

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA**  
**RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE BLIDA 1**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**

**Département de Biologie**

**THESE DE DOCTORAT EN SCIENCES**

**EN BIOLOGIE**

**Spécialité : Biologie**

**ETUDE DE LA BIODIVERSITE MICROBIENNE DANS LES LACS**  
**SALES DE LA REGION STEPPIQUE : ECOLOGIE ET PRODUCTION**  
**D'ENZYMES**

Par :

**BEDDAL Amira**

Soutenu le 9/05/2023, devant le jury composé de :

D. Guetarni	Professeur USDB-1	Président
M. Sassi	Professeur UIKT	Examineur
L. Hocine	MCA UIKT	Examineur
F. Mohamed Mahmoud	MCA USDB-1	Examinatrice
S. BOUTAIBA	Professeur UZADJ	Directeur de thèse
F. HAMAIDI-CHERGUI	Professeur USDB-1	Co-directrice de thèse

Blida, Mai 2023

## RESUME

Le rocher de sel de Djelfa constitue un exemple typique d'environnements hypersalins qui peut héberger une grande variété de microorganismes halophiles dans des conditions physico-chimiques hostiles. Compte tenu de l'importance de l'étude des microorganismes halophiles qui y sont présents en termes de la microbiologie fondamentale et appliquée, les saumures du rocher de sel de Djelfa ont été étudiées pour explorer la diversité microbienne procaryote par des approches culture-dépendante et indépendante et sélectionner les souches archéennes halophiles productrices d'enzymes hydrolytiques extracellulaires. Au total 30 isolats archéens ont été isolés, identifiés par approche polyphasique et testés qualitativement pour la production d'enzymes hydrolytiques extracellulaires (amylase, cellulase, caséinase, gélatinase, estérase, lipase et lécithinase). Sur la base des lipides polaires et le séquençage de l'ADNr 16S, l'analyse de la diversité culturelle archéenne des échantillons de saumures du rocher de sel indiquait que les isolats archéens ont été affiliés à quatre genres de la classe *Halobacteria* à savoir *Haloarcula* (57%), *Halorubrum* (17%), *Halobacterium* (13%) et *Haloferax* (13%).

L'analyse de la diversité microbienne procaryote de quatre échantillons de saumures du rocher de sel par la métagénomique ciblée de la technologie NGS montrait que malgré les conditions hostiles, le rocher de sel supporte une communauté diverse des archées affiliées au phylum *Euryarchaeota* (15,3%) et à la classe *Halobacteria* avec 18 genres et 4 familles. Les séquences affiliées au domaine *Bacteria*, étaient assignées aux phyla : *Proteobacteria* (57,2%), *Firmicutes* (15,4%), *Bacteroidetes* (11,7%) et *Actinobacteria* (12,7%). D'autres phyla minoritaires ont également été détectés comme *Balneolaeota*, *Rhodothermaeota* et *Cyanobacteria*.

Le screening d'activités enzymatiques hydrolytiques extracellulaires chez les isolats archéens a révélé que la gélatinase et l'amylase sont les activités les plus abondantes chez les souches testées. L'activité estérase est classée en troisième position suivie par l'activité lécithinase. Les activités lipase et cellulase n'étaient pas observées chez les souches testées. La production combinée de plusieurs enzymes hydrolytiques a été observée chez 26,66% des isolats.

Ce rapport constitue une étude préliminaire sur la diversité microbienne procaryote du rocher de sel de Djelfa en utilisant à la fois la métagénomique ciblée de la technologie NGS et les techniques culturales.

**Mots clés :** Environnements hypersalins, rocher de sel de Djelfa, diversité microbienne, procaryotes, halophiles, enzymes hydrolytiques extracellulaires, métagénomique.

## ABSTRACT

The rock salt of Djelfa is an example of hypersaline environments, which can harbor a wide variety of microorganisms under hostile physicochemical conditions. Given the importance of the study of halophilic microorganisms present there in terms of fundamental and applied microbiology, the brines of Djelfa's rock salt have been studied to explore the prokaryotic microbial diversity by culture-dependant and independent approaches and to select halophilic archaeal strains producing extracellular hydrolytic enzymes. A total of 30 archaeal isolates were isolated, identified by polyphasic approach and qualitatively tested for the production of extracellular hydrolytic enzymes (amylase, cellulase, caseinase, gelatinase, esterase, lipase and lecithinase). Based on polar lipids and 16S rDNA sequencing, culturable diversity analysis of halophilic archaeal strains indicated that the archaeal isolates were affiliated to four genera of the class *Halobacteria*, namely *Haloarcula* (57%), *Halorubrum* (17%), *Halobacterium* (13%) and *Haloferax* (13%).

The analysis of the prokaryotic microbial diversity of four (04) brines samples by metagenomic amplicon sequencing showed that despite the hostile conditions, the rock salt supports a diverse community of *Archaea* affiliated with the phylum *Euryarchaeota* (15.3%) and the class *Halobacteria* with 18 genera and 4 families. Sequences belonged to the domain *Bacteria* were assigned to the following phyla: *Proteobacteria* (57.2%), *Firmicutes* (15.4%), *Bacteroidetes* (11.7%) and *Actinobacteria* (12.7%). Other minority phyla were also detected such as *Balneolaeota*, *Rhodothermaeota* and *Cyanobacteria*.

The screening of extracellular hydrolytic enzyme activities in archaeal isolates revealed that gelatinase and amylase are the most abundant activities among tested strains. Esterase was ranked third followed by lecithinase activity. Lipase and cellulase activities were not observed in the tested archaeal strains. Combined production of multiple hydrolytic enzymes was observed in 26.66% of tested isolates.

This report constitutes a preliminary study on the prokaryotic microbial diversity of the Djelfa's rock salt using both metagenomics amplicon sequencing of the technology NGS and culturable approach.

**Keywords:** Hypersaline environments, Djelfa's rock salt, microbial diversity, prokaryotes, halophiles, extracellular hydrolytic enzymes, metagenomics.

## ملخص

حجر الملح بمنطقة الجلفة هو مثال نموذجي للبيئات شديدة الملوحة التي يمكن أن تحتوي على مجموعة متنوعة من الكائنات الحية الدقيقة المحبة للملوحة التي تعيش في ظروف فيزيوكيميائية قاسية. نظرا لأهمية دراسة الكائنات الحية الدقيقة المحبة للملوحة والمتواجدة في هذه الأوساط من الناحية التطبيقية فقد تمت دراسة المياه الشديدة الملوحة لهذه المنطقة لاستكشاف تنوع الكائنات الحية الدقيقة بدائية النوى وذلك من خلال تقنيتين: تقنية الزرع في الأوساط المغذية وتقنية التسلسل من الجيل الثاني. تم عزل وتعريف مجموعة مكونة من ثلاثين (30) عزلة أركية بطرق كلاسيكية عديدة وأيضا اختبارها نوعيا لإنتاج الإنزيمات المحللة (الأملاز، السلولاز، الكزيبيناز، الجلاتيناز، الاستراز، الليباز والستيناز). استنادا إلى نتائج تحليل الدهون القطبية والحمض الريبي النووي 16S ، أشار التحليل أن المياه شديدة الملوحة تحتوي على عزلات تنتمي إلى أربع (04) أنواع من فئة *Halobacteria*

: *Haloarcula* 57% ، *Halorubrum* 17% ، *Halobacterium* 13% ، *Haloferax* 13%  
أظهر تحليل التنوع البيولوجي لبدائيات النوى في أربع (4) عينات من المياه الشديدة الملوحة بواسطة تقنية التسلسل من الجيل الثاني (métagénomique ciblée) ، أنه على الرغم من الظروف القاسية فإن حجر الملح يحتوي على مجتمع متنوع من الأركيات التابعة لشعبة *Euryarchaeota* (15,3%) و فئة *Halobacteria* مع وجود 18 نوع و 4 عائلات.

بالنسبة للسلاسل التي نسبت إلى البكتيريا فهي تتوزع كالتالي: *Proteobacteria* (57,2%) ، *Firmicutes* (15,4%) ، *Bacteroidetes* (11,7%) و *Actinobacteria* (12,7%) . تم الكشف أيضا عن أقليات من الشعب و المتمثلة في *Balneolaeota* ، *Rhodothermaeota* و *Cyanobacteria*.

اختبار انتاج الانزيمات المحللة في الوسط الخارجي للخلية كشف بأن الأملاز و الجلاتيناز هما أكثر الأنشطة وفرة في العزلات المختبرة . احتل نشاط الاستراز المرتبة 3 و يليه نشاط الستيناز. لم يتم ملاحظة نشاطي الليباز والسلولاز. لوحظ أيضا الانتاج للعديد من الانزيمات المحللة من طرف عزلة واحدة في 22.66% من مجموع العزلات.

يشكل هذا التقرير دراسة أولية عن التنوع البيولوجي لبدائيات النوى في المياه شديدة الملوحة لحجر الملح بمنطقة الجلفة وذلك باستخدام كل من تقنية *métagénomique ciblée* وتقنية الزرع في الأوساط المغذية.

**الكلمات المفتاحية:** البيئات شديدة الملوحة، حجر الملح لمنطقة الجلفة، التنوع البيولوجي للكائنات الحية الدقيقة، بدائيات النوى، الكائنات الحية الدقيقة المحبة للملوحة، الإنزيمات المحللة خارج الخلية،  
métagénomique.

## Remerciement

Avant tout, je remercie Allah, le miséricordieux, le tout puissant et le plus clément qui nous aide et nous donne le courage de tout faire.

Je tiens à remercier infiniment **Monsieur BOUTAIBA Saad** (Professeur à l'université Ziane Achour de Djelfa) et à lui exprimer ma reconnaissance et ma gratitude pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse sous sa direction, pour ses conseils, ses encouragements et pour la liberté d'action qu'il m'a donnée durant la réalisation de ce travail. J'espère avoir été digne de la confiance qu'il m'ait accordé et que ce travail était à la hauteur de ses espérances.

Je tiens à remercier **Madame HAMAIDI-CHERGUI Fella** (Professeur à l'université Saad Dahlab de Blida) pour avoir accepté d'être ma co-directrice de thèse, pour son aide, sa disponibilité, son soutien, ses encouragements et ses qualités humaines.

Mes vifs remerciements vont à **Monsieur GUETARNI Djamel** (Professeur à l'université Saad Dahlab) qui m'a fait l'honneur de présider le jury de ma thèse. Je tiens également à remercier **Monsieur SASSI Mohamed** (Professeur à l'université Ibn Khaldoun de Tiaret), **Monsieur HOCINE Laaredj** (Maitre de conférences à l'université Ibn Khaldoun de Tiaret) et **Madame MOHAMED MAHMOUD Zahia** (Maitre de conférences à l'université Saad Dahlab de Blida) qui ont accepté de participer à ce jury.

Je remercie vivement **Dr MADALIN Enache** de l'académie roumaine à Bucarest pour son accueil chaleureux, son aide, ses conseils et pour toutes les facilités accordées durant la période du stage. Je tiens à remercier également, **Mandika, Nina, Robert RUGENISCO** et **Roxana COJOC**, pour leur qualité humaine et leur aide durant toute la période du stage.

