-être parce que ces biotopes représentent un important réservoir de matière organique particulaire, qui présentent une forte pression de sélection démontrant l'induction d'un potentiel enzymatique parmi les isolats bactériens.

Dans l'ensemble, les isolats à Gram positif ont montré des activités principalement amylolytiques, gélatinolytiques, lipolytiques et nucléolytiques, suivies des activités

pectinolytiques, xylanolytiques et protéolytiques en deuxième position. Fait intéressant, que 33,7% des isolats criblés ont exprimé au moins cinq enzymes hydrolytiques différentes (Tableau 16), principalement chez les deux genres *Bacillus* et *Halobacillus*. D'autre part, les isolats à Gram négatif (*Halomonas* spp. et *Salicola* spp.) ont montré des activités hautement lipolytiques et amylolytiques. Au-delà du potentiel biotechnologique, les multiples activités hydrolytiques détectées au sein de ce groupe donnent un aperçu de leur adaptation exceptionnelle et suggèrent que ces bactéries associées à d'autres communautés microbiennes (par exemple, *Haloarchaea*) peuvent contribuer de manière significative à l'hydrolyse des principaux biopolymères et jouent un rôle actif dans les écosystèmes de zones humides (Menasria *et al.*, 2018).

Des efforts considérables sont consacrés aux bactéries halophiles modérées en tant que sources d'enzymes hydrolytiques, en particulier pour leur applicabilité aux processus biotechnologiques, en particulier la production de lipase, de protéase et de cellulase (de Lourdes Moreno *et al.*, 2013; DasSarma et DasSarma 2015). Auparavant, la production d'hydrolases avait été signalée chez des bactéries halophiles modérées de différents environnements salins (lacs salés, sols, eaux et salines) (Sánchez-Porro *et al.*, 2003; Rohban *et al.*, 2009; Baati *et al.*, 2010). Ces isolats bactériens appartenant aux genres *Bacillus*, *Halobacillus*, *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Marinococcus*, *Salicola*, *Salinicoccus*, *Salinivibrio*, *Thalassobacillus* et *Virgibacillus* se sont avérés producteurs d'une grande variété d'enzymes.

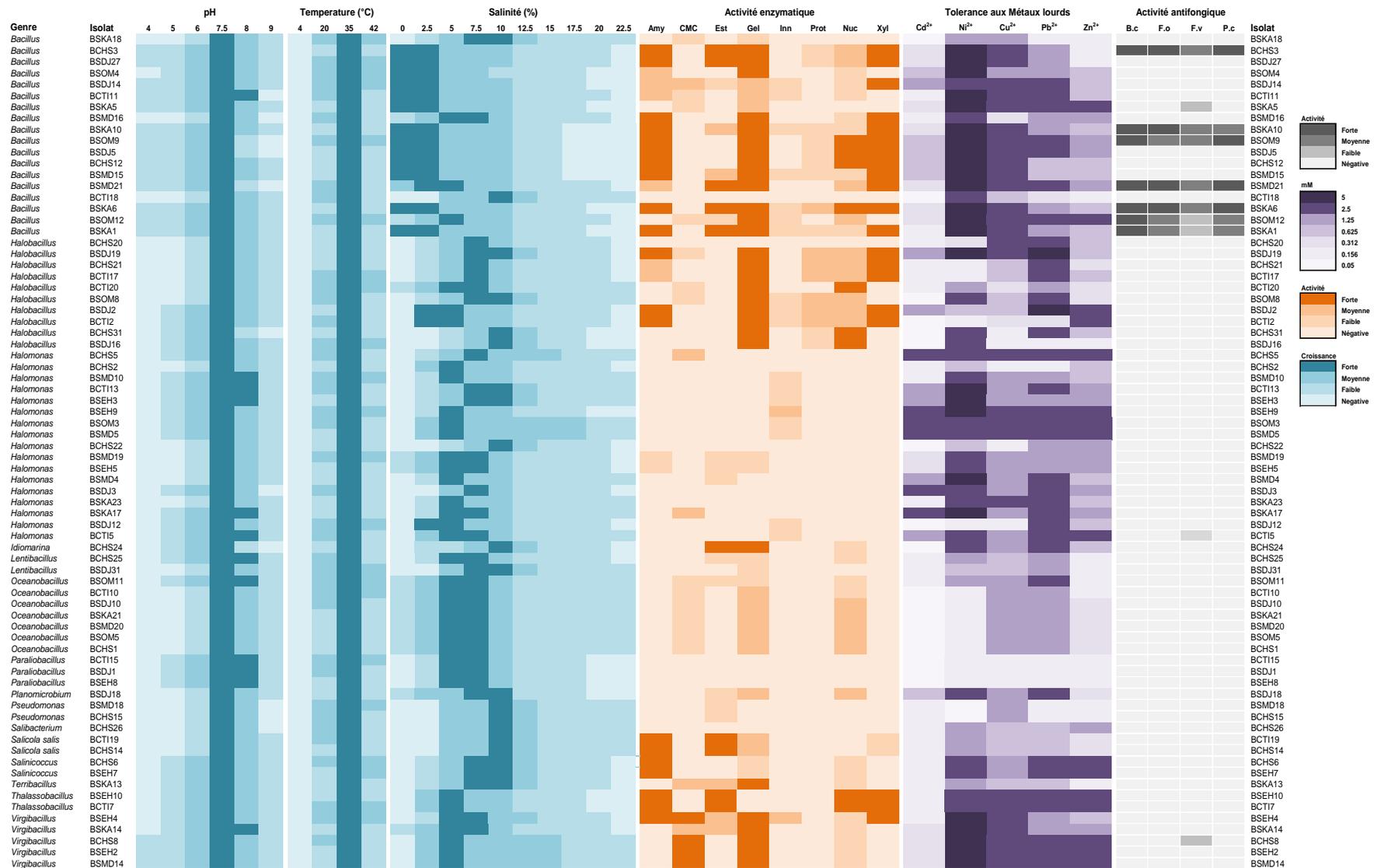


Figure 31. Diagramme représentant les caractéristiques physiologiques, les activités enzymatiques, les réponses aux métaux lourds et du potentiel antagoniste des isolats bactériens. (B.c : *B. cinerea*, F.o : *F. oxyporum*, F.v : *F. verticillioides*, P.c : *P. capsici*)

Tableau 14. Résultat du criblage enzymatique des bactéries halophiles modérées

Genre	Abondance N (%)	Activités enzymatiques N (%)							
		Amylase	CMCellulase	Estérase	Gélatinase	Inulinase	Nucléase	Protéase	Xylanase
<i>Bacillus</i>	18 (24,3)	14 (50,0)	5 (21,7)	9 (26,5)	17 (39,5)	7 (29,2)	14 (32,6)	9 (50,0)	12 (54,5)
<i>Halobacillus</i>	10 (13,5)	5 (17,9)	3 (13,0)	9 (26,5)	3 (7,0)	8 (33,3)	9 (20,9)	9 (50,0)	5 (22,7)
<i>Oceanobacillus</i>	7 (9,5)	0	7 (30,4)	1 (2,9)	7 (16,3)	0	7 (16,3)	0	0
<i>Virgibacillus</i>	5 (6,8)	1 (3,6)	5 (21,7)	2 (5,9)	5 (11,6)	1 (4,2)	5 (11,6)	0	1 (4,5)
Autres <i>Firmicutes</i>	12 (16,2)	4 (14,3)	1 (4,3)	5 (14,7)	6 (14,0)	0	7 (16,3)	0	2 (9,1)
<i>Halomonas</i>	17 (23,0)	2 (7,1)	2 (8,7)	3 (8,8)	2 (4,7)	8 (33,3)	0	0	0
<i>Salicola</i>	2 (2,7)	2 (7,1)	0	2 (5,9)	2 (4,7)	0	0	0	2 (9,1)
Autres <i>Proteobacteria</i>	3 (4,1)	0	0	3 (8,8)	1 (2,3)	0	1 (2,3)	0	0
Total	74 (100)	28 (37,8)	23 (31,1)	34 (45,9)	43 (58,1)	24 (32,4)	43 (58,1)	18(24,3)	22 (29,7)

6. Résistance aux métaux lourds des isolats bactériens

La tolérance aux métaux lourds des 74 isolats bactériens a été analysée sur du HM additionné du sel total correspondant à chaque isolat et supplémenté à des concentrations croissantes en métaux afin de déterminer les valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI). La figure 35 illustre les variations de CMI des bactéries testées. Dans l'ensemble, les isolats bactériens halophiles présentaient des CMI plus élevées pour le nickel-Ni²⁺ et le cuivre-Cu²⁺ (CMI de 0,625 à 5 mM) par rapport aux Cadmium-Cd²⁺ (CMI : 0,1 à 2 mM) et les sels de Zn²⁺ (CMI : 0,156 à 2 mM), indiquant que le zinc et le cadmium étaient considérés comme les métaux lourds les plus toxiques, car plus de 70% des isolats étaient inhibés à 5mM et aucune croissance supérieure à cette concentration n'a été notée. Comme le montre la figure 35, les bactéries habitant les Chotts situés dans les zones arides (SDJ, SOM, SKAR) ont regroupé les souches les plus tolérantes au Cd²⁺ et au Zn²⁺ (CMI supérieures à 4 mM).

Les résultats ont montré que les isolats de la classe *γ-Proteobacteria* ont présenté une variation de sensibilité et de tolérance aux métaux lourds, dont la croissance bactérienne est inhibée progressivement à mesure que la concentration de métaux en solution est augmentée (Figure 35 A). En outre, la plupart des isolats à Gram positif appartenant aux genres (*Bacillus*, *Halobacillus* et *Virgibacillus*) ont présenté respectivement des CMI élevées de 2,5 à 5 mM pour (Ni²⁺, Cu²⁺ et Pb²⁺) avec 40,4%, 44,2% et 40,4% de l'ensemble testé. Cette résistance est considérablement diminuée à zéro avec une concentration en métal de 10 mM. En effet, l'ensemble des isolats ont présenté une limite de tolérance variable selon le type et la concentration de métal.

Les isolats appartenant aux genres *Bacillus*, *Halobacillus*, *Virgibacillus* et *Halomonas* ont un niveau de tolérance au métal intermédiaire à élevé. Fait intéressant que plusieurs souches tolérantes ont été notées entre les deux groupes bactériens sélectionnés ; par exemple, les espèces d'*Halomonas* (BCHS, BSEH9, BSOM3, BSMD5, BCTI5, BSDJ12) ; *Bacillus* spp. (SDJ14, BSKA5, BSOM9, BSDJ5, BCHS12, BSMD21, BSOM12) ; *Halobacillus* spp. (BSDJ2, BSDJ19) ; *Thalassobacillus* spp. (BSEH10, BCTI7) et *Virgibacillus* spp. (BSEH8, BSEH2, BSMD14).

L'analyse en composantes principales (ACP), appliquée aux isolats bactériens en réponse de différents métaux lourds, est représentée sur le graphique factoriel symétrique de deux axes F1 × F2 avec l'inertie maximale contrainte de (72,93% et 81,81%) et des valeurs propres élevées respectivement pour les souches *Firmicutes* et *γ-Proteobacteria* (Figure 35 B).

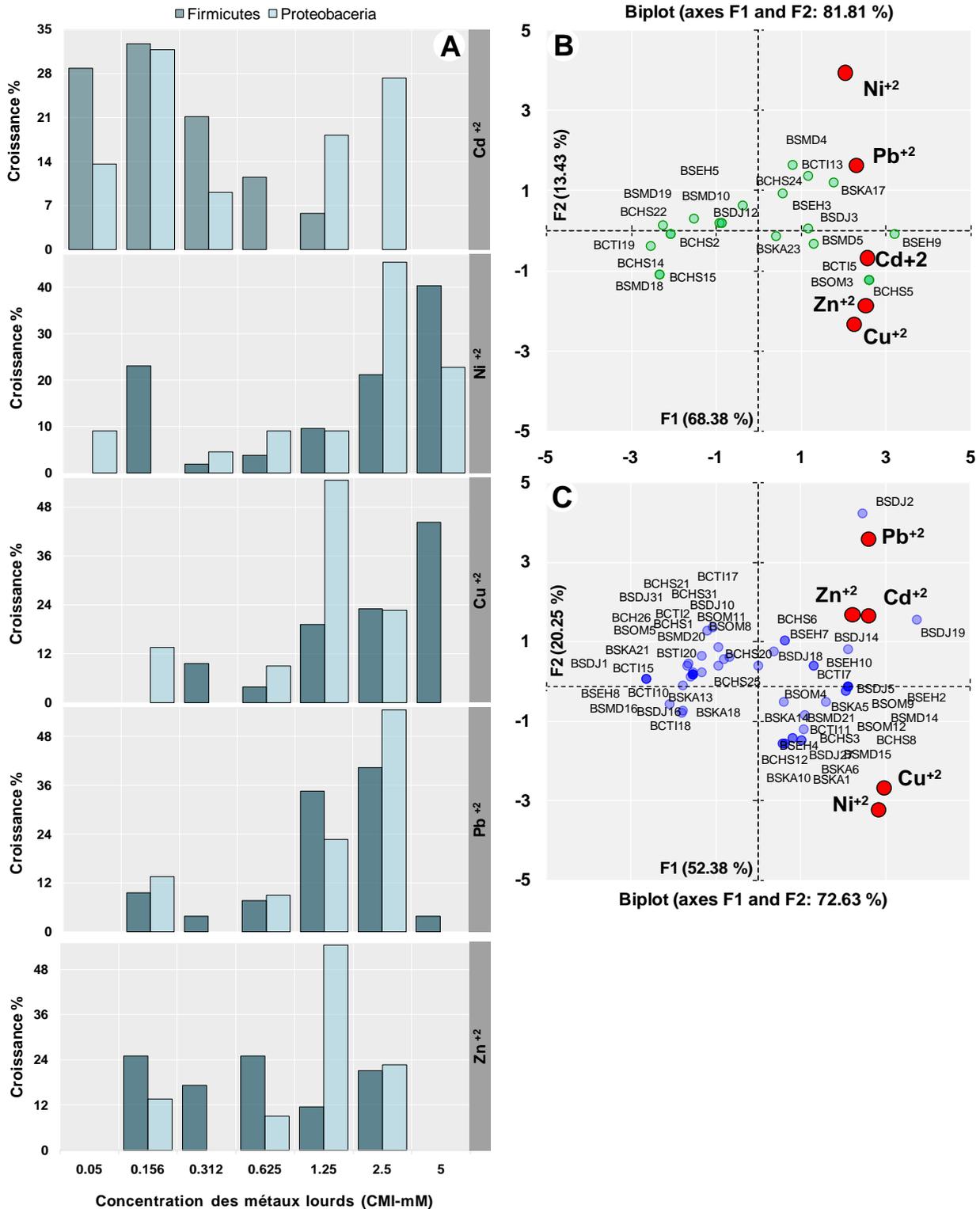


Figure 32. Fréquence de la tolérance aux métaux lourds (données CMI) des isolats bactériens. (A). Analyse en composantes principales montrant les réponses des CMI des métaux lourds de l'ensemble des isolats de *γ-Proteobacteria* (B) et de *Firmicutes* (C).

La DO a été mesurée après une semaine de croissance en milieu HM.

Selon ACP, le biplot obtenu à l'aide des réponses aux métaux lourds a montré que le couple de CMI (Cu^{+2} et Ni^{+2}) et le triplet (Zn^{+2} , Cd^{+2} et Cu^{+2}) sont fortement associés et corrélés positivement aux valeurs des axes PC1 respectivement pour les deux classes *Firmicutes* (*Bacillus* spp., *Virgibacillus* spp.) et γ -*Protéobacteria* (*Halomonas* spp.). Le chargement des réponses CMI sur les axes des composantes confirme les principaux schémas et la tolérance des isolats aux métaux lourds testés.

Étant donné que la résistance aux métaux lourds peut exister naturellement, l'utilisation de microorganismes indigènes tolérants prend en compte l'un des facteurs les plus importants de la bioremédiation et de la biotransformation des métaux toxiques (Voica *et al.*, 2016). Par conséquent, la diversité à la fois fonctionnelle et bactérienne des environnements naturels et contaminés, présentant des caractéristiques biotechnologiques et industrielles spécifiques a attiré plus d'attention à la communauté scientifique.

La résistance aux métaux toxiques est une caractéristique largement répandue parmi les bactéries et elle a été rapportée chez des microorganismes halophiles isolés à partir de plusieurs environnements salins (Nieto *et al.*, 1989; Ventosa *et al.*, 1998; Amoozegar *et al.*, 2005). Cependant, cette étude constitue la première analyse explorant la tolérance aux métaux lourds des bactéries halophiles présentes dans les écosystèmes salins algériens. Fait intéressant, les isolats bactériens ont montré des valeurs de CMI importantes pour le nickel- Ni^{2+} et le cuivre- Cu^{2+} avec des CMI (0,625 à 5 mM), et le cadmium- Cd^{2+} (CMI, 0,1 à 2 mM), le Zn^{2+} (CMI, 0,156 à 2 mM) en deuxième position. Des résultats similaires rapportés par Amoozegar *et al.* (2005) ont révélé que des isolats bactériens halophiles testés présentent de forte sensibilité au zinc, au nickel, à l'argent et au cobalt, et que la tolérance au cuivre et au cadmium variait entre les isolats. De plus, Nieto *et al.* (1989) ont également signalé des réactions similaires à l'argent, au cobalt, au nickel, au plomb et au zinc, où toutes les souches testées étaient sensibles à l'argent et au zinc et tolérantes au plomb.

Dans les sols, des membres de différentes populations bactériennes pourraient être exposés à des métaux toxiques, ce qui augmenterait leur capacité à croître et à survivre à des concentrations élevées en métaux (Margesin *et al.*, 2011, Dekak *et al.*, 2018). Les résultats d'une telle pression sélective, ainsi que d'autres conditions environnementales, telles que la température, la salinité et le pH (Voica *et al.*, 2016), peuvent contribuer à la sélection de la tolérance aux métaux parmi différentes espèces bactériennes.