Je tiens à remercier **Monsieur Aissa et M<sup>elle</sup> Zineb MOKHTARI** (ingénieurs au laboratoire pédagogique de l'université de Djelfa) pour leur aide.

Je tiens à remercier **M<sup>elle</sup> BOUBAKEUR Badra** pour son aide, son soutien amical et sa disponibilité durant les étapes de la publication.

Je souhaite également à exprimer ma gratitude au personnel du laboratoire « Algérienne des eaux » et surtout à **Monsieur LAHLOUH Mustapha et Monsieur**

**DJETTI Houari** pour leur aide dans les analyses physicochimiques et surtout pour leur gentillesse.

Je remercie infiniment **Monsieur OUABEL Habib** (ex-chef département SNV à l'université de Tissemsilt) pour sa compréhension et son aide.

Mes remerciements vont à **Monsieur LAFER Mohamed** (ingénieur au laboratoire pédagogique de l'université de Tissemsilt) pour son aide et sa gentillesse.

Je voudrais remercier tous ceux qui ont croisé mon chemin pendant toutes les années de réalisation de cette étude.

J'exprime ma profonde gratitude à mon mari **OUARDJANI Mohammed** pour son aide, son soutien et sa compréhension.

Je voudrais exprimer mes plus chaleureux remerciements et ma profonde reconnaissance et gratitude à mes très chères sœurs "**Dalila**" et "**Hanene**" pour leur soutien et leur encouragement. Sans leur aide, je n'aurais pas pu surmonter les difficultés et le stress vécu durant toute la période de réalisation de ce travail.

Je tiens à exprimer ma gratitude à mon frère **Abdelmalek** pour son aide et sa disponibilité durant les moments difficiles.

Enfin, je ne pourrai finir sans exprimer ma grande gratitude à mes très **chers Parents**, sans leur aide et encouragement, je ne pourrai jamais arriver à surmonter les moments difficiles.

# TABLE DES MATIERES

RESUME.....	1
ABSTRACT .....	3
ملخص.....	5
REMERCIEMENT .....	7
TABLE DES MATIERES .....	9
Liste des illustrations, graphiques et tableaux .....	14
Liste des abréviations.....	17
INTRODUCTION GENERALE.....	19

## Chapitre 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 Environnements hypersalins .....	22
11.1 Concepts dans l'étude des environnements hypersalins .....	22
1.1.2 Types des environnements hypersalins .....	22
11.3 Caractéristiques des environnements hypersalins.....	24
1.1.3.1 Concentration en sels et composition ionique.....	24
1.1.3.2 Température .....	25
1.1.3.3 Lumière.....	25
1.1.3.4 Oxygène .....	26
1.1.3.5 Disponibilité en matières organiques .....	26
1.2 Environnements hypersalins en Algérie .....	26
1.3 Microorganismes colonisant les environnements hypersalins.....	28
1.3.1 <i>Eucaryotes</i> halophiles.....	30
1.3.2 Bactéries halophiles .....	30
1.3.2.1 <i>Proteobacteria</i> .....	31
1.3.2.2 <i>Firmicutes</i> .....	31
1.3.2.3 <i>Cyanobacteria</i> .....	31
1.3.2.4 <i>Actinobacteria</i> .....	32
1.3.2.5 <i>Spirochaetes</i> .....	32

1.3.2.6 <i>Bacteroidetes</i> .....	33
1.3.2.7 Le genre <i>Salinibacter</i> .....	33
1.3.3 Archées halophiles.....	33
1.4 Stratégies d'adaptation des microorganismes halophiles au stress hyper-osmotique.....	36
1.4.1 Accumulation des sels " salt-in" ou "high salt-in" .....	36
1.4.2 Synthèse et accumulation de solutés compatibles "Salt-out" ou "Low salt-in" .....	37
1.4.3 Adaptation des protéines halophiles au sel.....	39
1.5 Application biotechnologiques des microorganismes halophiles.....	42
1.5.1 Bioplastiques.....	42
1.5.2 Exopolysaccharides (EPS).....	43
1.5.3 Enzymes hydrolytiques .....	44
1.5.4 Solutés compatibles .....	45
1.5.5 $\beta$ -Carotène .....	46
1.5.6 Halocine .....	46
1.6 Techniques d'étude de la diversité microbienne .....	46
1.6.1 Approches microbiologiques classiques .....	46
1.6.2 Approches moléculaires.....	47
1.6.3 Approche métagénomique.....	47
1.6.4 Autres approches.....	48

## **Chapitre 2 : MATERIEL ET METHODES**

2.1 Description du site d'échantillonnage « Rocher de sel ».....	50
2.1.1 Localisation géographique .....	50
2.1.2 Echantillonnage .....	52
2.2 Analyses physico-chimiques des saumures du rocher de sel "Hadjr El Melh" .....	52
2.2.1 Etape pré-analytique .....	52
2.2.2 Mesure du pH .....	52
2.2.3 Mesure de la conductivité électrique.....	53
2.2.4 Mesure de la chlorinité (Cl‰).....	53
2.2.5 Détermination de la salinité (S ‰) .....	53
2.2.6 Dosage des ions Ca <sup>2+</sup> .....	53
2.2.7 Dosage des ions Mg <sup>+2</sup> .....	54

2.2.8 Dosage des ions sulfate.....	54
2.2.9 Dosage des HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (hydrogénocarbonates).....	54
2.3 Analyse microbiologique .....	55
2.3.1 Isolement, purification et conservation des archées halophiles .....	55
2.3.2 Sélection des souches halophiles obligatoires.....	55
2.3.3 Identification phénotypique préliminaire des souches halophiles.....	55
2.3.3.1 Examen macroscopique .....	56
2.3.3.2 Examen microscopique.....	56
2.3.3.2.1 Coloration de Gram modifiée (Coloration de Dussault) .....	56
2.3.3.2.2 Examen au microscope électronique à balayage .....	57
2.3.3.3 Caractérisation biochimique.....	57
2.3.3.3.1 Recherche de la catalase .....	57
2.3.3.3.2 Recherche de l'oxydase .....	57
2.3.3.3.3 Test de lyse par l'eau distillée.....	58
2.3.3.3.4 Détermination de la concentration optimale en NaCl à la croissance .....	58
2.3.3.3.5 Utilisation des substrats carbonés .....	58
2.3.3.3.6 Croissance en anaérobiose .....	58
2.3.3.4 Test de sensibilité aux antibiotiques et aux sels biliaires .....	59
2.3.3.4.1 Test de sensibilité aux antibiotiques .....	59
2.3.3.4.2 Test de sensibilité aux sels biliaires.....	59
2.3.3.5 Caractérisation chimio taxonomique .....	60
2.3.3.5.1 Extraction des lipides totaux .....	60
2.3.3.5.2 Analyse de l'extrait total de lipides par chromatographie sur couche mince .....	61
2.3.3.5.3 Révélation.....	61
2.3.4 Identification moléculaire.....	61
2.3.4.1 Extraction de l'ADN génomique .....	61
2.3.4.2 Contrôle de la qualité et détermination de la quantité d'ADN en solution.....	61
2.3.4.3 Amplification du gène codant l'ARNr 16S par PCR .....	62
2.3.4.4 Electrophorèse sur gel d'agarose .....	62
2.3.4.5 Purification et séquençage.....	63
2.3.4.6 Analyse phylogénétique.....	64

2.4 Etude de la biodiversité microbienne procaryote par séquençage haut-débit (métagénomique ciblée).....	65
2.4.1 Préparation des échantillons pour l'analyse métagénomique .....	66
2.4.2 Extraction de l'ADN environnemental .....	66
2.4.3 Dosage et contrôle de la pureté de l'ADN .....	67
2.4.4 Préparation de la bibliothèque Hiseq par amplification et séquençage ....	68
2.4.4.1 Amplification par PCR.....	68
2.4.5 Procédure d'analyse .....	69
2.4.5.1 Prétraitement (preprocessing) .....	69
2.4.5.2 Analyse primaire .....	69
2.4.5.3 Assignation Taxonomique.....	69
2.4.5.4 Tableau d'OTU .....	69
2.4.5.5 Analyse secondaire .....	70
2.4.5.6 Analyse de la diversité .....	70
2.5 Sélection des souches productrices d'enzymes hydrolytiques extracellulaire .	70
2.5.1 Activité amylasique .....	70
2.5.2 Activité cellulasique.....	71
2.5.3 Activité Protéasique (caséinase).....	71
2.5.4 Activité gélatinasiq ue .....	71
2.5.5 Activité estérasique .....	71
2.5.6 Activité lipasique .....	72
2.5.7 Activité lécithinasique.....	72

### **Chapitre 3 : RESULTATS ET DISCUSSION**

3.1 Résultats de l'analyse physicochimique des saumures du rocher de sel .....	73
3.2 Résultats de l'identification phénotypique .....	75
3.2.1 Isolement et sélection des halophiles .....	75
3.2.2 Distribution des isolats selon le point de prélèvement .....	75
3.2.3 Caractérisation phénotypique des isolats.....	76
3.2.2.1 Aspect macroscopique.....	77
3.2.2.2 Aspect microscopique.....	78
3.2.3 Caractérisation biochimique des isolats .....	78

3.2.3.1 Salinité.....	79
3.2.3.2 Sensibilité aux antibiotiques.....	80
3.2.3.3 Test de sensibilité aux sels biliaires .....	82
3.2.4 Caractérisation chimio taxonomique .....	82
3.2.5 Caractérisation moléculaire.....	84
3.3 Analyse métagénomique de la diversité microbienne de l'eau hypersaline du rocher de sel .....	88
3.3.1 Structure de la communauté procaryote de l'eau du rocher de sel .....	89
3.3.1.1 Structure de la communauté archéenne globale .....	90
3.3.1.2 Structure de la communauté bactérienne globale.....	92
3.3.2 Structure de la communauté procaryote par échantillon .....	93
3.3.3 Mesure de la diversité alpha .....	96
3.4 Criblage des souches productrices d'enzymes .....	98
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>101</b>

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## **ANNEXE**

# LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

<b>Figure 1.1</b> : Exemples des environnements thalassohalins .....	23
<b>Figure 1.2</b> : Exemples des environnements athalassohalins .....	23
<b>Figure 1.3</b> : Situation géographique des Chotts et Sebchas en Algérie .....	27
<b>Figure 1.4</b> : Arbre phylogénétique universelle du monde vivant basé sur le séquençage du gène codant l'ARNr 16S .....	29
<b>Figure 1.5</b> : Représentation schématique des transporteurs membranaires de <i>Halobacterium salinarum</i> permettant le contrôle de l'osmolarité intracellulaire .....	40
<b>Figure 1.6</b> : Principaux solutés compatibles organiques chez les procaryotes halophiles et halotolérants .....	41
<b>Figure 1.7</b> : Comparaison de la structure tridimensionnelle de la malate déshydrogénase d'une archée halophile <i>Haloarcula marismortui</i> avec celle de la malate déshydrogénase d'une bactérie mésophile <i>Bacillus anthracis</i> .....	41
<b>Figure 2.1</b> : Localisation de la zone d'étude et des sites d'échantillonnage .....	51
<b>Figure 2.2</b> : Représentation simplifiée du Workflow de séquençage métagénomique ciblée 16S.....	65
<b>Figure 2.3</b> : Protocole d'extraction de l'ADN génomique par DNeasy Power Soil Prokit (Qiagen) .....	67
<b>Figure 3.1</b> : Aspects macroscopique et microscopique des isolats .....	77
<b>Figure 3.2</b> : Répartition des isolats archéens selon la concentration optimale de NaCl pour la croissance .....	79
<b>Figure 3.3</b> : Résultats de la chromatographie sur couche mince des lipides polaires membranaires des isolats archéens .....	83
<b>Figure 3.4</b> : Proportion des genres haloarchéens parmi les isolats selon la composition en lipides polaires. ....	84