Le niveau élevé de tolérance aux métaux toxiques parmi les isolats bactériens peut être attribué aux teneurs élevées en métaux dans ces zones humides salines analysées. Des études

antérieures ont montré une corrélation positive entre la tolérance aux métaux et les niveaux d'éléments toxiques présents dans un environnement (Neito *et al.*, 1989). En effet, la tolérance/résistance des métaux lourds chez les bactéries peut être conférée par l'acquisition de plasmides ou d'îlots génomiques contenant des gènes de résistance aux métaux codant/régulant différents mécanismes biologiques, notamment la liaison des métaux par la paroi cellulaire, par des protéines ou des polymères extracellulaires (polysaccharides), intra ou extracellulaires. séquestration, précipitation, biotransformation et immobilisation de métaux (Voica *et al.*, 2016).

7. Activité antifongique des bactéries halophiles

Les résultats de l'antagonisme ont montré que 10 bactéries sur 74 testées (13,5%) réduisaient significativement ($p < 0,0001$) la croissance des champignons mycéliens par rapport au contrôle non traité, et que l'inhibition de la croissance radiale des moisissures varie de (57,97-69,89%, 37,75-66,43%, 11,66-49,62% et 38,97-58,02%) pour (*B. cinerea*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides* et *P. capsici*), respectivement (Tableau 17). Il est à noter que les souches appartenant au genre *Bacillus* étaient les plus actives contre les agents pathogènes testés et que les inhibitions les plus élevées ont été obtenues avec les souches *Bacillus* spp. (BSKA6, BSKA10, BSOM9 et BSMD21) qui sont étroitement apparentés à *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*, *B. halotolerans* et *B. paralicheniformis* (Figure 36 A et B). Cependant, une faible activité antifongique contre *F. verticillioides* a été observée lors de l'essai des souches *Virgibacillus* sp. BCHS8 et *Halomonas* sp. BCTI5 alors qu'ils étaient inefficaces contre *B. cinerea*, *F. oxysporum* et *P. capsici*.

Botrytis cinerea, *Fusarium* spp. et *Phytophthora capsici* sont des agents pathogènes du sol, dévastateurs chez diverses espèces végétales hôtes et entraînant des pertes de rendement considérables à l'échelle mondiale (Dean *et al.*, 2007; Ezziyyani *et al.*, 2007). La lutte contre les maladies des plantes repose encore sur l'utilisation des fongicides chimiques, mais la dépendance excessive à l'égard des intrants chimiques a entraîné de graves problèmes, notamment : contamination de l'environnement, risques pour la sécurité, diminution de la biodiversité et apparition d'une résistance aux fongicides entraînant une perte d'efficacité de ces composés (Mu *et al.*, 2017). Par conséquent, les stratégies biologiques et microbiennes deviennent une alternative à la lutte contre ces maladies pouvant ainsi remplacer les fongicides chimiques synthétiques.

La production de composés biologiquement actifs comme les enzymes hydrolytiques qui dégradent les parois cellulaires fongiques, les lipopeptides et les composés organiques volatils (COV) dotés d'activités antifongiques puissantes sont parmi les facteurs clés en tant qu'agents de lutte biologique (Mendes *et al.*, 2013). Fait intéressant à noter, les souches testées *Bacillus* spp. (BSKA6, BSKA10, BSOM9 et BSMD21) ont montré des hydrolases hautement actives, principalement des protéases, xylanases et cellulases, qui peuvent agir comme enzymes antifongiques. Essghaier *et al.* (2009) ont rapporté que les bactéries halophiles modérées appartenant aux genres *Bacillus*, *Halomonas*, *Planocococcus*, *Terribacillus*, *Staphylococcus* et *Virgibacillus* pourraient être utiles dans la lutte biologique contre la moisissure grise causée par *Botrytis cinerea*. De même, Sadfi-Zouaoui *et al.* (2008) et Chen *et al.* (2010) ont signalé l'isolement de bactéries halophiles appartenant aux genres *Bacillus*, *Halobacillus* et *Halomonas*, à partir d'environnements salins présentant une activité antimicrobienne *in vitro* et *in vivo* contre différents agents phytopathogènes (*Botrytis cinerea*, *Fusarium* spp., *Verticillium dahliae*, *Colletotrichum* et *Spalarina solani*).

Tableau 15. Activité antifongique des bactéries halophiles isolées de Chotts et Sebkhass algériens.

Isolats bactériens	Espèce proche	Activité antifongique			
		<i>B. cinerea</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. verticillioides</i>	<i>P. capsici</i>
Control (sans traitement)		-	-	-	-
<i>Bacillus</i> sp. BCHS3	<i>B. atrophaeus</i>	57,97±2,41 ^b	64,80±0,4 ^a	35,61±1,6 ^{bc}	58,02±2,94 ^a
<i>Virgibacillus</i> sp. BCHS8	<i>V. salarius</i>	-	-	13,37±1,7 ^{de}	-
<i>Bacillus</i> sp. BSOM12	<i>B. subtilis</i> ¹	61,51±3,50 ^{ab}	48,01±0,9 ^{cd}	25,60±0,5 ^{cd}	48,20±0,44 ^{abc}
<i>Bacillus</i> sp. BSOM9	<i>B. halotolerans</i>	62,81±5,61 ^{ab}	45,65±0,1 ^d	40,48±0,3 ^{ab}	50,77±3,89 ^{abc}
<i>Bacillus</i> sp. BSKA1	<i>B. vallismortis</i>	61,52±3,78 ^{ab}	37,75±0,1 ^e	16,60±5,4 ^{de}	38,97±3,31 ^c
<i>Bacillus</i> sp. BSKA5	<i>B. endophyticus</i>	-	-	11,66±0,7 ^e	-
<i>Bacillus</i> sp. BSKA6	<i>B. subtilis</i> ²	69,89±1,07 ^a	66,43±4,5 ^a	45,03±0,5 ^{ab}	54,94±0,01 ^{ab}
<i>Bacillus</i> sp. BSKA10	<i>B. halotolerans</i>	62,96±1,91 ^{ab}	58,58±2,0 ^b	49,62±7,8 ^a	44,29±2,43 ^{bc}
<i>Bacillus</i> sp. BSMD21	<i>B. paralicheniformis</i>	64,09±2,88 ^{ab}	52,80±0,3 ^{bc}	35,58±3,3 ^{bc}	52,40±6,90 ^{ab}
<i>Halomonas</i> sp. BCTI5	<i>H. stenophila</i>	-	-	17,88±4,0 ^{de}	-

¹: *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, ²: *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*.

Les données sont la moyenne de deux répétitions ± écart type. Les moyennes suivies d'une lettre commune ne sont pas statistiquement différentes.

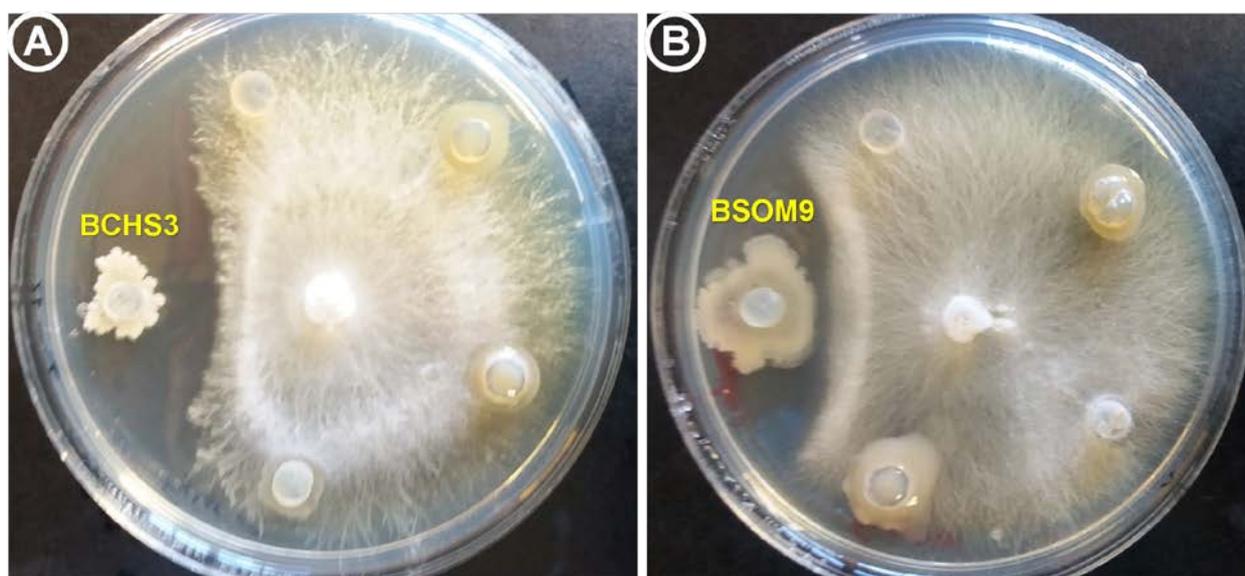


Figure 33. Activité antagoniste des souches de *Bacillus* sp. BChS3 et BSOM9 vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* (A), et *Fusarium verticillioides* (B).

III

*“Caractérisation phylogénétique et
analyse taxonomique des halophiles”*

**CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES**

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le principal objectif de ce projet de recherche était d'explorer la diversité microbienne (eubactérienne et archéenne) dans des écosystèmes hypersalés naturels (Chotts et Sebkhass) situés dans des zones arides et semi arides du Nord-Est algérien. Notre démarche s'est appuyée sur des approches microbiologiques classiques basées sur l'isolement de souches halophiles bactériennes et archéennes sur milieu riche et sélectif. En outre, nous avons choisi de mettre en œuvre une stratégie indépendante de la culture 'la métagénomique' et le séquençage à haut débit des amplicons de la région hypervariable V4 du gène de l'ARNr 16S.

Dans cette optique, des sols de cinq gradients et deux horizons (surface et profondeur) appartenant à de deux zones humides (Chott El Beida et Chott Tinsilt) ont été prélevés et utilisés comme matrice pour la métagénomique et l'analyse des populations microbiennes totales (procaryotes). L'exploration de la diversité bactérienne et archéenne par le séquençage d'amplicons des gènes d'ARNr 16S, amplifiés à partir de l'ADN métagénomique a permis d'identifier les populations générales et spécifiques de ces environnements. Nous avons ainsi montré que la fraction archée dans ces sols représentait en moyenne totale 20% de la communauté microbienne analysée avec une allure d'augmentation de l'abondance selon les gradients de prélèvement de la périphérie vers le centre du Chott. Par ailleurs, les bactéries ont été représentées par un taux moyen de plus de 75% de la totalité des séquences identifiées. En revanche et dans la même veine, une diversité élevée et spécifique a été observée le long des gradients des chotts et de la surface à la profondeur.

Trois phylums différents d'archées ont été identifiés, *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota* et *Thaumarchaeota*. Plus de 57% des séquences ont été affiliées à la classe des *Halobacteria* (phylum *Euryarchaeota*) avec 35 genres identifiés qui présentent les archées halophiles extrêmes et obligatoires. En outre, vingt-quatre différents phylums bactériens ont été détectés dans les deux Chotts, où les *Actinobacteria*, *Chloroflexi*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* et *Planctomycetes* étaient les principaux acteurs et les taxons les plus abondants. Des groupes à faible abondance comme *Acidobacteria*, *Aquificae*, *Cyanobacteria*, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia* et *Gemmatimonadetes* avec autres phyla plus rares ont été également identifiés. Les analyses physico-chimiques des sols salés des deux zones humides ont montré que la conductivité, la salinité (concentration en ions de chlorure et sodium), le phosphore et le magnésium étant les principaux paramètres édaphiques qui ont affecté la nature, la composition et la distribution des communautés bactériennes et archéennes dans leur biotope.

Ces résultats, confortés par l'étude de la diversité cultivable des halophiles issus des sols de sept sites (Chott et Sebkha) au Nord-Est de l'Algérie, ont montré que la population bactérienne et archéenne halophile et halotolérante viable et cultivable possède une signature particulière en terme diversité, adaptation et capacités métaboliques.

Une très grande variabilité de richesse en archées et eubactéries halophiles et halotolérantes a été notée en fonction des sols prélevés, du milieu et de la concentration en sel total utilisés pour l'isolement. Au total, 142 souches ont été retenues pour une identification moléculaire et analyse du potentiel biochimique dont, 68 isolats archéens halophiles et 74 eubactéries halophiles et halotolérantes.

Les résultats ont montré que l'ensemble des isolats bactériens appartenant à deux phylums majeurs, où les *Firmicutes* ont représenté le groupe le plus dominant avec 52 souches (70,2%), regroupant trois familles *Bacillaceae*, *Planococcaceae* et *Staphylococcaceae*, et différents genres, notamment *Bacillus* (34,6%) et *Halobacillus* (19,2%), suivis par *Oceanobacillus* et *Virgibacillus* avec 13,6% et 9,4% respectivement. Alors que les γ -*Proteobacteria* (22 souches/29,8%) ont été représentées par deux familles *Halomonadaceae* et *Idiomarinaceae*, dont 19 soit (86%) des souches affiliées aux genres *Halomonas* et *Halovibrio*.

Sur la base du séquençage ADNr 16S, les isolats archéens ont été attribués à sept phylotypes différents de la classe *Halobacteria* à savoir (*Haloarcula*, *Halococcus*, *Haloferax*, *Halogeometricum*, *Haloterrigena*, *Natrialba* et *Natrinema*, avec une dominance des genres *Haloferax* (30 souches) (44%) et *Halococcus* (13%).

Ces résultats démontrent que la distribution des souches sur la totalité des sols est structurée de manière hétérogène expliquée par (i) les conditions physicochimiques des sols salés qui influenceraient fortement la flore microbienne qualitativement et quantitativement, mais aussi et surtout (ii) la disponibilité en matière organique des échantillons collectés, et (iii) les conditions de culture utilisées (milieu, température, pH...).

Le criblage enzymatique des haloarchaea a montré que 89,7% et 52,9% des isolats produisaient respectivement au moins deux et trois enzymes hydrolytiques. Les souches à activité d'estérase, gélatinase, inulinase et cellulase constituaient le groupe fonctionnel le plus diversifié et le plus abondant. En ce qui concerne les archées producteurs de nucléase, pectinase et xylanase, elles sont classées en deuxième position en termes d'activité. Cependant, les activités protéasiques et nucléasiques ont été remarquées moins fréquemment avec respectivement 30,9% et 32,4% du total des souches isolées. Les isolats d'*Haloferax*, *Haloterrigena* et *Natrialba* ont dévoilé un large spectre d'activités enzymatiques, principalement actives à des fortes concentrations de sel et températures élevées. Fait

intéressant, de nombreux isolats ont montré une présence de toutes les enzymes hydrolytiques détectables, principalement chez les membres des genres *Haloferax* et *Haloarcula*.

Parmi les 74 bactéries isolées, 81% (60 isolats) ont présenté une croissance maximale sur le milieu HM contenant de 3 à 15% de sel total et peut atteindre dans certain cas 22,5% de sels. Ces isolats ont donc été classés comme halophiles modérés. L'analyse des activités hydrolytiques ont révélé que la majorité des isolats producteurs ont été assigné aux *Firmicutes*, comprenant les genres *Bacillus*, *Halobacillus*, *Oceanobacillus* et *Virgibacillus*, avec des niveaux élevés et un large spectre d'activités enzymatiques par rapport aux isolats de *γ-Proteobacteria*. Des activités élevées d'amylase, estérase, gélatinase et xylanase ont été observées chez les souches du genre *Bacillus*, *Halobacillus*, *Oceanobacillus* et *Virgibacillus*, suivies des activités moyennes cellulolytiques et protéasiques.

L'analyse phénotypique portant sur la tolérance bactérienne au cadmium- Cd^{2+} , cuivre- Cu^{2+} , nickel- Ni^{2+} et le zinc- Zn^{2+} , a mis en évidence l'existence d'isolats présentant une réelle tolérance au nickel- Ni^{2+} et cuivre- Cu^{2+} (CMI de 0,625 à 5 mM) par rapport aux Cd^{2+} (CMI : 0,1 à 2 mM) et les sels de Zn^{2+} (CMI : 0,156 à 2 mM). En outre, les bactéries habitant les Chotts situés dans les zones arides (Sebkha Djendli, Sebkha Oumache et Sebkha Kharala) ont regroupé les souches les plus tolérantes au Cd^{2+} et au Zn^{2+} (CMI supérieures à 4 mM). En outre, la plupart des isolats à Gram positif appartenant aux genres (*Bacillus*, *Halobacillus* et *Virgibacillus*) ont présenté respectivement des CMI élevées variant de 2,5 à 5 mM pour (Ni^{2+} , Cu^{2+} et Pb^{2+}) avec 40,4%. 44,2% et 40,4% de l'ensemble testé.

Les tests d'antagonisme ont montré que seulement 10 bactéries sur 74 testées ont inhibé significativement la croissance des champignons phytopathogènes (*B. cinerea*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides* et *P. capsici*). De plus, il est à noter que les souches appartenant au genre *Bacillus* (*B. subtilis* subsp. *inaquosorum*, *B. halotolerans* et *B. paralicheniformis*) ont été les plus actives. Cependant, de faibles activités antifongiques contre *F. verticillioides* ont été observées lors de l'essai des souches de *Virgibacillus* spp. et *Halomonas* sp.

Les études phylogénétiques ont permis de constater que certains isolats présentaient des pourcentages de similarité pour l'ARNr 16S relativement bas avec les espèces proches, ce qui pouvait suggérer la probabilité de nouveaux taxons. Ces isolats ont fait l'objet d'étude polyphasique plus approfondie, telles que l'analyse phylogénétique basée sur le séquençage d'ADNr 16S, de gènes de ménage (*rpoB*), la détermination du contenu en GC et par des tests d'homologies par hybridation ADN-ADN. Conjointement, des analyses phénotypiques et physiologiques ont été réalisées pour déterminer leur position taxinomique exacte. Deux souches se sont révélée potentiellement nouvelle, une bactérie du genre *Lentibacillus* et une archée

affiliée au genre *Haladaptatus*. Cependant, au vu des dernières recommandations du comité international de la systématique des procaryotes (International Committee on Systematics of Prokaryotes-ICSP), un séquençage complet des génomes devrait à l'avenir nous permettre de statuer par exactitude la position taxonomique de ces isolats.