<b>Figure 3.5 :</b> Résultat de l'amplification du gène codant l'ARNr 16S sur gel d'agarose de 11 souches archéennes. ....	85
<b>Figure 3.6 :</b> Analyse phylogénétique des isolats haloarchéens basée sur la comparaison des séquences du gène codant l'ARNr 16S de dix isolats avec celles des seize souches type proches. ....	87
<b>Figure 3.7 :</b> Composition moyenne de la communauté procaryote de l'eau du rocher de sel .....	89
<b>Figure 3.8 :</b> Abondance relative moyenne des différents genres de la classe <i>Halobacteria</i> dans l'eau hypersalée du rocher de sel.....	91
<b>Figure 3.9 :</b> Composition de la communauté bactérienne dans l'ensemble échantillons d'eau du rocher de sel.....	93
<b>Figure 3.10 :</b> Abondance relative des taxons phylogénétiques archéens et bactériens dans chaque échantillon à l'échelle du phylum.....	94
<b>Figure 3.11 :</b> Courbe de raréfaction par calcul basé sur la similitude entre les séquences à 97%.....	97
<b>Figure 3.7 :</b> Résultats de la mise en évidence de certaines activités enzymatiques hydrolytiques chez quelques souches archéennes du rocher de sel. ....	100
<b>Tableau 1.1 :</b> Classification phylogénétique des <i>Halobacteria</i> selon le service de la liste des noms procaryotes avec nomenclature permanente.....	35
<b>Tableau 1.2 :</b> Enzymes produites par les microorganismes halophiles .....	45
<b>Tableau 1.3 :</b> Caractéristiques des techniques de biologie moléculaire couramment utilisées en écologie microbienne pour l'étude de la biodiversité microbienne.....	49
<b>Tableau 2.1 :</b> Programme d'amplification par PCR.....	62
<b>Tableau 3.1 :</b> Caractéristiques physicochimiques des échantillons de saumures du rocher de sel .....	73

<b>Tableau 3.2</b> : Caractères macroscopiques et microscopiques des isolats .....	81
<b>Tableau 3.3</b> : Résultats de la sensibilité des isolats aux antibiotiques .....	78
<b>Tableau 3.4</b> : Résultats de criblage des enzymes hydrolytiques .....	98

## LISTE DES ABREVIATIONS

$A_{260\text{nm}}$  : Absorbance à 260 nm  
ARISA : Ribosomal Intergenic Spacer Analysis  
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool  
CeMIA: Cellular and Molecular Immunological applications  
CLSI: Clinical and Laboratory of Standards Institute  
CRT : Cyclic reversible termination  
DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis  
EPS : Exopolysaccharides  
MEGA X: Molecular Evolutionary Genetic Analysis  
NCBI: National Center for Biotechnology  
NGS: Next Generation Sequencing  
OTU: Unité Taxonomique Opérationnelle  
PCR : Polymérase Chain Reaction  
PG : phosphatidylglycérol  
PGP-Me : phosphatidylglycerol phosphate methyl ester  
PGS: : phosphatidylglycerol phosphate sulfate  
PHA : Polyhydroxyalkanoate  
p/v : poids / volume  
QIIME: Quantitative Insights Into Microbial Ecology  
RDP: Ribosomal Database Project  
RT-qPCR : Real time quantitative PCR  
SG : milieu Sehgal and Gibbons  
SIP : Stable Isotope Probing  
SSCP : Single Strand Conformation Polymorphism  
S-DGD-1: diglycosyl sulfate di éther-1  
S-DGD-3: diglycosyl sulfate di éther-3  
S-TeGD-1: tetraglycosyl sulfate di éther  
S-TGD-1: triglycosyl sulfate di éther

TGD-2: triglycosyl di éther-2

TGGE : Temperature Gradient Gel Electrophoresis

T-RFLP : Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism

UV: Ultra-Violet

v/v: volume / volume

# **INTRODUCTION GENERALE**

## INTRODUCTION GENERALE

Les habitats hypersalins qu'ils soient naturels (mer, lacs salés, mines de sels...) ou d'origine anthropogénique (marais salants, bassins de cristallisation, ...) constituent un exemple typique des milieux extrêmes dans lesquelles une diversité considérable et unique en microorganismes halophiles peut être trouvée [1]. Cette diversité microbienne est liée aux différentes stratégies d'adaptation développées pour faire face aux conditions hostiles qui règnent dans ce type d'environnements extrêmes. L'intérêt croissant porté pour ces microorganismes et les environnements hypersalins a abouti à la découverte d'une diversité étonnante, complètement inattendue en microorganismes procaryotes produisant des biomolécules aux caractéristiques particulières qui pourraient trouver de nombreuses applications biotechnologiques [2].

L'Algérie possède une grande diversité d'habitats hypersalins naturels qui existent au niveau de la mer, des steppes et des zones désertiques. Des efforts considérables sont déployés pour l'étude et l'exploration de la diversité des environnements hypersalins du point de vue faunistique et floristique. Cependant, les recherches sur leur biodiversité microbienne sont limitées. Les études pionnières sur la diversité microbienne dans les lacs salés en Algérie ont été menées par Hacène et *al.* [3], kharroub [4] (Est algérien) ; Boutaiba et *al.* [5], Quadri et *al.* [6] et Menasria [7]. En dépit de ces efforts, beaucoup d'entre eux, dont le rocher de sel de Djelfa, n'ont pas été explorés. Cet environnement hypersalin, nommé par les indigènes Hadjr El Melh, est un exemple d'environnements extrêmes, exposé comme les autres milieux hypersalins à des conditions physicochimiques extrêmes dues aux rayonnements UV, aux changements drastiques de température et à la sécheresse. Toutes ces conditions de vie non conventionnelles font de cet environnement une cible d'étude importante pour les microbiologistes.

A cet effet, Le but principal de ce présent travail est d'étudier la biodiversité des communautés microbiennes procaryotes des échantillons de saumures du rocher de sel de Djelfa par deux approches : culturelle classique et métagénomique.

L'exploration de la diversité microbienne procaryote par les approches culturelles a pour but d'isoler et d'identifier la fraction archéenne cultivable pour pouvoir sélectionner les souches productrices d'enzymes hydrolytiques extracellulaires. L'intérêt porté pour les enzymes hydrolytiques des archées halophiles découle de leur résistance aux conditions extrêmes de salinité, de température et de pH [2]. En effet, les applications industrielles nécessitent des biocatalyseurs fonctionnant dans des conditions extrêmes où les enzymes commerciales ne possèdent que de faible activité ou stabilité [2].

Quant à l'étude de la biodiversité microbienne procaryote par la métagénomique ciblée de la technologie NGS (Next Generation Sequencing), elle vise à avoir un inventaire des taxons présents avec détermination de leur abondance relative.

D'une manière générale, l'étude de la biodiversité microbienne de tels écosystèmes pourrait contribuer de manière significative à élargir nos connaissances sur les archées halophiles en permettant d'établir une base de données des microorganismes procaryotes halophiles et halotolérantes du rocher de sel et de chercher d'éventuelles potentialités biotechnologiques chez les organismes isolés.

Pour atteindre ces objectifs, différentes étapes doivent être réalisées

- ✓ Echantillonnage et analyse physicochimique des saumures.
- ✓ Isolement et identification phénotypique, biochimique et chimio taxonomiques des isolats archéens halophiles aérobies.
- ✓ Identification moléculaire de quelques souches archéennes et analyse phylogénétique pour positionner les isolats
- ✓ Recherche de certaines activités enzymatiques hydrolytiques extracellulaires chez les isolats archéens
- ✓ Etudes de la diversité microbienne procaryote des saumures de rocher de sel par séquençage à haut-débit de la région hypervariable V<sub>4</sub>-V<sub>5</sub> (métagénomique ciblée).

Ce manuscrit s'organise en 3 chapitres :

- ✓ Le premier chapitre est une synthèse bibliographique sur les environnements hypersalins, les microorganismes halophiles et

halotolérants qui les hébergent et leurs applications biotechnologiques et les techniques d'étude de la biodiversité.

- ✓ Le deuxième chapitre est consacré à la méthodologie de travail qui présente l'ensemble des techniques nécessaires à l'étude de la biodiversité des communautés microbiennes procaryotes par les approches classique et métagénomique.
- ✓ Le troisième chapitre présente l'ensemble des résultats obtenus qui ont été comparés et discutés par rapport à d'autres travaux.

Nous terminons notre modeste travail par une conclusion générale et des perspectives pour ouvrir de futures continuités de cette étude.

# **Chapitre 1**

## **SYNTHESE**

## **BIBLIOGRAPHIQUE**

## Chapitre 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1.1 Environnements hypersalins

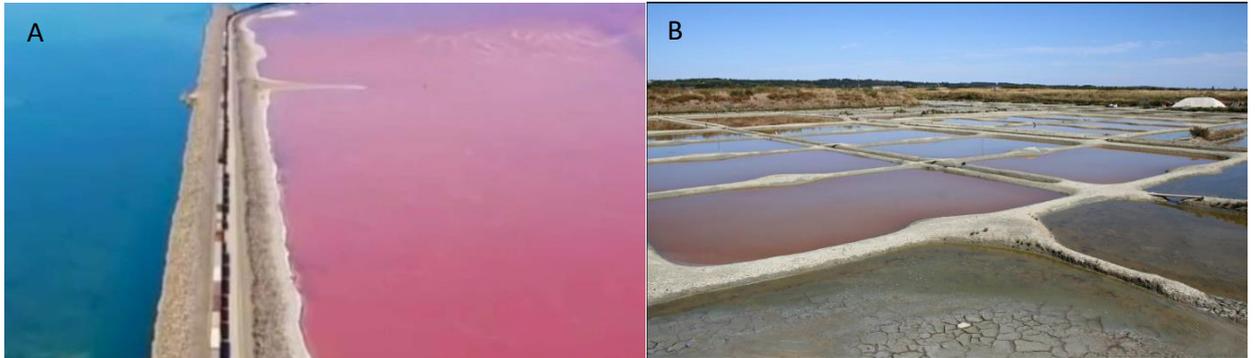
#### 1.1.1. Concepts dans l'étude des environnements hypersalins

Lorsque l'on parle des environnements hypersalins, les premiers termes qui sont mentionnés sont les sels et la salinité. Le terme sels se réfère à une combinaison de cations et anions inorganiques dont les ions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Na}^+$  sont respectivement les plus abondants [8]. Ainsi, la salinité correspondant à la teneur en sels dissous dans l'eau de mer [9] est exprimée par la concentration de NaCl (p/v) plutôt que par la concentration en sels avec les mêmes valeurs parce que la plupart des halophiles ont un besoin absolu pour le sodium [10]. Selon la définition de Rich et Maier [11], les milieux hypersalins sont ceux dont la concentration en sels est supérieure à celle de l'eau de mer (35 g/l). Toutefois, Oren [12] définit les milieux hypersalins comme étant des milieux avec des concentrations en sels deux fois supérieure à celle de l'eau de mer, parfois même proches de la saturation.