Les approches moléculaires présentent l'avantage de décrire un grand nombre d'espèces microbiennes présentes dans une communauté, y compris les microorganismes non cultivables. Néanmoins, cette accession représente ainsi l'ADN génomique total de toutes formes microbiennes, même celles qui ne contribuent pas au système fonctionnel d'un biotope. Les méthodes classiques de microbiologie, malgré tous les biais qui leur sont associés, restent toujours importantes pour les études en écologie microbienne, car elles permettent l'isolement d'espèces pour la mise en collection et leurs analyses postérieures fournissent des informations sur le potentiel fonctionnel d'un écosystème. L'application de ces deux lignées d'études de la biodiversité doit donc se faire en synergie, de sorte que la complémentarité des informations générées puisse contribuer à une meilleure compréhension des communautés microbiennes.

Notre connaissance de la nature et la répartition des procaryotes dans ces écosystèmes salins est vraisemblablement encore inconnus et l'utilisation combinée des techniques métagénomiques et culturelles a démontré que ces environnements ont révélé une diversité inattendue de microorganismes notamment de bactéries et archées halophiles. Cependant, plusieurs perspectives sont envisagées comme continuité de ce travail :

- L'application des méthodes d'isolement avec d'autres conditions pourraient cibler des métabolismes beaucoup plus spécifiques (exp. autotrophie) par rapport aux hétérotrophes.
- La valorisation de différents biotopes extrêmes par la mise en évidence de nouveaux taxons, en diversifiant les échantillons et aussi les milieux de culture d'isolement.
- L'utilisation des cultures d'enrichissement de faibles voire très faibles concentrations en nutriments (conditions d'oligotrophie) ou en présence de facteurs de croissance, pourrait être une stratégie efficace pour limiter la croissance des hétérotrophes et ainsi augmenter la diversité microbienne en accédant à de nouveaux microorganismes et taxons encore 'incultivés' mais sans doute pas 'incultivables' à partir des écosystèmes hypersalés.
- Les techniques moléculaires d'écologie microbienne sont pour l'heure essentiellement basées sur l'utilisation des séquences d'ARN ribosomiques dans un but

d'identification des microorganismes d'un environnement donné. A cet égard, l'utilisation de sondes nucléiques plus spécifiques (d'une classe, ordre, famille ou même d'un genre) permettrait de suivre plus précisément certaines populations microbiennes au sein d'une communauté ou bien de les utiliser dans le cadre de dénombrement et la détection des populations bactériennes métaboliquement actives.

- L'utilisation des méthodes d'empreint génétique et des oligonucléotides ciblant des gènes codant pour des enzymes clés de certaines voies métaboliques permettraient de détecter dans une communauté des populations potentiellement associées à une fonction ciblée (exp. substances actives).
- L'utilisation des approches méta-omiques (génomique, transcriptomique, protéomique, et métabolomique) pour une prospection directe des enzymes hydrolytiques et substances bioactives d'intérêt biotechnologique.

Références bibliographiques

- Abdallah, M. B., Karray, F., Mhiri, N., Mei, N., Quémeneur, M., Cayol, J.L et al. **2016**. Prokaryotic diversity in a Tunisian hypersaline lake, Chott El Jerid. *Extremophiles*, 20(2), 125-138.
- Abule, E., Snyman, H. A., Smit, G. N. **2007**. Rangeland evaluation in the middle Awash valley of Ethiopia: I. Herbaceous vegetation cover. *Journal of Arid Environments*, 70(2), 253-271.
- Acinas, S. G., Marcelino, L. A., Klepac-Ceraj, V., Polz, M. F. **2004**. Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple rrm operons. *Journal of Bacteriology*, 186(9), 2629-2635.
- Addinsoft's. **2014**. XLSTAT Version 2014.3.07. <http://www.xlstat.com>. Copyright Addinsoft, (1995-2014).
- Aguilera, M., Monteoliva-Sánchez, M., Suárez, A., Guerra, V., Lizama, C., Bennasar, A., Ramos-Cormenzana, A. **2001**. *Paenibacillus jamilae* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium able to grow in olive-mill wastewater. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(5), 1687-1692.
- Aino, K., Hirota, K., Matsuno, T., Morita, N., Nodasaka, Y., Fujiwara, T et al. **2008**. *Bacillus polygona* sp. nov., a moderately halophilic, non-motile obligate alkaliphile isolated from indigo balls. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(1), 120-124.
- Aliat, T., Kaabeche, M., Khomri, H., Nouri, L., Neffar, S., Chenchouni, H. **2016**. A pedological characterisation of some inland wetlands and Ramsar sites in Algeria. *Land Degradation and Développement*, 27, 693-705.
- Allais, J. J., Kammoun, S., Blanc, P., Girard, C., Baratti, J. C. **1986**. Isolation and characterization of bacterial strains with inulinase activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 52(5), 1086-1090.
- Al-Mueini, R., Al-Dalali, M., Al-Amri, I. S., Patzelt, H. **2007**. Hydrocarbon degradation at high salinity by a novel extremely halophilic actinomycete. *Environmental Chemistry*, 4(1), 5-7.
- Alves, L. D. F., Westmann, C. A., Lovate, G. L., de Siqueira, G. M. V., Borelli, T. C., Guazzaroni, M. E. **2018**. Metagenomic approaches for understanding new concepts in microbial science. *International Journal of Genomics*, 2018.
- Al-Zarban, S. S., Abbas, I., Al-Musallam, A. A., Steiner, U., Stackebrandt, E., Kroppenstedt, R. M. **2002a**. *Nocardopsis halotolerans* sp. nov., isolated from salt marsh soil in Kuwait. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(2), 525-529.
- Al-Zarban, S. S., Al-Musallam, A. A., Abbas, I., Stackebrandt, E., Kroppenstedt, R. M. **2002b**. *Saccharomonospora halophila* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from marsh soil in Kuwait. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(2), 555-558.
- Ameri, A., Shakibaie, M., Amirpour-Rostami, S., Ameri, A., Adeli-Sardou, M., Khazaeli, P et al. **2015**. Partial purification and characterization of a thermoalkalophilic lipase originated from *Bacillus atrophaeus* FSHM2 and its application for ester synthesis. *Biotechnology*, 14(4), 154-164.
- Amoozegar, M. A., Hamed, J., Dadashpour, M., Shariatpanahi, S. **2005**. Effect of salinity on the tolerance to toxic metals and oxyanions in native moderately halophilic spore-forming bacilli. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(6-7), 1237-1243.
- Amoozegar, M. A., Malekzadeh, F., Malik, K. A. **2003**. Production of amylase by newly isolated moderate halophile, *Halobacillus* sp. strain MA-2. *Journal of Microbiological Methods*, 52(3), 353-359.
- Amoozegar, M. A., Salehghamari, E., Khajeh, K., Kabiri, M., Naddaf, S. **2008**. Production of an extracellular thermohalophilic lipase from a moderately halophilic bacterium, *Salinivibrio* sp. strain SA-2. *Journal of Basic Microbiology*, 48(3), 160-167.
- Amoozegar, M. A., Siroosi, M., Atashgahi, S., Smidt, H., Ventosa, A. **2017**. Systematics of haloarchaea and biotechnological potential of their hydrolytic enzymes. *Microbiology*, 163(5), 623-645.
- Antón, J., Oren, A., Benlloch, S., Rodríguez-Valera, F., Amann, R., Rosselló-Mora, R. **2002**. *Salinibacter ruber* gen. nov., sp. nov., a novel, extremely halophilic member of the Bacteria from saltern crystallizer ponds. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(2), 485-491.
- Antón, J., Peña, A., Santos, F., Martínez-García, M., Schmitt-Kopplin, P., Rosselló-Mora, R. **2008**. Distribution, abundance and diversity of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *Saline Systems*, 4(1), 15.
- Antranikian, G., Vorgias, C. E., Bertoldo, C. **2005**. Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysts. In *Marine biotechnology I* (pp. 219-262). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Aouad, M., Taib, N., Oudart, A., Lecocq, M., Gouy, M., Brochier-Armanet, C. **2018**. Extreme halophilic archaea derive from two distinct methanogen Class II lineages. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 127, 46-54.
- Arahal, D. R., Dewhirst, F. E., Paster, B. J., Volcani, B. E., Ventosa, A. **1996**. Phylogenetic analyses of some

- extremely halophilic archaea isolated from Dead Sea water, determined on the basis of their 16S rRNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(10), 3779-3786.
- Arahah, D. R., Vreeland, R. H., Litchfield, C. D., Mormile, M. R., Tindall, B. J., Oren, A et al. **2007**. Recommended minimal standards for describing new taxa of the family *Halomonadaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(10), 2436-2446.
 - Arora, S., Vanza, M. **2017**. Microbial approach for bioremediation of saline and sodic soils. In *Bioremediation of Salt Affected Soils: An Indian Perspective* (pp. 87-100). Springer, Cham.
 - Aubert, G. **1983**. Observations sur les caractéristiques, la dénomination et la classification des sols salés ou salsodiques. *Cah. ORSTOM, série pédologie*, 20(1), 73-78.
 - Auckloo, B. N., Wu, B. **2016**. Antibiotics derived from marine organisms: their chemistry and biological mode of action. In *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 51, pp. 483-515). Elsevier.
 - Baati, H., Amdouni, R., Gharsallah, N., Sghir, A., Ammar, E. **2010**. Isolation and characterization of moderately halophilic bacteria from Tunisian solar saltern. *Current Microbiology*, 60(3), 157-161.
 - Baati, H., Guerhazi, S., Amdouni, R., Gharsallah, N., Sghir, A., Ammar, E. **2008**. Prokaryotic diversity of a Tunisian multipond solar saltern. *Extremophiles*, 12(4), 505-518.
 - Baize, D. **1988**. Guide des analyses courantes en pédologie. Institut national de la recherche agronomique, Paris, France, 172p.
 - Baize, D. **2000**. Teneurs totales en «métaux lourds» dans les sols français: résultats généraux du programme ASPITET. Guide des analyses en pédologie, 2^{me} édition revue et augmentée. INRA, Paris. Beckett (pp. 37-46).
 - Baize, D., Jabiol, B. **1995**. Guide pour la description des sols. Institut national de la recherche agronomique, Paris, France, 322p.
 - Ballav, S., Kerkar, S., Thomas, S., Augustine, N. **2015**. Halophilic and halotolerant actinomycetes from a marine saltern of Goa, India producing anti-bacterial metabolites. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119(3), 323-330.
 - Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P et al. **2016**. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 80(1), 1-43.
 - Bastviken, D., Thomsen, F., Svensson, T., Karlsson, S., Sandén, P., Shaw, G et al. **2007**. Chloride retention in forest soil by microbial uptake and by natural chlorination of organic matter. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 71(13), 3182-3192.
 - Bates, S. T., Berg-Lyons, D., Caporaso, J. G., Walters, W. A., Knight, R., Fierer, N. **2011**. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. *The ISME journal*, 5(5), 908.
 - Baumgartner, L. K., Dupraz, C., Buckley, D. H., Spear, J. R., Pace, N. R., Visscher, P. T. **2009**. Microbial species richness and metabolic activities in hypersaline microbial mats: insight into biosignature formation through lithification. *Astrobiology*, 9(9), 861-874.
 - Bechim L., Bacha B. **2005**. Approche bioécologique des zones humides et des oiseaux d'eau de la région Sud-Constantinoise. Mémoire. Ingeniorat en Écologie, Université de Batna. Algérie. 109p.
 - Belin, P., Moutiez, M., Lautru, S., Seguin, J., Pernodet, J. L., Gondry, M. **2012**. The nonribosomal synthesis of diketopiperazines in tRNA-dependent cyclodipeptide synthase pathways. *Natural Product Reports*, 29(9), 961-979.
 - Benhadj, M., Gacemi-Kirane, D., Menasria, T., Guebla, K., Ahmane, Z. **2018**. Screening of rare actinomycetes isolated from natural wetland ecosystem (Fetzara Lake, northeastern Algeria) for hydrolytic enzymes and antimicrobial activities. *Journal of King Saud University-Science*, 31, 706-712.
 - Benhadj, S. **2018**. Isolement et Identification des Actinomycètes isolées du lac Fetzara (Recherche de molécules bioactives). Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar-Annaba, Algérie.
 - Benloch, S., López-López, A., Casamayor, E. O., Øvreås, L., Goddard, V., Daae, F. L. Pedrós-Alió, C. **2002**. Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern. *Environmental Microbiology*, 4(6), 349-360.
 - Benloch, S., López-López, A., Casamayor, E. O., Øvreås, L., Goddard, V., Daae, F. L et al. **2002**. Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern. *Environmental Microbiology*, 4(6), 349-360.
 - Bennur, T., Kumar, A. R., Zinjarde, S., Javdekar, V. **2015**. Nocardiosis species: Incidence, ecological roles and adaptations. *Microbiological Research*, 174, 33-47.
 - Berendsen, R. L., Pieterse, C. M., Bakker, P. A. **2012**. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 17(8), 478-486.
 - Besse, A., Peduzzi, J., Rebuffat, S., Carre-Mlouka, A. **2015**. Antimicrobial peptides and proteins in the face of extremes: Lessons from archaeocins. *Biochimie*, 118, 344-355.
 - Biggs, A. J. W., Bryant, K., Watling, K. M. **2010**. Soil chemistry and morphology transects to assist wetland delineation in four semi-arid saline lakes, south-western Queensland. *Soil Research*, 48(3), 208-220.

- Biller, S. J., Mosier, A. C., Wells, G. F., Francis, C. A. **2012**. Global biodiversity of aquatic ammonia-oxidizing archaea is partitioned by habitat. *Frontiers in microbiology*, 3, 252.
- Bing-Ru, L. I. U., Guo-Mei, J. I. A., Jian, C. H. E. N., Gang, W. A. N. G. **2006**. A review of methods for studying microbial diversity in soils. *Pedosphere*, 16(1), 18-24.
- Blandin, P. **2010**. Biodiversité, L'avenir du vivant. Paris : Albin Michel, 260p.
- Bolhuis, H., Palm, P., Wende, A., Falb, M., Rampp, M., Rodriguez-Valera, F et al. **2006**. The genome of the square archaeon *Haloquadratum walsbyi*: life at the limits of water activity. *BMC genomics*, 7(1), 169.
- Bonneau, M., Souchier, B. **1994**. Pédologie. Constituants et propriétés du sol. Masson, (pp. 263-264).
- Booncharoen, A., Visessanguan, W., Kuncharoen, N., Yiamsombut, S., Santiyanont, P., Mhuanong, W et al. **2019**. *Lentibacillus lipolyticus* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from shrimp paste (Kapi). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69 (11), 3529-3536.
- Boucher, Y., Douady, C. J., Sharma, A. K., Kamekura, M., Doolittle, W. F. **2004**. Intragenomic heterogeneity and intergenomic recombination among haloarchaeal rRNA genes. *Journal of Bacteriology*, 186(12), 3980-3990.
- Boutaiba, S., Bhatnagar, T., Hacene, H., Mitchell, D. A., Baratti, J. C. **2006**. Preliminary characterisation of a lipolytic activity from an extremely halophilic archaeon, *Natronococcus* sp. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 41(1-2), 21-26.
- Boutaiba, S., Hacène, H., Bidle, K. A., Maupin-Furlow, J. A. **2011**. Microbial diversity of the hypersaline Sidi Ameur and Himalatt salt lakes of the Algerian Sahara. *Journal of arid environments*, 75(10), 909-916.
- Bryant, R.G., Rainey, M.P. **2002**. Investigation of flood inundation on playas within the Zone of Chotts, using a time-series of AVHRR. *Remote Sensing and Environment* 82:360–375.
- Buck, J. D. **1982**. Nonstaining (KOH) method for determination of gram reactions of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(4), 992-993.
- Buckley, D. H., Huangyutham, V., Nelson, T. A., Rumberger, A., Thies, J. E. **2006**. Diversity of Planctomycetes in soil in relation to soil history and environmental heterogeneity. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), 4522-4531.
- Buckman, H. O., Brady, N. C. **1960**. The nature and properties of soils. *Soil Science*, 90(3), 212.
- Burns, D. G., Camakarlis, H. M., Janssen, P. H., Dyall-Smith, M. L. **2004**. Combined use of cultivation-dependent and cultivation-independent methods indicates that members of most haloarchaeal groups in an Australian crystallizer pond are cultivable. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(9), 5258-5265.
- Camacho, R. M., Mateos, J. C., González-Reynoso, O., Prado, L. A., Córdova, J. **2009**. Production and characterization of esterase and lipase from *Haloarcula marismortui*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(7), 901-909.
- Campbell, B. J., Kirchman, D. L. **2013**. Bacterial diversity, community structure and potential growth rates along an estuarine salinity gradient. *The ISME Journal*, 7(1), 210.
- Canfora, L., Bacci, G., Pinzari, F., Papa, G. L., Dazzi, C., Benedetti, A. **2014**. Salinity and bacterial diversity: to what extent does the concentration of salt affect the bacterial community in a saline soil?. *PLoS One*, 9(9), e106662.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N et al. **2012**. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME journal*, 6(8), 1621.
- Carvalho, M. F., Ma, Y., Oliveira, R. S., Freitas, H. **2017**. Endophytic Actinobacteria for Sustainable Agricultural Applications. In *Endophytes: Crop Productivity and Protection* (pp. 163-189). Springer, Cham.
- Casamayor, E. O., Triadó-Margarit, X., Castañeda, C. **2013**. Microbial biodiversity in saline shallow lakes of the Monegros Desert, Spain. *FEMS Microbiology Ecology*, 85(3), 503-518.
- Chakraborty, S., Khopade, A., Biao, R., Jian, W., Liu, X. Y., Mahadik, K et al. **2011**. Characterization and stability studies on surfactant, detergent and oxidant stable α -amylase from marine haloalkaliphilic *Saccharopolyspora* sp. A9. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68(1), 52-58.
- Chang, W. **2013**. R graphics cookbook. O'Reilly Media: Sebastopol, CA, USA., 416p.
- Chao, A. **1984**. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of statistics*, 11(4) 265-270.
- Charlesworth, J. C., Burns, B. P. **2015**. Untapped resources: biotechnological potential of peptides and secondary metabolites in archaea. *Archaea*, 2015. ID 282035. doi.org/10.1155/2015/282035
- Chen, L., Wang, G., Bu, T., Zhang, Y., Wang, Y., Liu, M., Lin, X. **2010**. Phylogenetic analysis and screening of antimicrobial and cytotoxic activities of moderately halophilic bacteria isolated from the Weihai Solar Saltern (China). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(5), 879-888.

- Chen, L., Wang, G., Bu, T., Zhang, Y., Wang, Y., Liu, M., Lin, X. **2010**. Phylogenetic analysis and screening of antimicrobial and cytotoxic activities of moderately halophilic bacteria isolated from the Weihai Solar Saltern (China). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(5), 879-888.
- Chen, S., Xu, Y., Sun, S., Liu, J., Chen, F. **2019**. *Halomicrococcus hydrotolerans* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a subterranean salt deposit. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. **Doi:** [10.1099/ijsem.0.003534](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003534)
- Chen, Y. G., Wang, Y. X., Zhang, Y. Q., Tang, S. K., Liu, Z. X., Xiao, H. D et al. **2009**. *Nocardiopsis litoralis* sp. nov., a halophilic marine actinomycete isolated from a sea anemone. *International journal of systematic and evolutionary Microbiology*, 59(11), 2708-2713.
- Chenchouni, H., Menasria, T., Neffar, S., Chafaa, S., Bradai, L., Chaibi et al. **2015**. Spatiotemporal diversity, structure and trophic guilds of insect assemblages in a semi-arid Sabkha ecosystem. *PeerJ*, 3, e860.
- Chhour, K. L., Nadkarni, M. A., Byun, R., Martin, F. E., Jacques, N. A., Hunter, N. **2005**. Molecular analysis of microbial diversity in advanced caries. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(2), 843-849.
- Chun, J., Oren, A., Ventosa, A., Christensen, H., Arahal, D. R., da Costa, M. S et al. **2018**. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(1), 461-466.
- Claesson, M. J., Wang, Q., O'Sullivan, O., Greene-Diniz, R., Cole, J. R., Ross, R. P., O'Toole, P. W. **2010**. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic acids research*, 38(22), e200.
- Colwell, R.K. **2013**. EstimateS: statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 7.5. <http://purl.oclc.org/estimates>.
- Coque, R., Tricat, J., Cailleux, A. **1972**. Le modèle des régions sèches, traité de géomorphologie. Tome IV. In *Annales de géographie* (Vol. 81, No. 448, pp. 734-740). Société de géographie.
- Coronado, M. J., Vargas, C., Mellado, E., Tegos, G., Drainas, C., Nieto, J. J., Ventosa, A. **2000**. The α -amylase gene amyH of the moderate halophile *Halomonas meridiana*: cloning and molecular characterization. *Microbiology*, 146(4), 861-868.
- D'Alessandro, C. P., De Castro, R. E., Giménez, M. I., Paggi, R. A. **2007**. Effect of nutritional conditions on extracellular protease production by the haloalkaliphilic archaeon *Natrialba magadii*. *Letters in Applied Microbiology*, 44(6), 637-642.
- Dahllöf, I. **2002**. Molecular community analysis of microbial diversity. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(3), 213-217.
- Dalmaso, G., Ferreira, D., Vermelho, A. **2015**. Marine extremophiles: a source of hydrolases for biotechnological applications. *Marine drugs*, 13(4), 1925-1965.
- Dammak, D. F., Smaoui, S. M., Ghanmi, F., Boujelben, I., Maalej, S. **2016**. Characterization of halo-alkaline and thermostable protease from *Halorubrum ezzemoulense* strain ETR14 isolated from Sfax solar saltern in Tunisia. *Journal of Basic Microbiology*, 56(4), 337-346.
- Daniel, R. **2005**. The metagenomics of soil. *Nature reviews microbiology*, 3(6), 470-478
- DasSarma, S. **2006**. Extreme halophiles are models for astrobiology. *Microbe*, 1(3), 120-126.
- DasSarma, S., DasSarma, P. **2015**. Halophiles and their enzymes: negativity put to good use. *Current Opinion in Microbiology*, 25, 120-126.
- DasSarma, S., DasSarma, P. **2017**. Halophiles. In: *eLS*, Wiley Ltd: Chichester, p:1-13.
- de la Haba R. R., Sánchez-Porro, C., Ventosa, A. **2011a**. Taxonomy, phylogeny, and biotechnological interest of the family *Halomonadaceae*. In *Halophiles and Hypersaline Environments* (pp. 27-64). Springer, Berlin, Heidelberg.
- de la Haba, R. R., Sánchez-Porro, C., Márquez, M. C., Ventosa, A. **2011b**. Taxonomy of halophiles. *Extremophiles handbook*, 255-308.
- De Ley, J., Cattoir, H., Reynaerts, A. **1970**. The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *European Journal of Biochemistry*, 12(1), 133-142.
- de Lourdes Moreno, M., García, M. T., Ventosa, A., Mellado, E. **2009**. Characterization of *Salicola* sp. IC10, a lipase-and protease-producing extreme halophile. *FEMS Microbiology Ecology*, 68(1), 59-71.
- de Lourdes Moreno, M., Pérez, D., García, M., Mellado, E. **2013**. Halophilic bacteria as a source of novel hydrolytic enzymes. *Life*, 3(1), 38-51.
- Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D et al. **2012**. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13(4), 414-430.
- Dekak, A., Chabi, R., Menasria, T., Benhizia, Y. **2018**. Phenotypic characterization of rhizobia nodulating legumes *Genista microcephala* and *Argyrolobium uniflorum* growing under arid conditions. *Journal of Advanced Research*, 14, 35-42.
- Del Campo, M. M., Camacho, R. M., Mateos-Díaz, J. C., Müller-Santos, M., Córdova, J., Rodríguez, J. A.

2015. Solid-state fermentation as a potential technique for esterase/lipase production by halophilic archaea. *Extremophiles*, 19(6), 1121-1132.
- Delgado-García, M., Valdivia-Urdiales, B., Aguilar-González, C. N., Contreras-Esquivel, J. C., Rodríguez-Herrera, R. 2012. Halophilic hydrolases as a new tool for the biotechnological industries. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(13), 2575-2580.
 - DeMaere, M. Z., Williams, T. J., Allen, M. A., Brown, M. V., Gibson, J. A., Rich, J et al. 2013. High level of intergenera gene exchange shapes the evolution of haloarchaea in an isolated Antarctic lake. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(42), 16939-16944.
 - Demergasso, C., Casamayor, E. O., Chong, G., Galleguillos, P., Escudero, L., Pedrós-Alió, C. 2004. Distribution of prokaryotic genetic diversity in athalassohaline lakes of the Atacama Desert, Northern Chile. *FEMS Microbiology Ecology*, 48(1), 57-69.
 - Demergasso, C., Casamayor, E. O., Chong, G., Galleguillos, P., Escudero, L., Pedrós-Alió, C. 2004. Distribution of prokaryotic genetic diversity in athalassohaline lakes of the Atacama Desert, Northern Chile. *FEMS Microbiology Ecology*, 48(1), 57-69.
 - Demergasso, C., Escudero, L., Casamayor, E. O., Chong, G., Balagué, V., Pedrós-Alió, C. 2008. Novelty and spatio-temporal heterogeneity in the bacterial diversity of hypersaline Lake Tebenquiche (Salar de Atacama). *Extremophiles*, 12(4), 491-504.
 - Demnati, F., Samraoui, B., Allache, F., Sandoz, A., Ernoul, L. 2017. A literature review of Algerian salt lakes: values, threats and implications. *Environmental Earth Sciences*, 76(3), 127.
 - Dey, T. B., Kumar, A., Banerjee, R., Chandna, P., Kuhad, R. C. 2016. Improvement of microbial α -amylase stability: strategic approaches. *Process Biochemistry*, 51(10), 1380-1390.
 - Dong, D., Yan, A., Liu, H., Zhang, X., Xu., Y. 2006. Removal of humic substances from soil DNA using aluminium sulfate. *Journal of Microbiological Methods*, 66(2), 217-222.
 - Drouet, E. 2010. *Impact de la température sur la carbonatation des matériaux cimentaires: prise en compte des transferts hydriques*. Thèse de Doctorat, Université Paris7, France.
 - Duangmal, K., Suksaard, P., Pathom-Aree, W., Mingma, R., Matsumoto, A., Takahashi, Y. 2016. *Actinopolyspora salinaria* sp. nov., a halophilic actinomycete isolated from solar saltern soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(4), 1660-1665.
 - Dubey, R. K., Tripathi, V., Prabha, R., Chaurasia, R., Singh, D. P., Rao, C. S et al. 2020. Methods for Exploring Soil Microbial Diversity. In *Unravelling the Soil Microbiome* (pp. 23-32). Springer, Cham.
 - Dubost, D. 2002. Écologie, aménagement et développement agricole des oasis algériennes. CRSTRA, Biskra.
 - Duchaufour, P. 1995. Pedology. Soil, vegetation, environment. *Pedology. Soil, vegetation, environment.*, (Ed. 4).
 - Dumont, M. G., Murrell, J. C. 2005. Stable isotope probing—linking microbial identity to function. *Nature Reviews Microbiology*, 3(6), 499-504.
 - Durand, J. H. 1983. Les sols irrigables; etude pedologique. (No. 631.47 D8).
 - Dussault, H. P. 1955. An improved technique for staining red halophilic bacteria. *Journal of Bacteriology*, 70(4), 484-485.
 - Edbeib, M. F., Wahab, R. A., Huyop, F. 2016. Halophiles: biology, adaptation, and their role in decontamination of hypersaline environments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(8), 135.
 - Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*, 5(1), 113.
 - Edgar, R. C. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26(19), 2460-2461.
 - Edgar, R. C. 2013. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature methods*, 10(10), 996-998.
 - Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., Knight, R. 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27(16), 2194-2200.
 - Elbanna, K., Ibrahim, I. M., Revol-Junelles, A. M. 2015. Purification and characterization of halo-alkali-thermophilic protease from *Halobacterium* sp. strain HP25 isolated from raw salt, Lake Qarun, Fayoum, Egypt. *Extremophiles*, 19(4), 763-774.
 - Ellis, R. J., Morgan, P., Weightman, A. J., Fry, J. C. 2003. Cultivation-dependent and-independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), 3223-3230.
 - Elshahed, M. S., Savage, K. N., Oren, A., Gutierrez, M. C., Ventosa, A., Krumholz, L. R. 2004. *Haloferax sulfurifontis* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a sulfide-and sulfur-rich spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(6), 2275-2279.
 - Emmerich, M., Bhansali, A., Lösekann-Behrens, T., Schröder, C., Kappler, A., Behrens, S. 2012. Abundance, distribution, and activity of Fe (II)-oxidizing and Fe (III)-reducing microorganisms in

- hypersaline sediments of Lake Kasin, southern Russia. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(12), 4386-4399.
- Essghaier, B., Fardeau, M. L., Cayol, J. L., Hajlaoui, M. R., Boudabous, A., Jijakli, H., Sadfi-Zouaoui, N. **2009**. Biological control of grey mould in strawberry fruits by halophilic bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 106(3), 833-846.
 - Evans, S. E., Wallenstein, M. D. **2012**. Soil microbial community response to drying and rewetting stress: does historical precipitation regime matter? *Biogeochemistry*, 109(1-3), 101-116.
 - Ezziyiani, M., Requena, M. E., Egea-Gilbert, C., Candela, M. E. **2007**. Biological control of Phytophthora root rot of pepper using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in combination. *Journal of Phytopathology*, 155(6), 342-349.
 - Fanning, S., Hall, L. J., Cronin, M., Zomer, A., MacSharry, J., Goulding, D et al. **2012**. Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(6), 2108-2113.
 - FAO. **2005**. Global network on integrated soil management for sustainable use of salt-affected soils. Rome, Italy: FAO Land and Plant Nutrition Management Service.
 - Felsenstein, J. **1985**. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783-791.
 - Ferragut, C., Leclerc, H. **1976**. Étude comparative des méthodes de détermination du Tm de l'ADN bactérien. *Annal de Microbiologie*, 127, 223-235.
 - Fierer, N., Bradford, M. A., Jackson, R. B. **2007**. Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology*, 88(6), 1354-1364.
 - Fierer, N., Jackson, R. B. **2006**. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(3), 626-631.
 - Fierer, N., Leff, J. W., Adams, B. J., Nielsen, U. N., Bates, S. T., Lauber, C. L et al. **2012**. Cross-biome metagenomic analyses of soil microbial communities and their functional attributes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(52), 21390-21395.
 - Fierer, N., Schimel, J. P., Holden, P. A. **2003**. Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(1), 167-176.
 - Florea, N., Al-Joumaa, K. **1998**. Genesis and classification of gypsiferous soils of the Middle Euphrates Floodplain, Syria. *Geoderma*, 87(1-2), 67-85.
 - Flores-Gallegos, A. C., Delgado-García, M., Ascacio-Valdés, J. A., Villareal-Morales, S., Michel-Michel, M. R., Aguilar-González, C. N., Rodríguez-Herrera, R. **2019**. Hydrolases of Halophilic Origin with Importance for the Food Industry. In *Enzymes in Food Biotechnology* (pp. 197-219). Academic Press.
 - Fortin, N., Beaumier, D., Lee, K., Greer, C. W. **2004**. Soil washing improves the recovery of total community DNA from polluted and high organic content sediments. *Journal of Microbiological Methods*, 56(2), 181-191.
 - Franzosa, E. A., Hsu, T., Sirota-Madi, A., Shafquat, A., Abu-Ali, G., Morgan, X. C., Huttenhower, C. **2015**. Sequencing and beyond: integrating molecular 'omics' for microbial community profiling. *Nature Reviews Microbiology*, 13(6), 360-372.
 - Frazier, W. C. **1926**. A method for the detection of changes in gelatin due to bacteria. *The Journal of Infectious Diseases*, 302-309.
 - Fuerst, J. A., Sagulenko, E. **2011**. Beyond the bacterium: planctomycetes challenge our concepts of microbial structure and function. *Nature Reviews Microbiology*, 9(6), 403-413.
 - Galinski, E. A. **1995**. Osmoadaptation in bacteria. In *Advances in microbial physiology* (Vol. 37, pp. 273-328). Academic Press.
 - Garcia-Pichel, F., López-Cortés, A., Nübel, U. **2001**. Phylogenetic and morphological diversity of cyanobacteria in soil desert crusts from the Colorado Plateau. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4), 1902-1910.
 - Garrity, G., Staley, J. T., Boone, D. R., De Vos, P., Goodfellow, M., Rainey, F. A et al. **2006**. *Bergey's Manual® of systematic bacteriology: volume two: the proteobacteria*. Springer Science and Business Media.
 - Gentry, T. J., Wickham, G. S., Schadt, C. W., He, Z., Zhou, J. **2006**. Microarray applications in microbial ecology research. *Microbial Ecology*, 52(2), 159-175.
 - Ghai, R., Pašić, L., Fernández, A. B., Martín-Cuadrado, A. B., Mizuno, C. M., McMahon, K. D et al. **2011**. New abundant microbial groups in aquatic hypersaline environments. *Scientific Reports*, 1, 135.
 - Ghasemi, Y., Rasoul-Amini, S., Kazemi, A., Zarrini, G., Morowvat, M. H., Kargar, M. **2011**. Isolation and characterization of some moderately halophilic bacteria with lipase activity. *Microbiology*, 80(4), 477-481.
 - Ghio, S., Di Lorenzo, G. S., Lia, V., Talia, P., Cataldi, A., Grasso, D., Campos, E. **2012**. Isolation of *Paenibacillus* sp. and *Variovorax* sp. strains from decaying woods and characterization of their potential for cellulose deconstruction. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 3(4), 352-364.
 - Ghozlan, H., Deif, H., Kandil, R. A., Sabry, S. **2006**. Biodiversity of moderately halophilic bacteria in