#### 1.1.2. Types des environnements hypersalins

Les environnements hypersalins ou hypersalés sont largement répartis sur le globe terrestre [13]. Ils englobent les eaux hypersalines (lacs salines, lagunes, marais salins, salines solaires littorales et sebkhas) et les milieux hypersalins terrestres tels que les sols (comme ceux du désert hyperaride d'Atacama au Chili), les croutes salées et les gisements de sel souterrains [10]. Dans ce type de milieux extrêmes, plusieurs facteurs environnementaux régissent la composition de la communauté microbienne qui héberge ce biotope. Selon l'origine des sels, les milieux hypersalins se subdivisent en deux catégories : les milieux marins ou thalassohalins qui résultent d'une forte évaporation de l'eau de mer [13] et les milieux non-marins ou athalassohalins qui se forment par dissolution des sels qui se trouvent dans les roches ou les couches géologiques traversées par l'eau de pluie ou l'eau de ruissellement [14]. Le chlorure de sodium est le sel prédominant dans les milieux thalassohalins. Il se trouve avec d'autres sels minéraux qui caractérisent l'eau de mer [8]. Les marais salants conçus pour la production du sel et le grand lac salé Utah (USA) (Fig.1.1) sont des exemples des milieux hypersalins

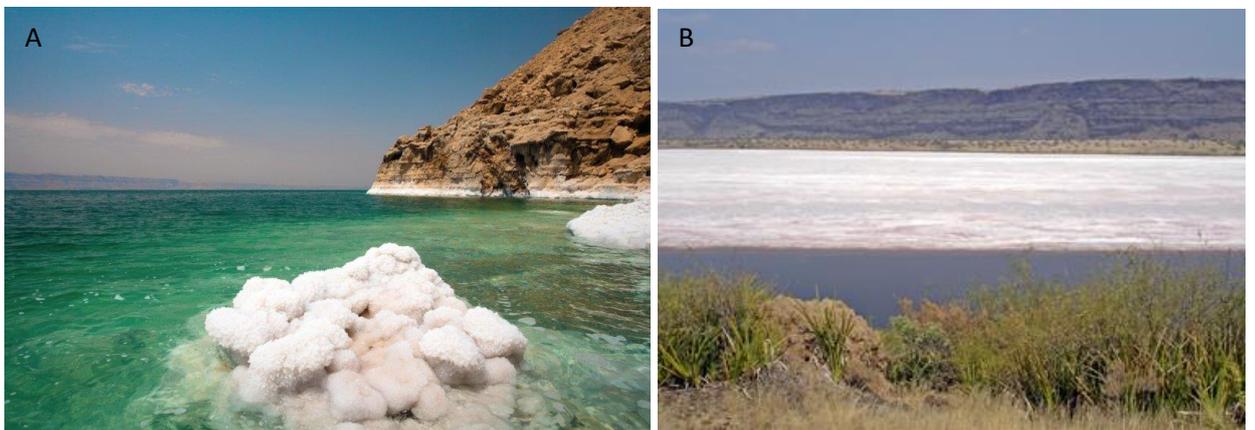
thalassohalins [13]. A la différence de la première catégorie, les milieux athalassohalins (Fig 1.2) comme la mer morte et les lacs sodiques alcalins contiennent des apports ioniques différents de ceux de l'eau de mer et leur composition en sels minéraux dépend essentiellement de la nature géologique des dépôts [8].



**Figure 1.1.** Exemples des environnements thalassohalins : **A.** Grand lac salé à Utah (USA). **B.** Marais salants de Guérande (France).

<https://cdn.dnaindia.com/sites/default/files/styles/full/public/2022/03/25/1200025-fotojet-2022-03-25t225323.299.jpg>

<https://www.flickr.com/photos/75921462@N08/48610285153/in/photostream/>



**Figure 1.2.** Exemples des environnements athalassohalins : **A.** Mer morte (Palestine). **B.** Lac sodique Magadi (Kenya).

<https://www.petitfute.com/medias/mag/22143/835/017647-les-incontournables-de-la.jpg>

<https://sites.google.com/site/tpesurlshalophiles/lac-magadi-kenya/LakeMagadi.png?attredirects=0>

### 1.1.3. Caractéristiques des environnements hypersalins

Les milieux hypersalins, où le taux de sel est proche de la saturation, est l'un des milieux les plus extrêmes du fait de leur exposition à plusieurs autres formes de stress environnemental (température, pression, disponibilité de l'oxygène et de nutriments, forte radiation,...etc) en plus du stress salin [15].

#### 1.1.3.1. Concentration en sels et composition ionique

Les propriétés des environnements hypersalins en tant que biotope qui héberge les procaryotes halophiles et halotolérants sont définies en fonction de la concentration totale en sel et de la composition ionique [16]. Cependant, le pH est un autre facteur qui différencie les milieux thalassohalins de ceux athalassohalins [17]. Le grand lac salé à Utah (USA) qui est un lac hypersalé d'origine marine a la même composition que celle de l'eau de mer mais dix fois plus concentré [18]. Son pH varie de 7,7 au nord à 8,2 au sud avec un taux de sels dissous égale à 332,53 g/l au nord et 117,43 g/l au sud. Les ions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Na}^+$  sont les ions prédominants en solution. La concentration des ions  $\text{Cl}^-$  varie de 181,0 g/l au nord à 65,3 g/l au sud alors celle des ions  $\text{Na}^+$ , elle est de 105,4 g/l dans la partie nord et de 35,9 g/l dans la partie sud [19]. A la différence des milieux thalassohalins, Les milieux athalassohalin ont une composition différente de celle de l'eau de mer. Par exemple, la mer morte qui est un lac hypersalin continental à l'Ouest de la Jordanie se caractérise par une salinité extrêmement importante (34%) et une faible valeur de pH (5,9) avec dominance des ions magnésium (46,100 mg/l). Les ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  sont présent en concentrations de 34,290, 4,430 et 23,770 mg/l, respectivement [20]. Dans la vallée du Grand Rift au Kenya (Afrique de l'Est), un autre type de milieu athalassohalin dont la composition ionique et le pH sont nettement différentes de ceux du premier exemple. Ce sont les lacs sodiques, hautement alcalins (géologie riche en  $\text{Na}^{2+}$  et pauvre en  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{Ca}^{2+}$ ), dont la salinité varie d'environ 5% (p/v) de sels totaux (lac Bogoria et Elementeita) jusqu'à saturation en  $\text{NaCl}$  et  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (lac Magadi et Natrun) avec des valeurs de pH allant de 10,5 à 11 pour les lacs les plus dilués. Cependant, les valeurs de pH enregistrées dans les lacs les plus hypersalins sont supérieures à 11,5 (lac Magadi et Natrun) [21].

### 1.1.3.2. Température

Les environnements hypersalins sont principalement soumis à un climat tropical aride qui se caractérise par des températures diurnes élevées et de fortes intensités lumineuses [15]. La plupart d'entre eux se situent dans les zones sèches et chaudes, d'autres dans les régions tempérées et même polaires [22]. Dans ces conditions, l'eau à forte salinité se réchauffe très rapidement en raison de leur faible taux de chaleur spécifique et d'évaporation [10] et de la pigmentation des microorganismes présents dans l'eau qui augmente l'absorption de la chaleur en agissant comme un piège infrarouge [23]. Par conséquent, des températures très élevées de l'ordre de 45°C peuvent être enregistrées, même avec des températures de l'air douces de 30°C [24]. En contrepartie, les eaux hypersalines se refroidissent plus vite la nuit et en hiver, et restent liquides à très basses températures. Dans le grand lac salé (USA), par exemple, les températures s'échelonnent entre -30°C en hiver et 48°C en été [25]. Dans ces conditions de température élevée, avec de fortes fluctuations périodiques, la grande majorité des microorganismes halophiles sont des mésophiles ou légèrement thermophiles avec des optima compris entre 37°C et 50°C pour les bactéries et entre 40°C et 55°C pour les archées halophiles [15]. Cependant, une large variété de bactéries halophiles psychrotrophes sont également été isolées à partir des lacs salés de l'antarctique où les températures varient selon la saison entre moins de 0°C et +11.5°C [16]. *Halorubrum lacusprofundi* qui est une archée halophile psychrotrophe avec croissance optimale entre 31°C et 37°C a été isolée des lacs profonds de l'antarctique. Une croissance lente de cet isolat est enregistrée jusqu'à 4°C [26].

### 1.1.3.3 Lumière

Les eaux hypersalines sont généralement des eaux superficielles à raison de leur concentration dans les régions géographiques à faible pluviométrie [15]. Par conséquent, le biote est bien adapté aux fortes radiations solaires grâce au pigment rouge qui caractérise la communauté des eaux hypersalines [27]. En effet, les caroténoïdes et les bactériorubérines responsables de cette pigmentation agissent comme agents photo protecteurs [28] et participent également à la photoréactivation, via la lumière visible, de l'ADN endommagé par l'exposition aux

rayonnements UV [29]. En outre, ils augmentent la température de l'eau en favorisant l'absorption des radiations infrarouges [23].

#### 1.1.3.4. Oxygène

Etant donné que les concentrations élevées en sel et les températures élevées limitent la solubilité de l'oxygène, les eaux hypersalines ont de faible concentration en oxygène [10] ; cependant, la vie aérobie est bien représentée dans ces environnements [30]. Dans les étangs peu profonds à forte productivité cyanobactériale, la majeure partie de l'oxygène produit pendant la journée par les cyanobactéries est transférée aux populations microbiennes aérobies [31]. Le faible taux de diffusion de l'oxygène dans les saumures et la densité élevée de ces derniers contribuent au développement des conditions anoxiques en favorisant la stratification [15].

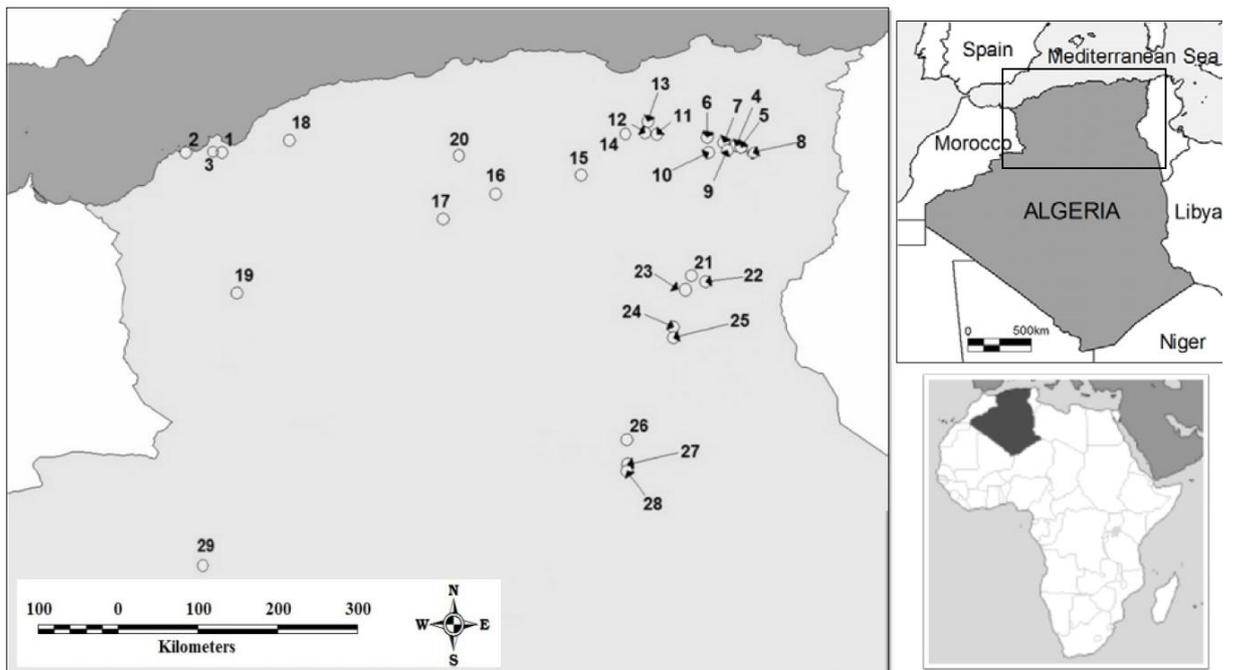
#### 1.1.3.5. Disponibilité en matières organiques

Les formes de vie présentes dans les écosystèmes hypersalés sont principalement représentées par les communautés procaryotes [15]. Dans le domaine des eucaryotes, seules les algues *Dunaleilla salina* ont été répertoriées [12]. Les végétaux et les algues qui se trouvent sur les berges des lacs hypersalés, peuvent être une source non négligeable de matière organique après recouvrement par les eaux des rives provoquant ainsi la mort de la végétation [15].

### 1.2. Environnements hypersalins en Algérie

Plus de la moitié des écosystèmes aquatiques algériens sont des lacs salés couvrant environ une superficie de deux millions d'hectares [7]. La majorité de ces plans d'eau sont sous formes de vastes dépressions endoréiques continentales représentées par les Chotts et Sebkhass, réparties essentiellement entre les deux chaînes montagneuses l'Atlas tellien, l'Atlas saharien et l'Erg Oriental [32]. Ils caractérisent essentiellement les régions steppiques semi-arides et arides des Hauts plateaux (Chott Chergui, Chott Zahrez et Chott Hodna) et les régions sahariennes arides et hyperarides (Chott Melghir et Chott Merouane...etc). Selon Dubost [33], le Chott est une zone salée entourant la Sebkhass, qui est le fond humide de la dépression. Cependant, le terme arabe Sebkhass se réfère à une dépression

fermée en forme de cuvette à fond plat, à inondation temporaire, sans végétation, dans lequel se produit une accumulation de sel. Bryant et Rainey [34] indiquaient que ces dépressions salées sont alimentées par les eaux de précipitations et souterraines. Par conséquent, lors de la saison sèche, elles deviennent éphémères avec l'augmentation de l'évaporation [37]. La situation géographique des Chotts et sebkhas de l'Algérie sont représentés dans la figure 1.3.



**Figure 1.3.** Situation géographique des Chotts et Sebkhass en Algérie (Liste non exhaustive).1. Saline d'Arzew, 2. Sebkhass d'Oran, 3. Lac Téllamine, 4. Garaet Ant Djmel, 5. Garaet Guellif. 6. Sebkhass Ezzemoul, 7. Gara et Merhsel, 8. GaraetTarf, 9. Chott Tensilt, 10. Chott Boumia, 11. Chott El Beida Hammam Essoukhna, 12. Chott El Frain, 13. Sebkhass Bazzar, 14. Sebkhass El Hamiet, 15. Chott El Hodna, 16. Chott Zahrez Chergui, 17. Chott Zahrez Gherbi, 18. Sebkhass Sidi Bouziane, 19. Chott Chergui, 20. Sebkhass Boughzoul, 21. Chott Melghir, 22. Chott Boudjloul, 23. Chott Merouane, 24. ChottTindla, 25. Chott Sidi Amrane, 26. Sebkhass Sefioune, 27. Chott Oum Raneb, 28. Chott Ain El Beida, 29. Sebkhass El Maleh [7]

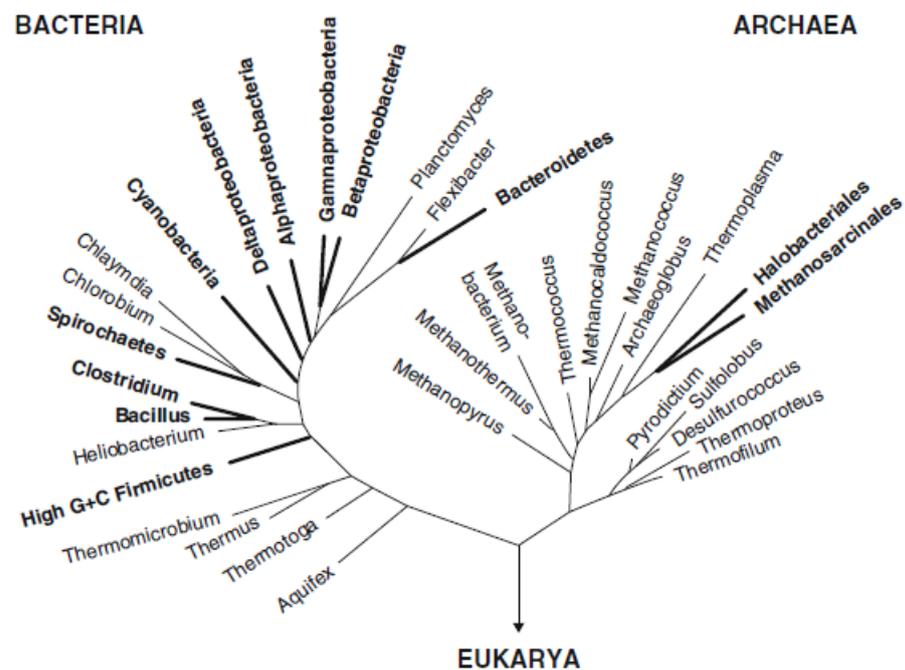
### 1.3. Microorganismes colonisant les environnements hypersalins

Au cours des derniers trente ans, les études approfondies sur les environnements hypersalins qui ont été réalisées sur de nombreuses zones géographiques ont permis l'isolement et la caractérisation taxonomique d'un grand nombre d'espèces placées dans les trois domaines de la vie ; *Eukarya*, *Bacteria* et *Archaea* (Fig 1.4) et sont nommés les halophiles. Dans un sens large, les organismes halophiles (en Grec "organisme qui aime le sel") sont ceux qui sont capable de croître mieux dans des milieux contenant de 1 à 30% de sels dissous [10]. Les halotolérants constituent une autre catégorie de microorganismes qui peuvent se développer dans ce type de biotopes [36]. Alors que les halophiles sont des microorganismes qui se développent dans des concentrations élevées de sels, ceux qui sont capables de se développer en l'absence de sels, mais tolèrent des concentrations variables en sels sont considérés comme halotolérants ou non-halophiles [37]. En fait, plusieurs définitions ont été proposées pour définir le terme halophile. Selon la définition donnée par Margesin et Schinner [36], les microorganismes halophiles sont ceux qui nécessitent obligatoirement du sel (généralement du NaCl) pour leur croissance. Le spectre d'organismes qui se trouvent dans ces biotopes salins est principalement déterminé par des paramètres tels que la salinité, la solubilité de l'oxygène, la composition ionique et dans certains cas la température et le pH [38].

Cependant, bien qu'il n'existe pas de limites nettes entre les différentes catégories, Kushner [39] a distingué plusieurs catégories selon la concentration en sels optimale pour la croissance: les microorganismes non-halophiles sont ceux qui se développent mieux dans un milieu contenant une concentration en NaCl inférieure à 0,2 M, les microorganismes légèrement halophiles représentés essentiellement par les bactéries marines croissent mieux entre 0,2 et 0,5 M. Les halophiles modérés sont ceux qui se développent mieux entre 0,5 et 2,5 M. Cependant, les halophiles extrêmes sont ceux qui montrent un optimum de croissance dans les milieux contenant 2,5 à 5,2 M de NaCl (saturation). Une autre catégorie de microorganismes qualifiés polyextrêmophiles grouillent dans les environnements hypersalins qui présentent soit des valeurs de pH extrêmement élevées comme le cas des lacs sodiques en Afrique, en Inde et en Chine (pH est supérieur ou égale à 11 et concentration saline supérieure à 300 g/l) [40], soit des

températures élevées (*Thermothrix orenii* résiste jusqu'à 68°C) [41] ou au-dessous de 0°C (lacs salés de l'antarctique) [42].

Les bassins anoxiques hypersalés profonds « DHABs », formés dans les fractures au fond de la mer sont également des biotopes hypersalins qui hébergent des procaryotes poly extrêmophiles, adaptés à des conditions caractérisées par une salinité et une densité très élevée, une forte pression hydrostatique, l'absence de lumière, l'anoxie et une chemocline abrupte très prononcée, de quelques mètres d'épaisseur. Si certains poly extrêmophiles sont similaires à ceux déjà décrits, tels que des Gamma, Delta ou Epsilon *Proteobacteria* et *Sphingobacter* pour les bactéries et des *Halobacteria* pour les archées, d'autres microorganismes correspondent à de nouvelles souches de bactéries (sulfato-réductrices) et d'archées (*Euryarchaeota*) non encore cultivées ni décrites [43].



**Figure 1.4.** Arbre phylogénétique universelle du monde vivant basé sur le séquençage du gène codant l'ARNr 16S. Les branches indiquées en gras correspondent aux procaryotes halophiles et halotolérants qui se développent mieux à des concentrations en sels supérieures à 100 g/l [44].