- hypersaline habitats in Egypt. *The Journal of general and applied microbiology*, 52(2), 63-72.
- Gochnauer, M. B., Leppard, G. G., Komarata, P., Kates, M., Novitsky, T., Kushner, D. J. **1975**. Isolation and characterization of *Actinopolyspora halophila*, gen. et sp. nov., an extremely halophilic actinomycete. *Canadian journal of microbiology*, 21(10), 1500-1511.
 - Goh, F., Leuko, S., Allen, M. A., Bowman, J. P., Kamekura, M., Neilan, B. A., Burns, B. P. **2006**. *Halococcus hamelinensis* sp. nov., a novel halophilic archaeon isolated from stromatolites in Shark Bay, Australia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(6), 1323-1329.
 - Gohel, S. D., Singh, S. P. **2012**. Purification strategies, characteristics and thermodynamic analysis of a highly thermostable alkaline protease from a salt-tolerant alkaliphilic actinomycete, *Nocardopsis alba* OK-5. *Journal of Chromatography B*, 889, 61-68.
 - Gohel, S. D., Singh, S. P. **2012**. Cloning and expression of alkaline protease genes from two salt-tolerant alkaliphilic actinomycetes in *E. coli*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50(3), 664-671.
 - Gonzalez, C., Gutierrez, C., Ramirez, C. **1978**. *Halobacterium vallismortis* sp. nov. An amyolytic and carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacterium. *Canadian Journal of Microbiology*, 24(6), 710-715.
 - Grote, J., Jost, G., Labrenz, M., Herndl, G. J., Jürgens, K. **2008**. *Epsilonproteobacteria* represent the major portion of chemoautotrophic bacteria in sulfidic waters of pelagic redoxclines of the Baltic and Black Seas. *Applied Environmental Microbiology*, 74(24), 7546-7551.
 - Grünberger, O. **2015**. Dynamiques salines des sols des milieux arides et semi-arides. Thèse de Doctorat, Université de Montpellier, France.
 - Guan, T. W., Xia, Z. F., Xiao, J., Wu, N., Chen, Z. J., Zhang, L. L., Zhang, X. P. **2011**. *Glycomyces halotolerans* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a hypersaline habitat in Xinjiang, China. *Antonie van Leeuwenhoek*, 100(1), 137-143.
 - Gunde-Cimerman, N., Plemenitaš, A., Oren, A. **2018**. Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. *FEMS Microbiology Reviews*, 42(3), 353-375.
 - Gupta, R. S., Naushad, S., Baker, S. **2015**. Phylogenomic analyses and molecular signatures for the class Halobacteria and its two major clades: a proposal for division of the class *Halobacteria* into an emended order *Halobacteriales* and two new orders, *Haloferacales* ord. nov. and *Natrialbales* ord. nov., containing the novel families *Haloferacaceae* fam. nov. and *Natrialbaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(3), 1050-1069.
 - Gupta, V. V., Germida, J. J. **2015**. Soil aggregation: Influence on microbial biomass and implications for biological processes. *Soil Biology and Biochemistry*, 80, A3-A9.
 - Gyaneshwar, P., Kumar, G. N., Parekh, L. J., Poole, P. S. **2002**. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil*, 245(1), 83-93.
 - Hacène, H., Rafa, F., Chebhouni, N., Boutaiba, S., Bhatnagar, T., Baratti, J. C., Ollivier, B. **2004**. Biodiversity of prokaryotic microflora in El Golea salt lake, Algerian Sahara. *Journal of Arid Environments*, 58(3), 273-284.
 - Hallberg, K. B., Johnson, D. B. **2005**. Microbiology of a wetland ecosystem constructed to remediate mine drainage from a heavy metal mine. *Science of the Total Environment*, 338(1-2), 53-66.
 - Hamdi-Aissa, B., Vallès, V., Aventurier, A., Ribolzi, O. **2004**. Soils and brine geochemistry and mineralogy of hyperarid desert playa, Ouargla Basin, Algerian Sahara. *Arid Land Research and Management*, 18(2), 103-126.
 - Hamedi, J., Mohammadipanah, F., Panahi H.K.S. **2015**. Biotechnological Exploitation of Actinobacterial Members. In: Maheshwari, D. K., Saraf, M. (eds.). *Halophiles*. Switzerland: Springer International Publishing.
 - Hamedi, J., Mohammadipanah, F., Pötter, G., Spröer, C., Schumann, P., Göker, M., Klenk, H. P. **2011**. *Nocardopsis arvandica* sp. nov., isolated from sandy soil. *International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(5), 1189-1194.
 - Hamedi, J., Mohammadipanah, F., Ventosa, A. **2013**. Systematic and biotechnological aspects of halophilic and halotolerant actinomycetes. *Extremophiles*, 17(1), 1-13.
 - Hampp, N. A. **2000**. Bacteriorhodopsin: mutating a biomaterial into an optoelectronic material. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(6), 633-639.
 - Hansson, L. A., Brönmark, C., Anders Nilsson, P., Åbjörnsson, K. **2005**. Conflicting demands on wetland ecosystem services: nutrient retention, biodiversity or both? *Freshwater Biology*, 50(4), 705-714.
 - Hayakawa, M., Nonomura, H. **1984**. HV agar, a new selective medium for isolation of soil actinomycetes. In *Papers Presented at the Annual Meeting of the Actinomycetologists, Osaka, Japan* (Vol. 6).
 - Hentzer, M., Wu, H., Andersen, J. B., Riedel, K., Rasmussen, T. B., Bagge, N et al. **2003**. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *The EMBO journal*, 22(15), 3803-3815.

- Hozzein W.N. **2015**. Biodiversity of Halophilic and Halotolerant Actinobacteria. In: Maheshwari, D. K., Saraf, M. (eds.). *Halophiles*. Switzerland: Springer International Publishing.
- Huang, X. F., Chaparro, J. M., Reardon, K. F., Zhang, R., Shen, Q., Vivanco, J. M. **2014**. Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities. *Botany*, 92(4), 267-275.
- Huang, Z. Z., Wang, P., Li, H., Lin, K. F., Lu, Z. Y., Guo, X. J. **2014**. Community analysis and metabolic pathway of halophilic bacteria for phenol degradation in saline environment. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 94, 115-120.
- Huss, V. A., Festl, H., Schleifer, K. H. **1983**. Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. *Systematic and Applied Microbiology*, 4(2), 184-192.
- Huttenhower, C., Gevers, D., Knight, R., Abubucker, S., Badger, J. H., Chinwalla, A.T et al. **2012**. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486(7402), 207-214.
- Huybens, N., Mainil, J., Marlier, D. **2009**. Les techniques de biologie moléculaire d'analyse des populations bactériennes complexes. In *Annales de Médecine Vétérinaire* (Vol. 153, No. 2, pp. 112-128). Université de Liège.
- ISO, N. 1039. **2005**. Soil quality, determination of pH. *International Organization for Standardization, Geneve, Switzerland*.
- ISO, N. 11265. **1994**. Soil quality, determination of the specific electrical conductivity. *International Organization for Standardization, Geneve, Switzerland*.
- Ives, A. R., Carpenter, S. R. **2007**. Stability and diversity of ecosystems. *Science*, 317(5834), 58-62.
- Iyer, A., Mody, K., Jha, B. **2006**. Emulsifying properties of a marine bacterial exopolysaccharide. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(1-2), 220-222.
- Janssen, P. H. **2006**. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 1719-1728.
- Jayasinghe, B. D., Parkinson, D. **2008**. Actinomycetes as antagonists of litter decomposer fungi. *Applied soil Ecology*, 38(2), 109-118.
- Jeffries, C. D., Holtman, D. F., Guse, D. G. **1957**. Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acids. *Journal of Bacteriology*, 73(4), 590.
- Jiang, Y., Li, Q., Chen, X., Jiang, C. **2016**. Isolation and cultivation methods of Actinobacteria. *Actinobacteria—Basics and Biotechnological Applications*, 39-57.
- Joo, W. A., Kim, C. W. **2005**. Proteomics of halophilic archaea. *Journal of Chromatography B*, 815(1-2), 237-250.
- Jose, P. A., Jebakumar, S. R. D. **2012**. Phylogenetic diversity of actinomycetes cultured from coastal multipond solar saltern in Tuticorin, India. *Aquatic biosystems*, 8(1), 23.
- Jose, P.A., Jebakumar, S. R. **2013**. Phylogenetic appraisal of antagonistic, slow growing actinomycetes isolated from hypersaline inland solar salterns at Sambhar salt Lake, India. *Frontiers in Microbiology*, 4, 190.
- Kakhki, A. M., Amoozegar, M. A., Khaledi, E. M. **2011**. Diversity of hydrolytic enzymes in haloarchaeal strains isolated from salt lake. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 8(4), 705-714.
- Karbalaie-Heidari, H. R., Amoozegar, M. A., Hajighasemi, M., Ziaee, A. A., Ventosa, A. **2009**. Production, optimization and purification of a novel extracellular protease from the moderately halophilic bacterium *Halobacillus karajensis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(1), 21-27.
- Kay, B. D. **2018**. Soil structure and organic carbon: a review. In *Soil processes and the carbon cycle* (pp. 169-197). CRC Press.
- Kharroub, K. **2007**. Identification et étude moléculaire des bactéries et des archéobactéries aérobies halophiles de la sebkha Ezzemoul (Ain M'Lila). Thèse de Doctorat, Université Mentouri – Constantine, Algérie.
- Kharroub, K., Gomri, M. A., Aguilera, M., Monteoliva-Sanchez, M. **2014**. Diversity of hydrolytic enzymes in haloarchaea isolated from Algerian sabkhas. *African Journal of Microbiology Research*, 8(52), 3992-4001.
- Khresat, S. A., Rawajfeh, Z., Mohammad, M. **1998**. Land degradation in north-western Jordan: causes and processes. *Journal of Arid Environments*, 39(4), 623-629.
- Kim, M. S., Roh, S. W., Bae, J. W. **2010**. *Halomonas jeotgali* sp. nov., a new moderate halophilic bacterium isolated from a traditional fermented seafood. *The Journal of Microbiology*, 48(3), 404-410.
- Kim, O. S., Cho, Y. J., Lee, K., Yoon, S. H., Kim, M., Na, H et al. **2012**. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(3), 716-721.
- Kirk, J. L., Beaudette, L. A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J. N., Lee, H., Trevors, J. T. **2004**. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 58(2), 169-188.
- Kitouni, M. **2007**. Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes, identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse de Doctorat, Université Mentouri-Constantine. Algérie

- Köberl, M., Schmidt, R., Ramadan, E. M., Bauer, R., Berg, G. **2013**. The microbiome of medicinal plants: diversity and importance for plant growth, quality and health. *Frontiers in Microbiology*, 4, 400.
- Krishnakumar, S., Rajan, R. A., Ravikumar, S. **2011**. Extracellular production of L-Glutaminase by marine alkalophilic *Streptomyces* sp.-SBU1 isolated from Cape Comorin coast. *Indian Journal of Geomarine Sciences*, 40(5), 717-721.
- Kumar, L., Awasthi, G., Singh, B. **2011**. Extremophiles: a novel source of industrially important enzymes. *Biotechnology*, 10(2), 121-135.
- Kumar, S., Karan, R., Kapoor, S., Singh, S. P., Khare, S. K. **2012**. Screening and isolation of halophilic bacteria producing industrially important enzymes. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4), 1595-1603
- Kumar, V., Saxena, J., Tiwari, S. K. **2016**. Description of a halocin-producing *Haloferax larsenii* HA1 isolated from Pachpadra salt lake in Rajasthan. *Archives of Microbiology*, 198(2), 181-192.
- Lage, O. M., Bondoso, J. **2011**. Planctomycetes diversity associated with macroalgae. *FEMS Microbiology Ecology*, 78(2), 366-375.
- Lam KS **2006**. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Current Opinion Microbiology* 9(3):245–251
- Lanyi, J. K. **2004**. Bacteriorhodopsin. *Annual Review of Physiology*, 66, 665-688.
- Latorre, J. D., Hernandez-Velasco, X., Wolfenden, R. E., Vicente, J. L., Wolfenden, A. D., Menconi, A et al. **2016**. Evaluation and selection of *Bacillus* species based on enzyme production, antimicrobial activity, and biofilm synthesis as direct-fed microbial candidates for poultry. *Frontiers in Veterinary Science*, 3, 95.
- Lee, J. H., Kim, Y. S., Choi, T. J., Lee, W. J., Kim, Y. T. **2004**. *Paracoccus haeundaensis* sp. nov., a Gram-negative, halophilic, astaxanthin-producing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(5), 1699-1702.
- Lee, S. H., Jang, I., Chae, N., Choi, T., Kang, H. **2013**. Organic layer serves as a hotspot of microbial activity and abundance in Arctic tundra soils. *Microbial Ecology*, 65(2), 405-414.
- Lehmann, J., Kleber, M. **2015**. The contentious nature of soil organic matter. *Nature*, 528(7580), 60.
- Lentzen, G., Schwarz, T. **2006**. Extremolytes: natural compounds from extremophiles for versatile applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(4), 623-634.
- Li, F. M., Song, Q. H., Jjemba, P. K., Shi, Y. C. **2004**. Dynamics of soil microbial biomass C and soil fertility in cropland mulched with plastic film in a semiarid agro-ecosystem. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(11), 1893-1902.
- Li, W. J., Kroppenstedt, R. M., Wang, D., Tang, S. K., Lee, J. C., Park, D. J et al. **2006**. Five novel species of the genus *Nocardiopsis* isolated from hypersaline soils and emended description of *Nocardiopsis salina* Li et al. 2004. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(5), 1089-1096.
- Li, Y. Y., Shao, M. A. **2006**. Change of soil physical properties under long-term natural vegetation restoration in the Loess Plateau of China. *Journal of Arid Environments*, 64(1), 77-96.
- Li, Y., Wang, S., Jiang, L., Zhang, L., Cui, S., Meng, F et al. **2016**. Changes of soil microbial community under different degraded gradients of alpine meadow. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 222, 213-222.
- Lind, E., Ursing, J. **1986**. Clinical strains of *Enterobacter agglomerans* (synonyms: *Erwinia herbicola*, *Erwinia milletiae*) identified by DNA-DNA-hybridization. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Series B: Microbiology*, 94(1-6), 205-213.
- Litchfield, C. D. **2011**. Potential for industrial products from the halophilic Archaea. *Journal of industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(10), 1635-1647.
- Litchfield, C. D., Gillevet, P. M. **2002**. Microbial diversity and complexity in hypersaline environments: a preliminary assessment. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28(1), 48-55.
- Liu, B. B., Zhao, W. Y., Chu, X., Hozzein, W. N., Prabhu, D. M., Wadaan, M. A et al. **2014**. *Haladaptatus pallidirubidus* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from saline soil samples in Yunnan and Xinjiang, China. *Antonie van Leeuwenhoek*, 106(5), 901-910.
- Lizama, C., Monteoliva-Sánchez, M., Prado, B., Ramos-Cormenzana, A., Weckesser, J., Campos, V. **2001**. Taxonomic study of extreme halophilic archaea isolated from the “Salar de Atacama”, Chile. *Systematic and Applied Microbiology*, 24(3), 464-474.
- Lloyd, M., Ghelardi, R. J. **1964**. A table for calculating the 'equitability' component of species diversity. *The Journal of Animal Ecology*, 33(2), 217-225.
- Logan, N. A., Berge, O., Bishop, A. H., Busse, H. J., De Vos, P., Fritze, D et al. **2009**. Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(8), 2114-2121.
- LPSN. **2019**. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. <http://www.bacterio.net/>
- Lydell, C., Dowell, L., Sikaroodi, M., Gillevet, P., Emerson, D. **2004**. A population survey of members of the phylum Bacteroidetes isolated from salt marsh

- sediments along the East Coast of the United States. *Microbial Ecology*, 48(2), 263-273.
- Ma, B., Gong, J. **2013**. A meta-analysis of the publicly available bacterial and archaeal sequence diversity in saline soils. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(12), 2325-2334.
 - Madern, D., Ebel, C., Zaccai, G. **2000**. Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles*, 4(2), 91-98.
 - Magarvey, N. A., Keller, J. M., Bernan, V., Dworkin, M., Sherman, D. H. **2004**. Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12), 7520-7529.
 - Magurran, A.E. **2004**. Ecological diversity and its measurement. Princeton: Princeton University Press.
 - Maldonado, L. A., Stach, J. E., Pathom-aree, W., Ward, A. C., Bull, A. T., Goodfellow, M. **2005**. Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 87(1), 11-18.
 - Malviya, N., Yandigeri, M. S., Yadav, A. K., Solanki, M. K., Arora, D. K. **2014**. Isolation and characterization of novel alkali-halophilic actinomycetes from the Chilika brackish water lake, India. *Annals of Microbiology*, 64(4), 1829-1838.
 - Manikandan, M., Pašić, L., Kannan, V. **2009**. Purification and biological characterization of a halophilic thermostable protease from *Haloferax lucentensis* VKMM 007. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(12), 2247-2256.
 - Margesin, R., Plaza, G. A., Kasenbacher, S. **2011**. Characterization of bacterial communities at heavy-metal-contaminated sites. *Chemosphere*, 82(11), 1583-1588.
 - Margesin, R., Schinner, F. **2001**. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, 5(2), 73-83.
 - Marlet, S., Job, J. O. **2006**. Processus et gestion de la salinité des sols. In: *Traité d'irrigation*. Tiercelin Jean-Robert (ed.), Vidal Alain (ed.). Paris: Lavoisier Tec & Doc, 797-822. ISBN 978-2-7430-0910-6
 - Marmur, J. **1961**. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *Journal of Molecular Biology*, 3(2), 208-IN1.
 - Marmur, J., Doty, P. **1962**. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *Journal of Molecular Biology*, 5(1), 109-118.
 - Martínez-Gutiérrez, C. A., Latisnere-Barragán, H., García-Maldonado, J. Q., López-Cortés, A. **2018**. Screening of polyhydroxyalkanoate-producing bacteria and PhaC-encoding genes in two hypersaline microbial mats from Guerrero Negro, Baja California Sur, Mexico. *PeerJ*, 6, e4780.
 - Martins, M. B., Carvalho, I. **2007**. Diketopiperazines: biological activity and synthesis. *Tetrahedron*, 63(40), 9923-9932.
 - Mata, J. A., Béjar, V., Llamas, I., Arias, S., Bressollier, P., Tallon, R et al. **2006**. Exopolysaccharides produced by the recently described halophilic bacteria *Halomonas ventosae* and *Halomonas anticariensis*. *Research in Microbiology*, 157(9), 827-835.
 - Mathieu, C., Pielain, F., Jeanroy, E. **2003**. Analyse chimique des sols: Méthodes choisies. Tec & Doc, 480p.
 - McDuff, S., King, G. M., Neupane, S., Myers, M. R. **2016**. Isolation and characterization of extremely halophilic CO-oxidizing Euryarchaeota from hypersaline cinders, sediments and soils and description of a novel CO oxidizer, *Haloferax namakaokahaiae* Mke2. 3T, sp. nov. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(4).
 - McGenity, T. J., Grant, W. D. **2015**. *Halorubrum*. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, 1-11.
 - Meier-Kolthoff, J. P., Göker, M., Spröer, C., Klenk, H. P. **2013**. When should a DDH experiment be mandatory in microbial taxonomy? *Archives of Microbiology*, 195(6), 413-418.
 - Meklat, A., Sabaou, N., Zitouni, A., Mathieu, F., Lebrihi, A. **2011**. Isolation, taxonomy, and antagonistic properties of halophilic actinomycetes in Saharan soils of Algeria. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(18), 6710-6714.
 - Mellado, E., Sánchez-Porro, C., Martín, S., Ventosa, A. 2004. Extracellular hydrolytic enzymes produced by moderately halophilic bacteria. In *Halophilic microorganisms* (pp. 285-295). Springer, Berlin, Heidelberg.
 - Menasria, T., Aguilera, M., Hacène, H., Benammar, L., Ayachi, A., SiBachir, A et al. **2018**. Diversity and bioprospecting of extremely halophilic archaea isolated from Algerian arid and semi-arid wetland ecosystems for halophilic-active hydrolytic enzymes. *Microbiological Research*, 207, 289-298.
 - Mendes, R., Garbeva, P., Raaijmakers, J. M. **2013**. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 634-663.
 - Mendes, R., Kruijt, M., De Bruijn, I., Dekkers, E., van der Voort, M., Schneider, J. H et al. **2011**. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science*, 332(6033), 1097-1100.
 - Metzker, M. L. **2010**. Sequencing technologies—the next generation. *Nature Reviews Genetics*, 11(1), 31.

- Mijts, B. N., Patel, B. K. **2002**. Cloning, sequencing and expression of an α -amylase gene, amyA, from the thermophilic halophile *Halothermothrix orenii* and purification and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Microbiology*, 148(8), 2343-2349.
- Minegishi, H., Echigo, A., Shimane, Y., Kamekura, M., Itoh, T., Ohkuma, M., Usami, R. **2015**. *Halococcus agarilyticus* sp. nov., an agar-degrading haloarchaeon isolated from commercial salt. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(5), 1634-1639.
- Minegishi, H., Kamekura, M., Itoh, T., Echigo, A., Usami, R., Hashimoto, T. **2010**. Further refinement of the phylogeny of the *Halobacteriaceae* based on the full-length RNA polymerase subunit B' (rpoB') gene. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(10), 2398-2408.
- Mohamad, O. A. A., Li, L., Ma, J. B., Hatab, S., Rasulov, B. A., Musa, Z et al. **2018**. Halophilic Actinobacteria Biological Activity and Potential Applications. In *Extremophiles in Eurasian Ecosystems: Ecology, Diversity, and Applications* (pp. 333-364). Springer, Singapore.
- Mohamad, R., Maynaud, G., Le Quéré, A., Vidal, C., Klonowska, A., Yashiro, E et al. **2017**. Ancient heavy metal contamination in soils as a driver of tolerant Anthyllis vulneraria rhizobial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(2), e01735-16.
- Mohamed, N. M., Saito, K., Tal, Y., Hill, R. T. **2010**. Diversity of aerobic and anaerobic ammonia-oxidizing bacteria in marine sponges. *The ISME journal*, 4(1), 38-48.
- Montalvo-Rodriguez, R. A. F. A. E. L., Vreeland, R H., Oren, A., Kessel, M., Betancourt, C., Lopez-Garriga, J. U. A. N. **1998**. *Halogeometricum borinquense* gen. nov., sp. nov., a novel halophilic archaeon from Puerto Rico. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48(4), 1305-1312.
- Mu, J., Li, X., Jiao, J., Ji, G., Wu, J., Hu, F., Li, H. **2017**. Biocontrol potential of vermicompost through antifungal volatiles produced by indigenous bacteria. *Biological Control*, 112, 49-54.
- Müller, V., Oren, A. **2003**. Metabolism of chloride in halophilic prokaryotes. *Extremophiles*, 7(4), 261-266.
- Murray R. G. E., Doetsch R. N., Robinow C. F. **1994**. Determinative and cytological light microscopy. In Gerhardt P., Murray R. G. E., Wood W. A., Krieg N. R. (eds) *Methods for General and Molecular Bacteriology*, pp. 21—41. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Nacke, H., Daniel, R. **2015**. Approaches in metagenome research: progress and challenges. In Karen E. Nelson (eds.), *Encyclopedia of Metagenomics: Genes, Genomes and Metagenomes: Basics, Methods, Databases and Tools*, 38-43. doi.org/10.1007/978-1-4614-6418-1_790-3
- Naghoni, A., Emtiazi, G., Amoozegar, M. A., Cretoiu, M. S., Stal, L. J., Etemadifar et al. **2017**. Microbial diversity in the hypersaline Lake Meyghan, Iran. *Scientific Reports*, 7(1), 11522.
- Nakagawa, S., Takai, K., Inagaki, F., Hirayama, H., Nunoura, T., Horikoshi, K., Sako, Y. **2005**. Distribution, phylogenetic diversity and physiological characteristics of epsilon-Proteobacteria in a deep-sea hydrothermal field. *Environmental Microbiology*, 7(10), 1619-1632.
- Namwong, S., Tanasupawat, S., Visessanguan, W., Kudo, T., Itoh, T. **2007**. *Halococcus thailandensis* sp. nov., from fish sauce in Thailand. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(10), 2199-2203.
- Narasingarao, P., Podell, S., Ugalde, J. A., Brochier-Armanet, C., Emerson, J. B., Brocks, J. J et al. **2012**. De novo metagenomic assembly reveals abundant novel major lineage of Archaea in hypersaline microbial communities. *The ISME journal*, 6(1), 81.
- Narayan, A., Jain, K., Shah, A. R., Madamwar, D. **2016**. An efficient and cost-effective method for DNA extraction from athalassohaline soil using a newly formulated cell extraction buffer. *3 Biotech*, 6(1), 62.
- Navarro-Noya, Y. E., Valenzuela-Encinas, C., Sandoval-Yuriar, A., Jiménez-Bueno, N. G., Marsch, R., Dendooven, L. **2015**. Archaeal communities in a heterogeneous hypersaline-alkaline soil. *Archaea*, 2015. ID 646820. doi.org/10.1155/2015/646820
- Neffar, S., Chenchouni, H., Beddiar, A., Redjel, N. **2013**. Rehabilitation of Degraded Rangeland in Drylands by Prickly Pear (*Opuntia ficus-indica* L.) Plantations: Effect on Soil and Spontaneous Vegetation. *Ecologia Balkanica*, 5(2).
- Nett, M., Ikeda, H., Moore, B. S. **2009**. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Natural Product Reports*, 26(11), 1362-1384.
- Nieto, J. J., Fernandez-Castillo, R., Marquez, M. C., Ventosa, A., Quesada, E., Ruiz-Berraquero, F. **1989**. Survey of metal tolerance in moderately halophilic eubacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 55 (9), 2385-2390.
- Ningthoujam, D. S., Kshetri, P., Sanasam, S., Nimaichand, S. **2009**. Screening, identification of best producers and optimization of extracellular proteases from moderately halophilic alkalithermotolerant indigenous actinomycetes. *World and Applied Science Journal*, 7(7), 907-916.
- Nocker, A., Burr, M., Camper, A. K. **2007**. Genotypic microbial community profiling: a critical technical review. *Microbial Ecology*, 54(2), 276-289.

- Nwodo, U., Green, E., Okoh, A. **2012**. Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(11), 14002-14015.
- Öberg, G. **2002**. The natural chlorine cycle—fitting the scattered pieces. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(5), 565-581.
- Oesterhelt, D., Bräuchle, C., Hampp, N. **1991**. Bacteriorhodopsin: a biological material for information processing. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 24(4), 425-478.
- Onodera, M., Yatsunami, R., Tsukimura, W., Fukui, T., Nakasone, K., Takashina, T., akamura, S. **2013**. Gene analysis, expression, and characterization of an intracellular α -amylase from the extremely halophilic archaeon *Haloarcula japonica*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 77(2), 281-288.
- Oren, A. **1983**. *Halobacterium sodomense* sp. nov., a Dead Sea *Halobacterium* with an extremely high magnesium requirement. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 33(2), 381-386.
- Oren, A. **2002**. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28(1), 56-63.
- Oren, A. **2004**. Halophilic microorganisms: Physiology and phylogeny. In *Origins* Springer, Dordrecht (pp. 413-426).
- Oren, A. **2006a**. Halophilic microorganisms and their environments (Vol. 5). Springer Science and Business Media. 575p.
- Oren, A. **2006b**. The order halobacteriales. *The Prokaryotes: Volume 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*, 113-164.
- Oren, A. **2007**. Biodiversity in highly saline environments. In: Gerday, C., Glansdorff, N. (eds). *Physiology and biochemistry of extremophiles*. ASM Press, Washington, DC, pp 223–231.
- Oren, A. **2008**. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline systems*, 4(2), doi: 10.1186/1746-1448-4-2
- Oren, A. **2011**. Diversity of halophiles. *Extremophiles handbook*, 309-325.
- Oren, A. **2013**. *Salinibacter*: an extremely halophilic bacterium with archaeal properties. *FEMS Microbiology Letters*, 342(1), 1-9.
- Oren, A. **2014**. Taxonomy of halophilic Archaea: current status and future challenges. *Extremophiles*, 18(5), 825-834.
- Oren, A. **2014b**. The family halobacteriaceae. *The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea*, 41-121.
- Oren, A. **2015**. Cyanobacteria in hypersaline environments: biodiversity and physiological properties. *Biodiversity and Conservation*, 24(4), 781-798.
- Oren, A., Heldal, M., Norland, S. **1997a**. X-ray microanalysis of intracellular ions in the anaerobic halophilic eubacterium *Haloanaerobium praevalens*. *Canadian Journal of Microbiology*, 43(6), 588-592.
- Oren, A., Ventosa, A., Grant, W. D. **1997b**. Proposed minimal standards for description of new taxa in the order *Halobacteriales*. *International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(1), 233-238.
- Osborn, A. M., Moore, E. R., Timmis, K. N. **2000**. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology*, 2(1), 39-50.
- Øvreås, L. **2000**. Population and community level approaches for analysing microbial diversity in natural environments. *Ecology Letters*, 3(3), 236-251.
- Owen, R. J., Hill, L. R. **1979**. The estimation of base compositions, base pairing and genome size of bacterial deoxyribonucleic acids. *Identification Methods for Microbiologists*, 277, 296.
- Oxley, A. P., Lanfranconi, M. P., Würdemann, D., Ott, S., Schreiber, S., McGenity, T. J et al. **2010**. Halophilic archaea in the human intestinal mucosa. *Environmental Microbiology*, 12(9), 2398-2410.
- Ozcan, B., Ozyilmaz, G., Cihan, A., Cokmus, C., Caliskan, M. **2012**. Phylogenetic analysis and characterization of lipolytic activity of halophilic archaeal isolates. *Microbiology*, 81(2), 186-194
- Page, S.E. **2010**. Diversity and complexity (Vol. 2). Princeton University Press.
- Paggi, R. A., Martone, C. B., Fuqua, C., De Castro, R. E. **2003**. Detection of quorum sensing signals in the haloalkaliphilic archaeon *Natronococcus occultus*. *FEMS Microbiology Letters*, 221(1), 49-52.
- Pandit, A. S., Joshi, M. N., Bhargava, P., Shaikh, I., Ayachit, G. N., Raj, S. R et al. **2015**. A snapshot of microbial communities from the Kutch: one of the largest salt deserts in the World. *Extremophiles*, 19(5), 973-987.
- Pathom-Aree, W., Stach, J. E., Ward, A. C., Horikoshi, K., Bull, A. T., Goodfellow, M. **2006**. Diversity of actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench. *Extremophiles*, 10(3), 181-189.
- Paul, D., Kumar, S., Mishra, M., Parab, S., Banskar, S., Shouche, Y. S. **2018**. Molecular Genomic Techniques for Identification of Soil Microbial Community Structure and Dynamics. In *Advances in Soil*

- Microbiology: Recent Trends and Future Prospects* (pp. 9-33). Springer, Singapore.
- Paul, D., Pandey, G., Pandey, J., Jain, R. K. **2005**. Accessing microbial diversity for bioremediation and environmental restoration. *Trends in Biotechnology*, 23(3), 135-142.
 - Paul, S., Bag, S. K., Das, S., Harvill, E. T., Dutta, C. **2008**. Molecular signature of hypersaline adaptation: insights from genome and proteome composition of halophilic prokaryotes. *Genome Biology*, 9(4), R70.
 - Perez, D., Kovačić, F., Wilhelm, S., Jaeger, K. E., García, M. T., Ventosa, A., Mellado, E. (2012). Identification of amino acids involved in the hydrolytic activity of lipase LipBL from *Marinobacter lipolyticus*. *Microbiology*, 158(8), 2192-2203.
 - Pérez-Davó, A., Aguilera, M., González-Paredes, A., Jiménez-Pranteda, M. L., Monteoliva-Sánchez, M. **2015**. *Halobellus ramosii* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a saline-wetland wildfowl reserve. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(11), 3847-3852.
 - Pérez-Pomares, F., Bautista, V., Ferrer, J., Pire, C., Marhuenda-Egea, F. C., Bonete, M. J. **2003**. α -Amylase activity from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*. *Extremophiles*, 7(4), 299-306.
 - Petrosino, J. F., Highlander, S., Luna, R. A., Gibbs, R. A., Versalovic, J. **2009**. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clinical Chemistry*, 55(5), 856-866.
 - Pham, V. H., Kim, J. **2012**. Cultivation of unculturable soil bacteria. *Trends in biotechnology*, 30(9), 475-484.
 - Pitman, M. G., Läuchli, A. **2002**. Global impact of salinity and agricultural ecosystems. In *Salinity: environment-plants-molecules* (pp. 3-20). Springer, Dordrecht.
 - Poli, A., Di Donato, P., Abbamondi, G. R., Nicolaus, B. **2011**. Synthesis, production, and biotechnological applications of exopolysaccharides and polyhydroxyalkanoates by archaea. *Archaea*, 2011.
 - Popescu, G., Dumitru, L. **2009**. Biosorption of some heavy metals from media with high salt concentrations by halophilic archaea. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 23(sup1), 791-795.
 - Prakash, B., Vidyasagar, M., Jayalakshmi, S. K., Sreeramulu, K. **2012**. Purification and some properties of low-molecular-weight extreme halophilic xylanase from *Chromohalobacter* sp. TPSV 101. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 74(3-4), 192-198.
 - Pries, F., Van der Ploeg, J. R., Dolfing, J., Janssen, D. B. **1994**. Degradation of halogenated aliphatic compounds: the role of adaptation. *FEMS Microbiology Reviews*, 15(2-3), 279-295.
 - Prosser, J. I., Nicol, G. W. **2012**. Archaeal and bacterial ammonia-oxidisers in soil: the quest for niche specialisation and differentiation. *Trends in Microbiology*, 20(11), 523-531.
 - Quadri, I., Hassani, I. I., l'Haridon, S., Chalopin, M., Hacène, H., Jebbar, M. **2016**. Characterization and antimicrobial potential of extremely halophilic archaea isolated from hypersaline environments of the Algerian Sahara. *Microbiological Research*, 186, 119-131.
 - Quesada, E., Béjar, V., Ferrer, M. R., Calvo, C., Llamas, I., Martínez-Checa, F et al. **2004**. Moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacteria. In *Halophilic microorganisms* (pp. 297-314). Springer, Berlin, Heidelberg.
 - Quillaguamán, J., Guzmán, H., Van-Thuoc, D., Hatti-Kaul, R. **2010**. Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(6), 1687-1696.
 - R Core Team. **2015**. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria.
 - Raad, I., Hanna, H., Jiang, Y., Dvorak, T., Reitzel, R., Chaiban, G et al. 2007. Comparative activities of daptomycin, linezolid, and tigecycline against catheter-related methicillin-resistant *Staphylococcus* bacteremic isolates embedded in biofilm. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(5), 1656-1660.
 - Rabot, E., Wiesmeier, M., Schlüter, S., Vogel, H. J. **2018**. Soil structure as an indicator of soil functions: a review. *Geoderma*, 314, 122-137.
 - Raddadi, N., Cherif, A., Daffonchio, D., Neifar, M., Fava, F. **2015**. Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(19), 7907-7913.
 - Ramade, F. **2008**. Dictionnaire encyclopédique des sciences de la nature et de la biodiversité. Paris, Dunod, 737 p.
 - Ramette, A. **2007**. Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 62(2), 142-160.
 - Ranjard, L., Poly, F., Nazaret, S. **2000**. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Research in Microbiology*, 151(3), 167-177.
 - Raval, V. H., Purohit, M. K., Singh, S. P. **2013**. Diversity, population dynamics and biocatalytic potential of cultivable and non-cultivable bacterial communities of the saline ecosystems. In *Marine Enzymes for Biocatalysis* (pp. 165-189). Woodhead Publishing.
 - Ren, W., Zhang, F., Yang, X., Tang, S., Ming, H., Zhou, E et al. **2013**. Purification and properties of a SDS-