### 1.3.1 Eucaryotes halophiles

Bien que les environnements hypersalins fussent considérés comme des habitats peuplés presque exclusivement de microorganismes procaryotes et l'algue verte *Dunaliella* [45], la grande biodiversité des microorganismes eucaryotes est devenue évidente peu de temps après que les champignons soient signalés pour la première fois comme des habitants bioactifs dans les marais salants [46]. Dans ce type d'habitat où la concentration saline passe de 1 M à environ 3,5 M et dans de nombreux lacs salés, des populations denses d'algues se développent avec une grande diversité de levures et de champignons filamenteux halophiles et halotolérants [47]. Parmi ces champignons, plusieurs levures mélanisées (*Hortaea werneckii*, *Phaeotheca triangularis*, *Trimmat ostromasalinum*, *Aureobasidium pullulans*) [46] et non mélanisées (*Pichia guilliermondii*, *Debaryomyces hansenii* et *Candida parapsilosis*) ont été isolées à partir de nombreux salines et lacs salés dans le monde [48]. Parmi les champignons filamenteux, de nombreuses espèces des genres *Aspergillus* et *Penicillium* ont été isolées avec une grande fréquence [49]. Quant à l'algue verte *Dunaliella*, c'est le seul et le principal producteur primaire dans la mer morte, les lacs hypersalins et les étangs. En fait, c'est un organisme omniprésent dans les milieux riches en sels [40]. Différentes espèces du genre *Dunaliella* existent dont certaines produisent une grande quantité de  $\beta$ -carotène dans des conditions convenables [40]. Le genre *Dunaliella* regroupe des espèces halotolérantes qui tolèrent une large gamme de concentrations salines et d'autres qui supportent des concentrations en sels relativement faibles (de l'ordre 1 M pour les souches qui exigent le sel) [40].

### 1.3.2 Bactéries halophiles

Le domaine des bactéries englobe plusieurs microorganismes halophiles et halotolérants appartenant à plusieurs sous-groupes phylogénétiques : *Cyanobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes*, *Bacteroidetes*, *Thermotogae* et *Tenericutes* [50]. Les halophiles du domaine *Bacteria* sont généralement des halophiles modérés plutôt que des halophiles extrêmes [40], aérobies ou anaérobies, avec une grande diversité trophique qui inclue les chemohétérotrophes, les photohétérotrophes et/ou les photoautotrophes [44].

### 1.3.2.1 Proteobacteria

A l'exception de la classe *Beta Proteobacteria*, toutes les autres classes du phylum *Proteobacteria* comprennent les bactéries halophiles dont la plupart appartient à la famille des *Halomonadaceae*, classe *Gamma Proteobacteria* [50].

### 1.3.2.2. Firmicutes

Les membres du phylum *firmicutes* qui sont très diversifiés morphologiquement et physiologiquement sont capables de coloniser une large variété d'environnements, y compris les habitats hypersalins [50]. La famille des *Bacillaceae* est la plus importante avec 21 genres qui contiennent des espèces halophiles modérés, obligatoires [50]. En plus du genre *Alkalibacillus*, certaines espèces halophiles modérées du genre *Bacillus*, (*B. polygoni*, *B. oshimensis*, *B. aurantiacus*, *B. chagannorensis*, *B. saliphilus*) sont à la fois halophiles et alcaliphiles [50]. *Halobacillus* est le genre le plus important dans la famille des *Bacillaceae* qui inclue des microorganismes halophiles. Par exemple, dans le cas de l'espèce *Halobacillus halophilus*, les ions chlorures sont nécessaires à la croissance et aux autres processus vitaux tels que la mobilité, la synthèse des flagelles, la germination des endospores, la régulation d'une variété de protéine et le transport de la glycine betaine [51, 52, 53, 54,55]. Au sein de la classe *Clostridia*, l'ordre *Halanaerobiales* comprend deux familles, *Halanaerobiaceae* et *Halobacteroidaceae* qui contiennent toutes les deux des espèces halophiles [50].

### 1.3.2.3. Cyanobacteria

Les cyanobactéries ou les algues bleu-vert sont des contributeurs majeurs à la photosynthèse dans les environnements aquatiques [56]. Dans les milieux hypersalins, les cyanobactéries unicellulaires et filamenteuses forment des tapis microbiens [47]. La couche supérieure des tapis microbiens est constituée d'une espèce commune de cyanobactérie unicellulaire *Aphanothece halophytica* qui se lyse dans de l'eau distillée et tolère une large gamme de concentrations salines, allant de 2 à 5 M de NaCl avec un optimum de 3,5 M de NaCl [47]. Cette espèce a été décrite dans le grand lac salé Utah, la mer morte, les lacs solaires et les bassins solaires artificiels [47]. Une autre cyanobactérie planctonique *Dactylococcopsis*

*salina* a été signalée dans le grand lac salé Utah. Une variété de cyanobactéries filamenteuses se développe plus bas dans la couche verte du tapis microbien comme par exemple les deux espèces *Jaaginema neglectum* et *Pseudanabaena limnetica* dans l'ordre *Oscillatoriales* [57].

#### 1.3.2.4. Actinobacteria

Dans la classe *Actinobacteria*, on distingue quatre sous classes : *Acidimicrobidae*, *Actinobacteridae*, *Coriobacteridae*, and *Rubrobacteridae*, mais les bactéries halophiles sont seulement affiliées dans l'ordre *Actinomycetales* de la sous classe *Actinobacteridae* [50]. La plupart des actinomycètes de cet ordre sont des halophiles modérées, isolées à partir d'une grande variété d'écosystèmes salins comme les sols salins, les bassins de cristallisation salines du monde entier, le grand lac salé Utah, la mer morte, les lacs salins de la Mongolie-Intérieure et de Xinjiang, les lacs sodiques africains, les saumures profondes, les mines de sel chinoises et de nombreux lacs hypersalés [58].

Les actinomycètes halophiles extrêmes sont représentés principalement par l'espèce *Actinopolyspora halophila* de l'ordre *Actinomycetales* qui nécessite une concentration minimale en sel de 12% (p/v) pour la croissance en milieu liquide à 37°C [62] et quelques espèces de la famille *Nocardiopsaceae* (à l'exception du genre *Thermobifida*) [50].

#### 1.3.2.5 Spirochaetes

Sept espèces halophiles modérées [*Spirochaeta alkalica*, *Spirochaeta africana*, *Spirochaeta asiatica* [60], *Spirochaeta americana* [61], *Spirochaeta dissipatitropha* [62], *Spirochaeta halophila*] [63] et *Spirochaeta perfilievii* [64] sont rapportées dans le genre *Spirochaeta*. L'anaérobie facultatif *Spirochaeta halophila* a été isolé à partir des étangs de haute salinité de la rive Sinaï du golfe d'Aqaba avec un optimum de croissance de 750 mM NaCl, 200 mM MgSO<sub>4</sub> et 10 mM de CaCl<sub>2</sub> [63]. Les autres espèces halophiles qui sont des anaérobies aérotolestants (*Spirochaeta alkalica* et *Spirochaeta africana*) ou des anaérobies obligatoires (*Spirochaeta asiatica*, *Spirochaeta dissipatitropha* et *Spirochaeta americana*) sont

des espèces alcaliphiles, isolées des sédiments des lacs alcalins et nécessitent un pH supérieur à 8 pour une croissance optimale [61,65, 62] .

Cependant, *Spirochaeta perfilievii* est une espèce anaérobie, aérotoleante sulfo et thiosulfato-réductrice, non sulfato-reductrice, sulfo-oxydante, avec un optimum de croissance à 7,0-7,5 de pH (6,5-8,5) et à 2% de NaCl (0,6-6%), isolée à partir d'un tapis de soufre dans une source saline en Russie [64]. A la différence des autres espèces, *Spirochaeta alkalica* se développe dans un milieu contenant des concentrations équimolaires en Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et NaHCO<sub>3</sub> à la place du NaCl. Ces espèces halophiles modérées, dissimotrophes sont des chimioorganotrophes avec un type de métabolisme facultatif [50], caractérisé principalement par la capacité de décomposition des (poly) hydrates de carbone dissipés dans leurs milieux aquatiques [60]. Les produits de fermentation de glucose diffèrent d'une espèce à une autre dont les principaux sont l'acétate, l'éthanol et H<sub>2</sub> [60].

#### 1.3.2.6. Bacteroidetes

Ce phylum est composé de trois classes, toutes comprennent quelques espèces bactériennes halophiles.

#### 1.3.2.7. Le genre *Salinibacter*

Le genre *Salinibacter* et principalement l'espèce type *Salinibacter ruber* est le représentant le plus abondant des bactéries halophiles extrêmes dans de nombreux bassins de cristallisation saline dans le monde [66]. Cette espèce affiliée antérieurement au phylum *Bacteroidetes* a été placée dans un nouveau phylum nommé *Rhodothermaeota*, classe *Rhodothermaeota* [67]. *Salinibacter ruber* 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 200-300 g/l de sels). En fait, *Salinibacter ruber* possède de nombreux pigments rétiniens de type bacteriorubérine, et utilise le même mécanisme d'osmoadaptation « *salt-in* » que les archées halophiles aérobies [72].

#### 1.3.3. Archées halophiles

Les microorganismes les plus importants qui habitent généralement les saumures des environnements hypersalins sont les archées du phylum

*Euryarchaeota* [66], les classes *Halobacteria* majoritairement et *Methanomicrobia* (méthanogènes) pour quelques espèces [50]. Les membres de la classe des *Halobacteria* constituent un groupe phylogénétique cohérent de procaryotes exigeants pour le sel [30].

Cette classe englobe 70 genres et 260 espèces, classés dans trois ordres et six familles (Tab 1.1) : *Halobacteriales* (*Halobacteriaceae*, *Haloarculaceae*, *Halococcaceae*), *Haloferacales* (*Haloferacaceae*, *Halorubraceae*), *Natrialbales* (*Natrialbaceae*) [69,70]. Ils ont une forme bâtonnet, coccoïde, discoïde, triangulaire, carrée ou pléomorphe et requièrent des concentrations salines supérieures ou égale à 190 g/l et ne peuvent croître en dessous de 100 g/l [47]. Ils sont pour la plupart des microorganismes aérobies, chimio hétérotrophes qui préfèrent des valeurs de pH proches du neutre et qui croissent sur des milieux complexes contenant des acides aminés et l'extrait de levure comme source de carbone et d'énergie [66]. Cependant, il existe une diversité métabolique considérable au sein du groupe [71]. En effet, la croissance de nombreuses espèces est favorisée par des sucres simples ou acides organiques, tandis que d'autres ne se développent que dans des milieux pauvres en nutriment comme le cas du milieu de culture de l'espèce *Haloquadratum walsbyi* [66]. De plus, presque tous les membres de cette classe sont colorés en rouges à cause des pigments caroténoïdes ( $\alpha$ -bactérioruberine et ses dérivées) et éventuellement la bactériorhodopsine et d'autres pigments rétinien [66]. Certains membres de cette classe peuvent également croître en anaérobiose en utilisant le nitrate comme accepteur final d'électrons [72] et/ou en réduisant le diméthylsulfoxyde, triméthylamine-N-oxide ou fumarate en diméthylsulfide, triméthylamine et succinate, respectivement [66]. Quant à la classe *Methanomicrobia*, le plus grand nombre de représentants halophiles se trouve dans la famille des *Methanosarcinaceae* [73], dans trois genres : *Methanohalobium*, *Methanohalophilus* et *Methanosalsum*. L'espèce méthanogène la plus halophile est *Methanohalobium evestigatum* Z-7303, isolée du lagon hypersalin Syvash en Ukraine, avec une croissance optimale à 250 g/l de NaCl [74]. Les archées méthanogènes halophiles se trouvent également dans la famille des *Methanocalculaceae*, genre *Methanocalculus* qui regroupe six espèces halotolérantes [73]. L'espèce anaérobie obligatoire *Methanocalculus natronophilus* isolée du lac sodique hypersalin en SW-Sibérie est une alcaliphile obligatoire qui tolère jusqu'à 195 g/l de sels [75].