- resistant xylanase from halophilic *Streptomonospora* sp. YIM 90494. *Cellulose*, 20(4), 1947-1955.
- Rengasamy, P. **2006**. World salinization with emphasis on Australia. *Journal of Experimental Botany*, 57(5), 1017-1023.
 - Rengasamy, P. **2010**. Soil processes affecting crop production in salt-affected soils. *Functional Plant Biology*, 37(7), 613-620.
 - Riesenfeld, C. S., Schloss, P. D., Handelsman, J. **2004**. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annual Review Genetics*, 38, 525-552.
 - Roberts, M.F. **2005**. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems*, 1(1), 5.
 - Roberts, W. K., Selitrennikoff, C. P. **1988**. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *Microbiology*, 134(1), 169-176.
 - Rodier, J. **1996**. L'analyse de l'eau naturelle, eaux résiduaires, eau de mer. *Denod, Paris, 1*, 1383.
 - Rodrigo-Baños, M., Garbayo, I., Vílchez, C., Bonete, M., Martínez-Espinosa, R. **2015**. Carotenoids from *Haloarchaea* and their potential in biotechnology. *Marine drugs*, 13(9), 5508-5532.
 - Rodriguez-Valera, F., Juez, G., Kushner, D. J. **1983**. *Halobacterium mediterranei* spec. nov., a new carbohydrate-utilizing extreme halophile. *Systematic and Applied Microbiology*, 4(3), 369-381.
 - Rohban, R., Amoozegar, M. A., Ventosa, A. **2009**. Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(3), 333-340.
 - Romanescu, G., Stoleriu, C. C., Enea, A. **2013**. Definition of Lakes and Their Position in the Romanian Territory. In *Limnology of the Red Lake, Romania* (pp. 1-34). Springer, Dordrecht.
 - Rousk, J., Bååth, E., Brookes, P. C., Lauber, C. L., Lozupone, C., Caporaso, J.G et al. **2010**. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *The ISME Journal*, 4(10), 1340-1351.
 - Rowe, G., Sweet, M., Beebee, T. **2017**. An introduction to molecular ecology. Oxford University Press, 400p.
 - Sabaou, N., Boudjella, H., Bennadji, A., Mostefaoui, A., Zitouni, A., Lamari L et al. **1998**. Les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes, rares producteurs d'antibiotiques. *Science et changements planétaires/ Sécheresse*, 9(2), 147-153.
 - Sadfi-Zouaoui, N., Essghaier, B., Hajlaoui, M. R., Fardeau, M. L., Cayaol, J. L., Ollivier, B., Boudabous, A. **2008**. Ability of moderately halophilic bacteria to control grey mould disease on tomato fruits. *Journal of Phytopathology*, 156(1), 42-52.
 - Saidi, A., Hammami, M., Daghari, H., Hatira, A., Ltifi, W., Hachani, K. **2010**. Bilans d'eau et des sels dans le périmètre irrigué de Kalâat Landalous (Tunisie). *Sécheresse*, 21(4), 323-324.
 - Saini, A., Aggarwal, N. K., Sharma, A., Yadav, A. **2015**. Actinomycetes: a source of lignocellulolytic enzymes. *Enzyme Research*, 279381. doi.org/10.1155/2015/279381
 - Saini, R. K., Keum, Y. S. **2017**. Progress in microbial carotenoids production. *Indian Journal of Microbiology*, 57(1), 129-130.
 - Saitou, N., Nei, M. **1987**. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406-425.
 - Saker, R., Meklat, A., Bouras, N., Zitouni, A., Mathieu, F., Spröer, C et al. **2015**. Diversity and antagonistic properties of culturable halophilic actinobacteria in soils of two arid regions of septentrional Sahara: M'zab and Zibans. *Annals of Microbiology*, 65(4), 2241-2253.
 - Samraoui, B., Samraoui, F. **2008**. An ornithological survey of Algerian wetlands: Important Bird Areas, Ramsar sites and threatened species. *Wildfowl*, 58:71-96.
 - Sanchez-Porro, C., Amoozegar, M. A., Fernandez, A. B., Ramezani, M., Ventosa, A. **2010**. *Lentibacillus persicus* sp. nov., a moderately halophilic species isolated from a saline lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(6), 1407-1412.
 - Sánchez-Porro, C., Martin, S., Mellado, E., Ventosa, A. **2003**. Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *Journal of Applied Microbiology*, 94(2), 295-300.
 - Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. **1977**. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463-5467.
 - Santorelli, M., Maurelli, L., Pocsfalvi, G., Fiume, I., Squillaci, G., La Cara, F et al. **2016**. Isolation and characterisation of a novel alpha-amylase from the extreme haloarchaeon *Haloterrigena turkmenica*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 174-184.
 - Santos, H., Da Costa, M. S. **2002**. Compatible solutes of organisms that live in hot saline environments. *Environmental Microbiology*, 4(9), 501-509.
 - Savage, K. N., Krumholz, L. R., Oren, A., Elshahed, M. S. **2007**. *Haladaptatus paucihalophilus* gen. nov., sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a low-salt, sulfide-rich spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(1), 19-24.
 - Saxena, R. K., Dutt, K., Agarwal, L., Nayyar, P. **2007**. A highly thermostable and alkaline amylase from a

- Bacillus* sp. PN5. *Bioresource Technology*, 98(2), 260-265.
- Schimel, J., Balsler, T. C., Wallenstein, M. **2007**. Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. *Ecology*, 88(6), 1386-1394.
 - Schippers, A., Bosecker, K., Willscher, S., Spröer, C., Schumann, P., Kroppenstedt, R. M. **2002**. *Nocardiopsis metallica* sp. nov., a metal-leaching actinomycete isolated from an alkaline slag dump. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(6), 2291-2295.
 - Schloss, P. D., Handelsman, J. **2003**. Biotechnological prospects from metagenomics. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(3), 303-310.
 - Schneider, T., Riedel, K. **2010**. Environmental proteomics: analysis of structure and function of microbial communities. *Proteomics*, 10(4), 785-798.
 - Schnoor, M., Voß, P., Cullen, P., Böking, T., Galla, H. J., Galinski, E. A., Lorkowski, S. **2004**. Characterization of the synthetic compatible solute homoectoine as a potent PCR enhancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 322(3), 867-872.
 - Schreck, S. D., Grunden, A. M. **2014**. Biotechnological applications of halophilic lipases and thioesterases. *Applied Microbiology and biotechnology*, 98(3), 1011-1021.
 - Seckbach, J., Oren, A. **2007**. Oxygenic photosynthetic microorganisms in extreme environments. In *Algae and cyanobacteria in extreme environments* (pp. 3-25). Springer, Dordrecht.
 - Selinger, D. W., Saxena, R. M., Cheung, K. J., Church, G. M., Rosenow, C. **2003**. Global RNA half-life analysis in *Escherichia coli* reveals positional patterns of transcript degradation. *Genome research*, 13(2), 216-223.
 - Sfanos, K., Harmody, D., Dang, P., Ledger, A., Pomponi, S., McCarthy, P., Lopez, J. **2005**. A molecular systematic survey of cultured microbial associates of deep-water marine invertebrates. *Systematic and Applied Microbiology*, 28(3), 242-264.
 - Shand, R. F., Leyva, K. J. **2007**. Peptide and protein antibiotics from the domain Archaea: halocins and sulfolobocins. In *Bacteriocins* (pp. 93-109). Springer, Berlin, Heidelberg.
 - Shivanand, P., Mugeraya, G. **2011**. Halophilic bacteria and their compatible solutes—osmoregulation and potential applications. *Current Science*, 100(1), 1516-1521.
 - Sierra, G. **1957**. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek*, 23(1), 15-22.
 - Sierra, M., Martínez, F. J., Sierra, C., Aguilar, J. **2009**. Correlations between pedological parameters in relation to lithology and soil type in Almería (SE Spain). *Journal of arid Environments*, 73(4-5), 493-498.
 - Singh, P., Jain, K., Desai, C., Tiwari, O., Madamwar, D. **2019**. Microbial Community Dynamics of Extremophiles/Extreme Environment. In *Microbial Diversity in the Genomic Era* (pp. 323-332). Academic Press.
 - Singh, S. K., Singh, A. K., Sharma, B. K., Tarafdar, J. C. **2007**. Carbon stock and organic carbon dynamics in soils of Rajasthan, India. *Journal of Arid Environments*, 68(3), 408-421.
 - Singh, S. P., Bhatt, H. B., Raval, V. H. **2018**. Adaptation Strategies in Halophilic Bacteria. In *Extremophiles* (pp. 137-164). CRC Press.
 - Sivakumar, M. V. K. **2007**. Interactions between climate and desertification. *Agricultural and forest Meteorology*, 142(2-4), 143-155.
 - Slade, D., Radman, M. **2011**. Oxidative stress resistance in *Deinococcus radiodurans*. *Microbiol. Molecular Biology Review*, 75(1), 133-191.
 - Smibert, R. M., Krieg, N. R., Gerhardt, P., Murray, R., Wood, W. A. **1994**. Methods for general and molecular bacteriology. *American Society for Microbiology, Washington DC*.
 - Smibert, R.M., Krieg, N.R. **1981**. Systematics. General characterization. In: Manual of methods of general bacteriology (P. Gerhardt, R. G. E. Murray, R. N. Costilow, E. W. Nester, W.A. Wood, N.R.Krieg, G.B.Phillips, eds.), pp.409-443. Washington/DC 2006, American Society for Microbiology.
 - Soares, M. M., Silva, R. D., Gomes, E. **1999**. Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus* sp. *Revista de Microbiologia*, 30(4), 299-303.
 - Sorokin, D. Y., Khijniak, T. V., Elcheninov, A. G., Toshchakov, S. V., Kostrikina, N. A., Bale, N. J et al. **2019**. *Halococcoides cellulovorans* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic cellulose-utilizing haloarchaeon from hypersaline lakes. *International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69(5), 1327-1335.
 - Sorokin, D. Y., Kolganova, T. V. **2014**. Bacterial chitin utilization at halophilic conditions. *Extremophiles*, 18(2), 243-248.
 - Souza, R. C., Hungria, M., Cantão, M. E., Vasconcelos, A. T. R., Nogueira, M. A., Vicente, V. A. **2015**. Metagenomic analysis reveals microbial functional redundancies and specificities in a soil under different tillage and crop-management regimes. *Applied Soil Ecology*, 86, 106-112.
 - Squillaci, G., Parrella, R., Carbone, V., Minasi, P., La Cara, F., Morana, A. **2017**. Carotenoids from the

- extreme halophilic archaeon *Haloterrigena turkmenica*: Identification and antioxidant activity. *Extremophiles*, 21(5), 933-945.
- SSSD. (Soil Survey Division Staff), **1993**. Soil Survey Manual. USDA Handbk, n° 18 (Department of Agriculture). Printing Office, Washington (USA), 437p.
 - Stackebrandt, E., Goebel, B. M. **1994**. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44(4), 846-849.
 - Stieglmeier, M., Alves, R. J., Schleper, C. **2014**. The phylum thaumarchaeota. *The Prokaryotes: other major lineages of bacteria and the archaea*, 347-362.
 - Su, Y. Z., Lin Zhao, H. **2003**. Soil properties and plant species in an age sequence of Caragana microphylla plantations in the Horqin Sandy Land, north China. *Ecological Engineering*, 20(3), 223-235.
 - Subov, N. N. **1931**. Oceanographical tables USSR Ocean. In *International Symposium on Hydrometeorology*.
 - Subramani, R., Aalbersberg, W. **2012**. Marine actinomycetes: an ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiological Research*, 167(10), 571-580.
 - Subramani, R., Aalbersberg, W. **2013**. Culturable rare Actinomycetes: diversity, isolation and marine natural product discovery. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(21), 9291-9321.
 - Subramani, R., Sipkema, D. **2019**. Marine rare actinomycetes: A promising source of structurally diverse and unique novel natural products. *Marine drugs*, 17(5), 249.
 - Sundararaman, A., Srinivasan, S., Lee, J. H., Lee, S. S. **2018**. *Lentibacillus alimentarius* sp. nov., isolated from Myeolchi-jeotgal, a traditional Korean high-salt fermented anchovy. *Antonie van Leeuwenhoek*, 111(7), 1065-1071.
 - Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. **2013**. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729.
 - Tanasupawat, S., Pakdeeto, A., Namwong, S., Thawai, C., Kudo, T., Itoh, T. **2006**. *Lentibacillus halophilus* sp. nov., from fish sauce in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(8), 1859-1863.
 - Tang, S. K., Wang, Y., Guan, T. W., Lee, J. C., Kim, C. J., Li, W. J. **2010**. *Amycolatopsis halophila* sp. nov., a halophilic actinomycete isolated from a salt lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(5), 1073-1078.
 - Teather, R. M., Wood, P. J. **1982**. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(4), 777-780.
 - Tebbe, C. C., Dohrmann, A. B., Hemkemeyer, M., Näther, A. **2015**. Microbial community profiling: SSCP and T-RFLP techniques. In *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols* (pp. 101-126). Springer, Berlin, Heidelberg.
 - Ter Braak, C. J. **1986**. Canonical correspondence analysis: a new eigenvector technique for multivariate direct gradient analysis. *Ecology*, 67(5), 1167-1179.
 - Theodorakopoulos, N., Bachar, D., Christen, R., Alain, K., Chapon, V. **2013**. Exploration of *Deinococcus-Thermus* molecular diversity by novel group-specific PCR primers. *Microbiology Open*, 2(5), 862-872.
 - Theron, J., Cloete, T. E. **2000**. Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. *Critical Reviews in Microbiology*, 26(1), 37-57.
 - Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. **1994**. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673-4680.
 - Tindall, B. J., Rosselló-Móra, R., Busse, H. J., Ludwig, W., Kämpfer, P. **2010**. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(1), 249-266.
 - Tiwari, K., Gupta, R. K. **2013**. Diversity and isolation of rare actinomycetes: an overview. *Critical Reviews in Microbiology*, 39(3), 256-294.
 - Tommonaro, G., Abbamondi, G. R., Iodice, C., Tait, K., De Rosa, S. **2012**. Diketopiperazines produced by the halophilic archaeon, *Haloterrigena hispanica*, activate AHL bioreporters. *Microbial Ecology*, 63(3), 490-495.
 - Torsvik, V., Øvreås, L. **2002**. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5(3), 240-245.
 - Trujillo, M. E., Goodfellow, M. **2015**. *Actinopolyspora*. In: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-12.
 - Truu, M., Juhanson, J., Truu, J. **2009**. Microbial biomass, activity and community composition in constructed wetlands. *Science of the Total Environment*, 407(13), 3958-3971.
 - Urdiain, M., López-López, A., Gonzalo, C., Busse, H. J., Langer, S., Kämpfer, P., Rosselló-Móra, R. **2008**. Reclassification of *Rhodobium marinum* and *Rhodobium pfennigii* as *Afifella marina* gen. nov. comb. nov. and

- Afifella pfennigii* comb. nov., a new genus of photoheterotrophic *Alphaproteobacteria* and emended descriptions of *Rhodobium*, *Rhodobium orientis* and *Rhodobium gokarnense*. *Systematic and Applied Microbiology*, 31(5), 339-351.
- Van Hoorn, J. W. **1981**. Salt movement, leaching efficiency, and leaching requirement. *Agricultural Water Management*, 4(4), 409-428.
 - Vandamme, P., Peeters, C. **2014**. Time to revisit polyphasic taxonomy. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 106(1), 57-65.
 - Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., Swings, J. **1996**. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 60(2), 407-438.
 - Vandenkoornhuise, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A., Dufresne, A. **2015**. The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist*, 206(4), 1196-1206.
 - Ventosa, A., Arahall, D. R. **2009**. Physico-chemical characteristics of hypersaline environments and their biodiversity. *Extremophiles*, 2, 247-262.
 - Ventosa, A., de la Haba, R. R., Sánchez-Porro, C., Papke, R. T. **2015**. Microbial diversity of hypersaline environments: a metagenomic approach. *Current Opinion in Microbiology*, 25, 80-87.
 - Ventosa, A., Mellado, E., Sanchez-Porro, C., Marquez, M. C. **2008**. Halophilic and halotolerant microorganisms from soils. In *Microbiology of extreme soils* (pp. 87-115). Springer, Berlin, Heidelberg.
 - Ventosa, A., Nieto, J. J., Oren, A. **1998**. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 62(2), 504-544.
 - Ventosa, A., Quesada, E., Rodriguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F., Ramos-Cormenzana, A. **1982**. Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative rods. *Microbiology*, 128(9), 1959-1968.
 - Ventosa, A., Sánchez-Porro, C., Martín, S., Mellado, E. **2005**. Halophilic archaea and bacteria as a source of extracellular hydrolytic enzymes. In *Adaptation to life at high salt concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya* (pp. 337-354). Springer, Dordrecht.
 - Vera-Gargallo, B., Navarro-Sampedro, L., Carballo, M., Ventosa, A. **2018**. Metagenome sequencing of prokaryotic microbiota from two hypersaline soils of the Odiel salt marshes in Huelva, southwestern Spain. *Genome Announcements*, 6(9), e00140-18.
 - Voica, D. M., Bartha, L., Banciu, H. L., Oren, A. **2016**. Heavy metal resistance in halophilic Bacteria and Archaea. *FEMS Microbiology Letters*, 363(14).
 - Wainø, M., Ingvorsen, K. **2003**. Production of β -xylanase and β -xylosidase by the extremely halophilic archaeon *Haloferax utahensis*. *Extremophiles*, 7(2), 87-93.
 - Walsh, D. A., Papke, R. T., Doolittle, W. F. **2005**. Archaeal diversity along a soil salinity gradient prone to disturbance. *Environmental Microbiology*, 7(10), 1655-1666.
 - Wang, C. Y., Chan, H., Lin, H. T., Shyu, Y. T. **2010**. Production, purification and characterisation of a novel halostable xylanase from *Bacillus* sp. NTU-06. *Annals of Applied Biology*, 156(2), 187-197.
 - Wang, J. L., Ma, K. D., Wang, Y. W., Wang, H. M., Li, Y. B., Zhou, S et al. **2016**. *Lentibacillus amyloliquefaciens* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from saline sediment sample. *Antonie van Leeuwenhoek*, 109(2), 171-178.
 - Weaver, W., Shannon, C. E. **1963**. The mathematical theory of communication. Champaign, IL: University of Illinois Press.
 - Wezel, A., Rajot, J. L., Herbrig, C. **2000**. Influence of shrubs on soil characteristics and their function in Sahelian agro-ecosystems in semi-arid Niger. *Journal of Arid Environments*, 44(4), 383-398.
 - Whigham, D. F., Dykyjová, D., Hejný, S. (eds.). **2013**. Wetlands of the world I: Inventory, Ecology and Management (Vol. 15, No. 2). Springer Science and Business Media.
 - Widder, S., Allen, R. J., Pfeiffer, T., Curtis, T. P., Wiuf, C., Sloan, W.T et al. **2016**. Challenges in microbial ecology: building predictive understanding of community function and dynamics. *The ISME journal*, 10(11), 2557-2568.
 - Wright, A. D. G. **2006**. Phylogenetic relationships within the order *Halobacteriales* inferred from 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(6), 1223-1227.
 - Wu, J., Guan, T., Jiang, H., Zhi, X., Tang, S., Dong, H et al. **2009**. Diversity of Actinobacterial community in saline sediments from Yunnan and Xinjiang, China. *Extremophiles*, 13(4), 623-632.
 - Xu, X. W., Wu, Y. H., Wang, C. S., Oren, A., Zhou, P. J., Wu, M. **2007**. *Haloferax larsenii* sp. nov., an extremely halophilic archaeon from a solar saltern. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(4), 717-720.
 - Yang, J., Ma, L. A., Jiang, H., Wu, G., Dong, H. **2016**. Salinity shapes microbial diversity and community structure in surface sediments of the Qinghai-Tibetan Lakes. *Scientific Reports*, 6, 25078.
 - Yang, R., Zhang, L. P., Guo, L. G., Shi, N., Lu, Z., Zhang, X. **2008**. *Nocardiosis valliformis* sp. nov., an alkaliphilic actinomycete isolated from alkali lake soil in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(7), 1542-1546.