**Tableau 1.1.** Classification phylogénétique des *Halobacteria* selon le service de la liste des noms procaryotes avec nomenclature permanente [76]

Phylum	<i>Euryarchaeota</i>					
Classe	<i>Halobacteria</i>					
Ordre	<i>Halofercales</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>
Genre	<i>Halalkaliarchaeum</i>	<i>Halegenticoccus</i>	<i>Haladaptatus</i>	<i>Halococcus</i>	<i>Halapricum</i>	<i>Halobiforma</i>
	<i>Halalkalirubrum</i>	<i>Halobellus</i>	<i>Halakalicoccus</i>		<i>Haloarcula</i>	<i>Halopiger</i>
	<i>Halobaculum</i>	<i>Haloferax</i>	<i>Halanaeroarchaeum</i>		<i>Halococcoides</i>	<i>Halostagnicola</i>
	<i>Halobium</i>	<i>Halogeometricum</i>	<i>Halarchaeum</i>		<i>Halomicroharcula</i>	<i>Haloterrigena</i>
	<i>Halohasta</i>	<i>Halogranum</i>	<i>Haloarchaeobius</i>		<i>Haloglomus</i>	<i>Halovivax</i>
	<i>Halolamina</i>	<i>Haloparvum</i>	<i>Halobacterium</i>		<i>Halomicrobium</i>	<i>Natarchaeobaculum</i>
	<i>Halonotius</i>	<i>Halopelagius</i>	<i>Halocalculus</i>		<i>Halorhabdus</i>	<i>Natrarchaeobius</i>
	<i>Halopenitus</i>	<i>Haloplanus</i>	<i>Halocatena</i>		<i>Halorientalis</i>	<i>Natrialba</i>
	<i>Halorubrobacterium</i>	<i>Haloprofundus</i>	<i>Halodesulfuarchaeum</i>		<i>Halosegnis</i>	<i>Natrinema</i>
	<i>Halorubrum</i>	<i>Haloquadratum</i>	<i>Halomarina</i>		<i>Halosimplex</i>	<i>Natronobacterium</i>
	<i>Salinigranum</i>	<i>Halosarcina</i>	<i>Halomicrococcus</i>		<i>Salinirussus</i>	<i>Natronobiforma</i>
			<i>Halorubellus</i>			<i>Natronococcus</i>
			<i>Halorussus</i>			<i>Natronolimnobiobius</i>
			<i>Halostella</i>			<i>Natronolimnohabitans</i>
			<i>Halovarius</i>			<i>Natronorubrum</i>
			<i>Halolovenus</i>			<i>Salinaadaptatus</i>
			<i>Natribaculum</i>			<i>Salinaarchaeum</i>
			<i>Natronoarchaeum</i>			<i>Saliphagus</i>
			<i>Natronomonas</i>			
			<i>Salarchaeum</i>			
		<i>Salinirubrum</i>				
		<i>Salinibaculum</i>				
		<i>Salinirubellus</i>				

#### 1.4. Stratégies d'adaptation des procaryotes halophiles au stress hyper-osmotique

Les microorganismes des environnements hypersalins montrent une extraordinaire capacité d'adaptation aux conditions physicochimiques drastiques régnant dans ce type de milieux extrêmes tant en termes de salinité, température, pH et de pression hydrostatique [14]. En termes de salinité, pour faire face au stress hyper-osmotique (osmoadaptation) qui se traduit par une faible activité d'eau ( $a_w$ ) du milieu environnant, les microorganismes des milieux hypersalins ont développé des mécanismes d'osmorégulation pour garantir l'équilibre osmotique entre le milieu intracellulaire et extracellulaire tout en maintenant de l'eau à l'intérieur des cellules pour éviter la plasmolyse induite par la forte pression osmotique du milieu extérieur [10]. En fait, ces mécanismes d'osmorégulation qui reposent sur l'accumulation de petites molécules (osmolytes) de nature organique ou inorganique dans leur cytoplasme [77] permettent le maintien de la pression de turgescence, le volume cellulaire et la concentration ionique intracellulaire [10]. Selon la nature de ces petites molécules, deux principales stratégies ont été développées par les microorganismes colonisant les biotopes hypersalins :

##### 1.4.1. Accumulation des sels " salt-in" ou "high salt-in"

Ce mécanisme d'osmorégulation implique l'accumulation de fortes concentrations d'ions inorganiques dans le cytoplasme [10], principalement les ions potassium et chlorure et l'expulsion des ions  $\text{Na}^+$  qui sont nocifs au fonctionnement des cellules [16].

Selon Oren [78], la source d'énergie primaire qui sert de force motrice pour la formation d'un gradient d'ions est le gradient électrochimique de protons à travers la membrane qui peut être généré par le transport d'électrons de la chaîne respiratoire au cours de la croissance aérobie ou anaérobie, par l'hydrolyse de l'ATP par une ATPase membranaire lors de la fermentation, et/ou par l'action de la pompe à proton pilotée par la lumière absorbée par la bactériorhodopsine (Fig.1.5). Le gradient protons fournit l'énergie nécessaire à l'export des ions  $\text{Na}^+$  via l'antiporteur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  nommé protéines NhaC [79]. L'une des trois copies *nhaC* dans le génome d'*Halobacterium* NRC-1 est localisé sur le mégaplasmide pNRC 2000 [79].

En plus de sa fonction dans le maintien de concentrations intracellulaires faibles en ions  $\text{Na}^+$ , l'antiporteur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  joue un rôle important dans l'homéostasie du pH

intracellulaire, qui est maintenu approximativement neutre (7,2) chez *Halobacterium salinarum* [80]. Par conséquent, l'activité de l'antiporteur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  est donc régulée à la fois par le gradient pH et le potentiel membranaire [81].

Généralement, les ions  $\text{K}^+$  sont probablement importés dans la cellule passivement à travers un système uniporteur en réponse au potentiel membranaire [78]. Cependant, de nombreux systèmes de transport actif des ions  $\text{K}^+$  sont détectés dans le génome *Halobacterium sp.*NRC-1 [79] et *Haloferax volcanii* [78]. Il faut noter que le contenu intracellulaire en potassium varie en fonction de la salinité du milieu et se rapproche presque de la concentration extracellulaire (sodium) pour assurer que le cytoplasme soit au moins isoosmotique avec le milieu environnant [82]. A titre d'exemple, à des salinités extracellulaires élevées de l'ordre de 4 M en ions  $\text{Na}^+$ , la concentration intracellulaire en potassium peut atteindre jusqu'à 5 M chez *Halobacterium* [83]. Les ions chlorures sont pompés vers l'intérieur des cellules par cotransport avec les ions  $\text{Na}^+$  et/ou la pompe à chlorures primaire pilotée par la lumière absorbée par l'halorhodopsine [84]. Par conséquent, les *Haloarchaea* doivent non seulement supporter des osmolarités moyennes extrêmement élevées, mais aussi des conditions intracellulaires extrêmes [82].

Bien que le mode d'osmoadaptation « salt-in » coûte relativement peu d'énergie, ce mécanisme est réservé à un nombre limité d'halophiles appartenant à la classe des *Haloarchaea* (*Halobacteriales*, *Haloferacales* et *Natrialbales*), les bactéries du genre *Salinibacter* et d'autres bactéries anaérobies de l'ordre Halanaerobiales [40].

#### 1.4.2 Synthèse et accumulation de solutés compatibles "Salt-out" ou "low salt-in"

L'accumulation de solutés compatibles organiques est la stratégie d'osmoadaptation fondamentale utilisée par la plupart des microorganismes, y compris les algues eucaryotes (*Dunaleilla*), les bactéries halophiles et halotolérantes (à l'exception des Halanaerobiales), et les archées méthanogènes [84]. Les principaux composés qui agissent comme solutés compatibles est représentée dans la figure 1.6 et inclue généralement les acides aminés, les sucres et les polyols qui ne possèdent pas de charge au pH physiologique et n'interfèrent pas avec les processus intracellulaires [85]. L'exemple le plus fréquent des polyols est le glycérol qui est accumulé seulement par certains eucaryotes comme l'algue halophile *Dunaleilla* et certains champignons [86,78]. Cependant, la plupart des bactéries halophiles et halotolérantes accumulent les composés zwiterions comme la glycine betaine

(cyanobactéries halophiles, bactéries photosynthétiques anoxygéniques et les archées méthanogènes halophiles), et l'ectoïne (plusieurs protéobactéries hétérotrophes et phototrophes) [85,86]. L'accumulation de glycosylglycérol, de sucrose et de tréhalose est largement répandue chez les cyanobactéries [87].

Par définition, ces solutés compatibles sont des composés organiques, polaires, de faible poids moléculaire, très solubles dans l'eau et dont la plupart ne possèdent pas de charge nette (zwitterions ou composés non chargés) [85]. Ils sont dits compatibles car même accumulés en forte concentration dans le cytoplasme, ils n'affectent pas la structure tridimensionnelle des protéines, ni les réactions enzymatiques [88]. Dans une large mesure, les sels sont exclus du cytoplasme et les solutés organiques sont synthétisés ou accumulés à partir du milieu extérieur pour garantir une balance osmotique en permettant aux cellules de tolérer facilement des variations de concentrations salines [89].

En effet, la concentration intracellulaire en solutés organiques compatibles dépend de la concentration saline extracellulaire [16]. Dans le cas où il y a une baisse de la salinité du milieu extérieur, les cellules qui empruntent la stratégie « salt-out » vont diminuer la synthèse endogène de ces solutés organiques ou arrêter leur import du milieu externe [90]. Cette flexibilité d'adaptation à une large gamme de concentrations salines explique pourquoi ce mécanisme d'adaptation est plus utilisé par les halotolérant plutôt que par les organismes halophiles extrêmes [40].

A la différence de la première stratégie, l'accumulation de concentrations élevées de tels solutés compatible n'exige pas l'adaptation des protéines cellulaires, mais coûte très chère énergétiquement par rapport au premier mécanisme [84]. En outre, les cellules qui synthétisent les solutés organiques compatibles doivent également compenser la perte de ces solutés par leur membrane semi-perméable via des protéines de transport membranaires. Ce dernier se fait contre le gradient de concentration mais il est aussi énergétiquement coûteux [78].