- Yeon, S. H., Jeong, W. J., Park, J. S. **2005**. The diversity of culturable organotrophic bacteria from local solar salterns. *The Journal of Microbiology*, 43(1), 1-10.
- Yergeau, E., Sanschagrin, S., Beaumier, D., Greer, C. W. **2012**. Metagenomic analysis of the bioremediation of diesel-contaminated Canadian high arctic soils. *PLoS one*, 7(1), e30058.
- Yim, K. J., Cha, I. T., Whon, T. W., Lee, H. W., Song, H. S., Kim, K.N et al. **2014**. *Halococcus sediminicola* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a marine sediment. *Antonie van Leeuwenhoek*, 105(1), 73-79.
- Yoon, J. H., Kang, K. H., Park, Y. H. **2002**. *Lentibacillus salicampi* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a salt field in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(6), 2043-2048.
- Yousuf, B., Sanadhya, P., Keshri, J., Jha, B. **2012**. Comparative molecular analysis of chemolithoautotrophic bacterial diversity and community structure from coastal saline soils, Gujarat, India. *BMC Microbiology*, 12(1), 150.
- Zak, D. R., Holmes, W. E., White, D. C., Peacock, A. D., Tilman, D. **2003**. Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem function: are there any links?. *Ecology*, 84(8), 2042-2050.
- Zhalnina, K., Dias, R., de Quadros, P. D., Davis-Richardson, A., Camargo, F. A., Clark, I. M et al. **2015**. Soil pH determines microbial diversity and composition in the park grass experiment. *Microbial Ecology*, 69(2), 395-406.
- Zhang, H., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Hugenholtz, P., Kim, H., Kamagata, Y., Nakamura, K. **2003**. *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., a Gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating microorganism, the first cultured representative of the new bacterial phylum *Gemmatimonadetes* phyl. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(4), 1155-1163.
- Zhang, J., Kobert, K., Flouri, T., Stamatakis, A. **2013**. PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinformatics*, 30(5), 614-620.
- Zhang, X. Q., Ying, Y., Ye, Y., Xu, X. W., Zhu, X. F., Wu, M. **2010**. *Thermus arciformis* sp. nov., a thermophilic species from a geothermal area. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(4), 834-839.
- Zhi, X. Y., Li, W. J., Stackebrandt, E. **2009**. An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class *Actinobacteria*, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(3), 589-608.
- Zhou, J., He, Z., Yang, Y., Deng, Y., Tringe, S. G., Alvarez-Cohen, L. **2015**. High-throughput metagenomic technologies for complex microbial community analysis: open and closed formats. *MBio*, 6(1), 2288-14.
- Zhou, R. L., Li, Y. Q., Zhao, H. L., Drake, S. **2008**. Desertification effects on C and N content of sandy soils under grassland in Horqin, northern China. *Geoderma*, 145(3-4), 370-375.

Anunexes

Annexe 1

Détermination des paramètres physicochimiques des sols

Ces analyses visent à caractériser la qualité physicochimique des sols salées de deux chotts (ElBeida et Tinsilt). Les protocoles utilisés pour les différentes propriétés des sols correspondent aux normes internationales

-pH

La détermination des valeurs du pH des sols a été effectuée selon la norme ISO.10390. Elle consiste en la mise en suspension de l'échantillon de sol dans l'eau distillée dans un rapport de 1/5. Les suspensions (2 répétitions par point) ont été mises à agiter pendant 1 heure, puis laissées au repos deux heures. Le pH a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre (pré-étalonné).

-Conductivité électrique (CE)

La CE a été déterminée par la méthode ISO-11265. Elle permet d'estimer le taux de salinité d'une solution. Pour cela, on a préparé une suspension selon le rapport 1/5. Les suspensions (2 répétitions par point) ont été mises à agiter pendant 1 heure, puis centrifugées à 1000 tr/min durant 2 min. La mesure a été réalisée à l'aide d'un conductimètre en plongeant l'électrode dans le surnageant. Les résultats ont été exprimés en mS.cm^{-1} et appréciés en classes de salinité.

-Calcaire total (CT)

L'échantillon de sol à analyser a été acidifié en milieu fermé par l'acide chlorhydrique. En présence de carbonates, un dégagement de CO_2 est observé correspondant au taux de carbonates. Cette quantification a été réalisée par la méthode du calcimètre de Bernard selon la norme ISO-10693. Le taux de CaCO_3 présent dans les sols a été déduit de la courbe d'étalonnage effectuée avec une série de quantités connues de carbonates. La teneur en calcaire total a été exprimée en %.

-Calcaire actif (CA)

La détermination de cette fraction (fine de carbonates) a été faite après agitation du sol avec une solution d'oxalate d'ammonium qui permet de former des oxalates de calcium insolubles. Selon la méthode Drouineau (NFx31-106). Le rapport d'extraction est 1/25. Le dosage de la quantité d'oxalate résiduelle a été effectué par titrimétrie en présence d'une solution de permanganate de potassium et d'acide sulfurique. Les résultats sont exprimés en % de CaCO_3 .

-Matière organique (MO)

Par oxydation avec le bichromate de potassium en excès ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) en milieu acide et le taux de la matière organique était estimé en multipliant le taux de carbone par 1,72 (Mathieu *et al.*, 2003).

Ce dosage a été effectué suivant la méthode de Bonneau et Souchier (1994). Il est basé sur l'oxydation du carbone par le bichromate de potassium en milieu fortement acide (H_2SO_4). Le carbone organique est ainsi transformé en CO_2 . L'excès de bichromate de potassium ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) est titré à l'aide d'une

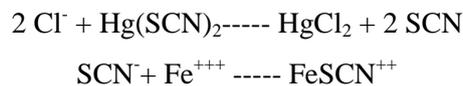
solution de sulfate ferreux sept fois hydraté. Les résultats ont été exprimés en %. Le taux de MO a été obtenu en multipliant le taux du carbone par le coefficient 1,724.

-Azote total (N)

La détermination de l'azote total été effectuée par la méthode de Kjeldahl décrite par Bonneau et Souchier (1994). L'azote du sol a été minéralisé sous forme de NH_4^+ grâce à l'acide sulfurique concentré (H_2SO_4). Le NH_4^+ a été transformé en NH_3 en présence de soude (NaOH) en excès. Le NH_3 a été ensuite déplacé par distillation et piégé dans une solution d'acide borique (H_3BO_3) où il a été titré à l'aide de H_2SO_4 (1N), en présence d'un indicateur coloré (vert de bromocrésol et rouge de méthyle). Le résultat a été exprimé en %.

- Chlorures

Les ions chlorure de l'échantillon réagissent avec le thiocyanate de mercure en déplaçant l'ion thiocyanate. Le thiocyanate libre, en présence d'ions ferriques, forme un complexe coloré, mesurable par colorimétrie :



L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration en ions chlorure présente dans l'échantillon testé.

-Phosphore total

Le dosage du phosphore total (%) repose sur l'oxydation de la matière organique et la conversion de phosphate en orthophosphate soluble, par l'action de persulfate de potassium et d'acide sulfurique. La détermination du phosphore total s'effectue en deux étapes. La première étape consiste à digérer et à oxyder toutes les formes de phosphore avec du persulfate de potassium en milieu acide sous pression à 121 °C. Dans la seconde étape, l'ion orthophosphate réagit avec l'ion molybdate et l'ion antimoine pour former un complexe phosphomolybdate. Ce dernier est réduit avec l'acide ascorbique en milieu acide pour provoquer l'apparition du bleu de molybdène, dont l'absorbance à 660 nm est proportionnelle à la concentration de l'ion orthophosphate présent dans l'échantillon.

Le domaine d'application se situe entre 0,01 mg/l et 2,0 mg/l de P. Des concentrations plus élevées peuvent être rapportées en diluant l'échantillon digéré par un facteur de 2 ou en digérant une dilution appropriée de l'échantillon.

- Magnésium

Ce type de dosage est basé sur la formation de complexes entre les ions métalliques que l'on veut doser, et certains composés organiques. Les complexes doivent être stables et solubles dans l'eau. Les composés organiques complexant les plus employés sont l'acide nitrile triacétique (complexon I), l'acide éthylène diamine tétracétique (complexon II ou EDTA) et surtout le sel disodique de ce dernier acide (complexon III, versénate, Trilon B).

En présence d'un indicateur approprié, on ajoute le complexon à la burette ; l'indicateur garde sa coloration tant que l'ion à doser existe encore sous forme métallique, et le virage se produit lorsque le métal est entièrement complexé. C'est en fait un dosage volumétrique simple.

Annexe 2

Méthode d'hybridation ADN-ADN

La méthode utilisée est celle préconisée par De Ley *et al.* (1970) modifiée par Huss *et al.* (1983)

- Marquage de l'ADN cible

Le marquage a été effectué dans des microtubes de 1,5 ml, après incubation à 15°C pendant 90min. Le volume final de la réaction était de 10µl :

- * 0,7µg d'ADN à marquer (quantifié à 0,3µg /mL).
- * 5 µl du mélange de nucléotides.
- * 1 µL de tampon (Nick translation buffer).
- * 1µl d'enzyme (mélange enzymatique contenu dans le kit).
- * Eau MilliQ (q.s.p) 10µL.

-Le mélange de nucléotides a été structuré selon les proportions suivantes:

- 3 vol. dATP.
- 3 vol. dGTP.
- 3 vol. dCTP.
- 2 vol. dTTP.
- 1 vol. digUTP:
- 0,75 vol. digoxigenine.
- 0,25 vol. biotine.

- Précipitation de l'ADN marqué

Pour précipiter l'ADN marqué après incubation à -80°C/1h, l'ensemble réactionnel précédent a été rajoutée de

- 390 µL d'eau MilliQ.
- 45 µl d'acétate de sodium 3 M, pH 5,2.
- 890 µL d'éthanol absolu à -20 °C.

Après incubation à -80°C/1h, l'ADN marqué a été concentré par centrifugation à 13000rpm pendant 30 minutes et remettre en suspension dans 100 µ L d'eau déminéralisée stérile.

- Vérification du marquage

Le contrôle du marquage a été effectué dans des microplaques de Streptavidine (Plaques de microtitration revêtues de *Streptavidine* (Roche ®). À chaque puits un mélange réactionnel a été ajouté:

- 200µl de tampon phosphate 0,14 M et 0,2% de SDS pH 6,8.
- 5 µL d'albumine à 4% p/v.
- 1 µL d'ADN marqué et préalablement dénaturé pendant 15 minutes à 100 °C et transférés immédiatement dans de l'eau glacée pour éviter une renaturation.

Par la suite, les plaques ont été incubées sous agitation constante à une température ambiante pendant une heure de temps.

- Détection du marquage

Après incubation, les solutions d'ADN marqués ont été éliminées et les microplaques ont été lavées trois fois avec le *tampon 1* (*). Lors de la dernière répétition, les puits doivent très bien sécher, en les laissant retournés pendant quelques secondes sur un papier absorbant. 200µl de la *solution de détection* (**) a été ajoutée par puits. L'ensemble a été incubé pendant 1 heure à température ambiante et sous agitation constante

* : *Tampon 1* (pH 7,5): (0,15 M NaCl, 0,1M de l'Ac. maleique)

** : *Solution de détection* : 5mL du tampon 1, 0,5% Albumine (P/V), 1µL anti-digoxigénine-AP (Roche ®)

- Révélation du marquage

L'huile minérale (Sigma) a été placés dans un microincubateur pendant 16h pour s'y hybrider (T*) à une température inférieure de 30°C à la Tm de la souche à analyser.

$$T^* (\text{°C}) = T_m (\text{°C}) - 30 (\text{°C})$$

Les échantillons d'ADN hybrides ont été transférés dans des microtubes de 1,5ml, en éliminant préalablement l'huile minérale. Le volume a été estimé à l'aide d'une micropipette, et une dilution de l'ordre de 2 a été préparée par l'ajout d'un volume égal d'eau MilliQ stérile pour avoir une concentration finale de 0.14M. Le marquage a été révélé par élimination de la solution de détection des puits, suivi du rinçage des microplaques avec 200 µl de *tampon 1* (3fois). 250µl de la *solution de révélation* (***) est ensuite ajouté par puits et les microplaques ont été incubées à 37°C/30min. La lecture a été effectuée à 405 nm avec un lecteur type Multiskan EX microplaque reader (Thermo Labsystems)

*** : Solution de révélation : 5ml *Tampon 2*(****), 5ml eau MilliQ, 3,5 µL de MgCl₂ (3M) (0,1mg/mL), 10 mg de p-nitrophenil phosphate (Sigma)

**** : *Tampon 2* (pH 9.6) : Na₂CO₃ 0,795g ; NaHCO₃ ; 1,465g; eau MilliQ (qsp). 500ml

- Hybridation ADN-ADN

L'hybridation a été effectuée dans des tubes eppendorf PCR de 0,2 ml où il a été ajouté :

- 15µg d'ADN (purifié et quantifié à une concentration environ 0,3µg /ml).
- 5 µL d'ADN marqué (entre 4 et 12 µL d'ADN peuvent être utilisés).
- Eau MilliQ (qsp) 72µl par échantillon

Les échantillons ont été dénaturés pendant 15 minutes à 100°C après qui sont déposés immédiatement dans un bain d'eau glacée pour empêcher la renaturation pendant 15 minutes. Après centrifugation, 28µl de tampon phosphate 1M a été ensuite ajouté. Pour éviter toute évaporation, les échantillons ont été scellés avec quelques gouttes d'huile minérale stérile.

- Préparation de l'hydroxyapatite équilibré

Le gel d'hydroxyapatite (Hydroxyapatite, Bio-Rad) a été préparé à 1g/10ml avec le tampon phosphate 0,14M et l'équilibrage a été effectué par répartition de 1ml de solution par microtube à raison de 0,1% (p/v). La solution est ensuite centrifugée à 13000 rpm/1min et le surnageant est éliminé. Le dépôt a été rincé une deuxième fois avec 1ml de tampon phosphate [0,14 M, 0,2 % SDS (p/v)] et le surnageant a été éliminé après centrifugation à 13 000 rpm pendant 1 minute. Cette opération a été répétée deux fois. A la fin, le gel

d'hydroxyapatite était remis en suspension dans 1ml de tampon phosphate [0,14 M, 0,2 % SDS (p/v)] et distribué par aliquotes de 500µl (dans des tubes de 1,5 ml). Chaque aliquote a été centrifugée dans des conditions similaires en éliminant le surnageant. Il est conseillé d'équilibrer la quantité d'hydroxyapatite nécessaire au moment de son utilisation.

- **Purification de l'ADN hybridé**

La séparation et purification des produits d'hybridation a été effectuée par élution avec le tampon phosphaté de 0,14M (pH 6,8) pour l'ADNs à simple brin (non hybridé), et le tampon à 0,36M pour l'ADN hybride (double brin).

Pour l'ADN simple brin, 50µl d'ADN préparé a été déposé dans des microtubes à hydroxyapatite équilibré. Le mélange a été bien homogénéisé et incubé à une température (-35°C T_m) pendant 30min. Après centrifugation, le surnageant a été récupéré et le tube reçoit à nouveau 450µl puis 500µl de tampon afin de récupérer la totalité de l'ADN simple brin marqué non hybridé. Pour l'ADN double brin, dans les mêmes conditions, le même microtube à hydroxyapatite reçoit 200µl de tampon à 0,4M. Le mélange a été bien homogénéisé et après centrifugation, le surnageant a été récupéré et le tube reçoit à nouveau 200µl de tampon afin de récupérer la totalité de l'ADN double brin marqué hybridé.

- **Étalonnage et révélation de l'hybridation**

Avant de calculer le pourcentage d'hybridation, l'ADN double brin marqué hybridé et l'échantillon standard ont été dénaturés à 100°C pendant 10 minutes et immédiatement transférés dans de l'eau glacée pendant 15 minutes pour éviter la renaturation. Une courbe d'étalonnage a été tracée par l'utilisation d'une série de dilution décimale d'un ADN marqué à 5ng/µl. La lecture de l'absorbance effectuée à 405 nm permet de tracer une courbe étalon de la densité optique en fonction de la concentration en ADN marqué. Le contrôle et le dosage de l'hybridation a été effectué dans des microplaques de Streptavidine comme déjà décrit (cf, **Détection du marquage/Révélation du marquage**).

Annexe 4

Tableau I. Grille d'évaluation des valeurs du pH du sol (SSDS, 1993)

Classe	pH
Fortement acide	< 5,0
Acide	5,0 - 6,0
Légèrement acide	6,0 - 6,6
Neutre	6,6 - 7,4
Légèrement alcalin	7,4 - 7,8
Alcalin	> 7,8

Tableau II. Grille d'appréciation de la salinité des sols en fonction de la CE (SSDS, 1993)

Classe	EC (mS.cm ⁻¹)
Non-salin	0 - 2
Salinité très faible	2 - 4
Salinité faible	4 - 8
Salinité modérée	8 - 16
Salinité élevée	≥ 16

Tableau III. Grille d'appréciation des taux de la matière organique dans le sol (Hazelton et Murphy, 2007).

Classe	MO %
Taux extrêmement faible	< 0,4
Taux très faible	0,4 - 0,6
Taux faible	0,6 - 1,0
Taux modéré	1,0 - 1,8
Taux élevé	1,8 - 3,0
Taux très élevé	> 3,0

Tableau IV. Grille d'appréciation des taux de calcaire total dans le sol (Baize, 1988)

Classe	Taux de calcaire total
Non calcaire	≤ 1 %
Peu calcaire	1 % - 5 %
Modérément calcaire	5 % - 25 %
Fortement calcaire	25 % - 50 %
Très fortement calcaire	50 % - 80 %
Excessivement calcaire	> 80 %

Tableau V. Grille d'appréciation du taux de calcaire actif dans le sol (Baize, 2000).

Classe	Taux de calcaire actif
Taux faible	≤ 5%
Taux assez élevé	5 - 10 %
Taux élevé	10 - 20 %
Taux très élevé	> 20 %

Tableau IV. Grille d'appréciation de la teneur en azote dans les sols (SSDS, 1993).

Classe	N %
Faiblement riche en azote	< 0,1 %
Moyennement riche en azote	0,1 – 0,2 %
Riche en azote	0,2 – 0,3 %
Très riche en azote	> 0,3 %