En fin, la concentration élevée de solutés organiques dans le cytoplasme n'atténue pas la nécessité d'une activité élevée de l'antiporteur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  pour empêcher l'infiltration des ions  $\text{Na}^+$ , soit en raison de la perméabilité passive de la membrane, soit du co-transport avec les acides aminés [78]. Il faut noter que la plupart des cellules n'utilisent pas exclusivement un seul soluté organique pour faire face aux conditions environnementales défavorable mais plutôt un cocktail de solutés compatibles qui agissent ensemble pour garantir une balance osmotique [91]. De plus, certains

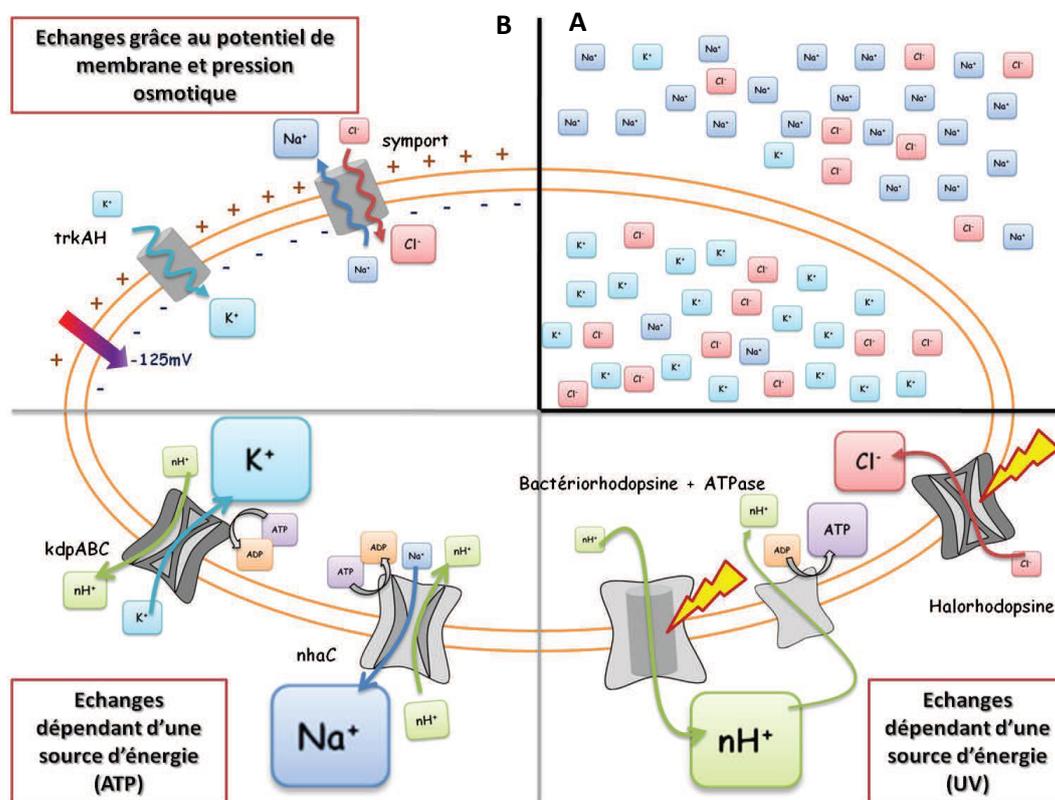
organismes combinent les deux stratégies, par exemple chez certaines archées appartenant aux ordres Halobacteriales et Natrionales (*Natrialba magadi*, *Natronobacterium gregoryi*, *Natronococcus occultus* et *Natronomonas pharaonis*), un composé osmoprotecteur organique appelé le 2-sulfotrèhalose a été détecté en plus de l'accumulation de KCl [40,16]. La production des exopolysaccharides (EPS) est un autre mécanisme utilisé par la plupart des archées halophiles pour résister aux fortes concentrations salines des milieux hypersalins. Ce sont des glucides de haut poids moléculaire excrétés dans le milieu environnant. Ils sont les principaux constituants des polymères extracellulaires retrouvés à la surface des archées mais aussi de certaines bactéries. Ces composés protègent les microorganismes contre les diverses agressions du milieu telles que la salinité mais également les rayonnements UV, les baisses températures, la dessiccation et la prédation [92].

#### 1.4.3 Adaptation des protéines halophiles au sel

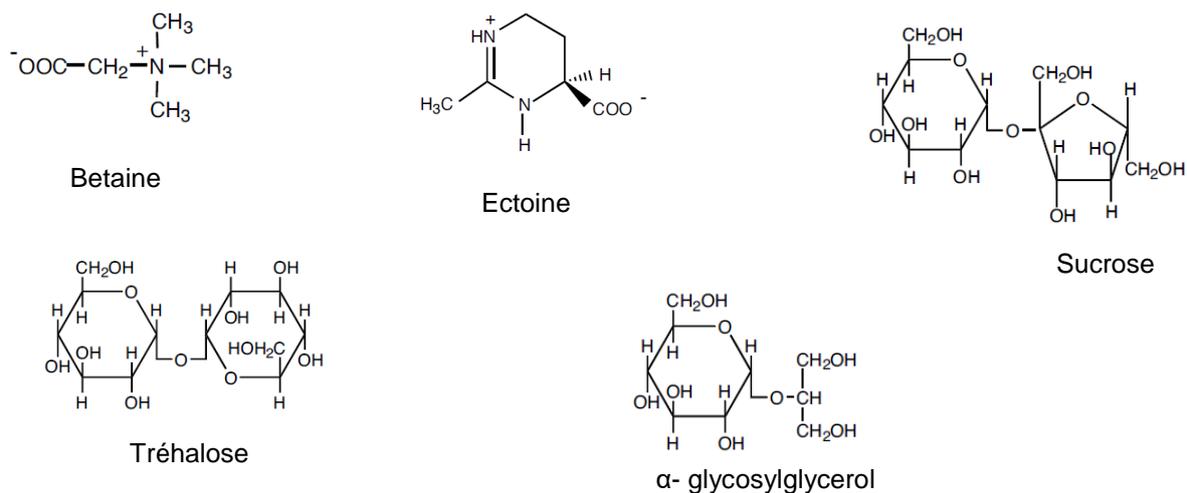
Comme il est indiqué ci-dessous le mécanisme *cytoplasm salt-in* permet l'accumulation de fortes concentrations en KCl relativement similaires aux concentrations extracellulaires en NaCl pour maintenir l'équilibre osmotique nécessaire à la survie des cellules [16]. Cependant, cette stratégie d'osmoadaptation nécessite une adaptation structurale de la machinerie enzymatique et protéique intracellulaire pour pouvoir supporter de fortes concentrations intracellulaires en ions. En effet, les protéines doivent maintenir leur conformation et leur activité appropriées à des concentrations salines proche de la saturation [88].

Les études réalisées sur les mécanismes d'adaptation des protéines halophiles lors de la stratégie *salt-in* montrent que les cellules disposent d'un protéome très acide et moins hydrophobe que les microorganismes non halophiles et la plupart des protéines se dénaturent lorsqu'elles sont mises en solution de faible osmolarité. Ainsi, de tels microorganismes ne peuvent généralement pas survivre dans des milieux à faible teneur en sels [88]. Ces nombreuses substitutions d'acides aminés qui impliquent l'enrichissement en acides aminés acides (acide glutamique et acide aspartique) et en thréonine par rapport aux résidus basiques (lysine et arginine) [93,94] sont illustrées dans l'étude comparative entre la structure tridimensionnelle de l'enzyme malate deshydrogénase halophile (hMDH) chez *Haloarcula marismortui* et celle de son homologue *Bacillus anthracis*. Bien que leurs structures tridimensionnelles soit superposable (Fig.1.7), l'étude de la représentation des surfaces de ces deux

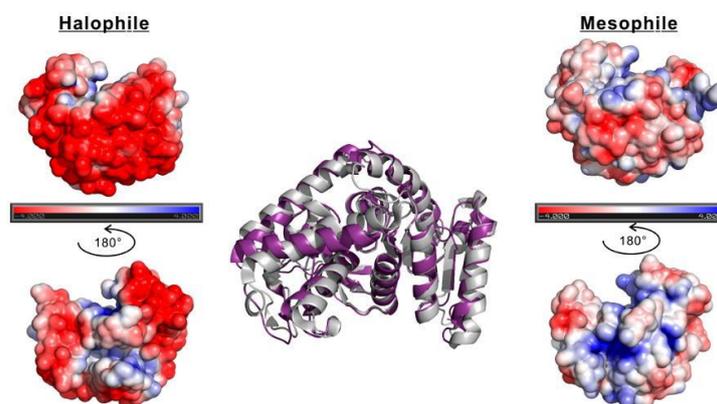
enzymes montre une forte proportion d'acides aminés acides (en rouge) et une faible quantité d'acides aminés basique (en bleu) [95].



**Figure 1.5.** Représentation schématique des transporteurs membranaires de *Halobacterium salinarum* permettant le contrôle de l'osmolarité intracellulaire. **A.** Représentation schématique de la localisation intracellulaire et extracellulaire des ions Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup>. **B.** Transporteurs dont l'action dépend de la pression osmotique et du potentiel membranaire. **C.** Transporteurs dont l'action dépend d'une source d'énergie chimique de type ATP. **D.** Transporteurs dont l'action dépend d'une source d'énergie de type physique UV [96].



**Figure 1.6.** Principaux solutés compatibles organiques chez les procaryotes halophiles et halotolérants [97]



**Figure 1.7.** Comparaison de la structure tridimensionnelle de la malate déshydrogénase d'une archée halophile *Haloarcua marismortui* avec celle de la malate déshydrogénase d'une bactérie mésophile *Bacillus anthracis*. L'enzyme halophile est représentée en violet tandis que l'enzyme mésophile est représentée en gris dans la structure tridimensionnelle (centre de la figure). Dans la représentation des surfaces, les acides aminés acides sont colorés en rouge tandis que les acides aminés basiques sont colorés en bleu [95].

L'intérêt attribué au protéome acide réside dans le fait qu'à pH physiologique, les résidus acides et principalement l'acide glutamique, sont capable d'attirer plus de molécules d'eau que d'autres résidus ce qui peut contribuer à la formation d'une sphère d'hydratation qui protège les enzymes de l'agrégation en fortes concentrations salines. De plus, ces derniers participent à l'établissement de ponts inhabituels de sels qui entraînent la stabilisation de la conformation native de la protéine [98]. Par conséquent, l'effet global du sel dans le cytoplasme est donc la stabilisation de la structure en resserrant la conformation repliée et en renforçant les interactions hydrophobes [99].

## 1.5 Application biotechnologiques des microorganismes halophiles

Les connaissances de base accumulées sur les propriétés des *Archaea*, *Bacteria* et *Eukarya* halophiles ont conduit au développement de certaines d'application biotechnologiques intéressantes qui vont de l'utilisation directe de leurs cellules à l'utilisation de leur biomolécules purifiées :

### 1.5.1 Bioplastiques

Les polyhydroxyalkanoates (PHA) sont des polymères biosourcés (obtenues à partir d'une matière première renouvelable) et biodégradables, avec zéro déchets (ils se dégradent naturellement sous l'action des microorganismes, après usage) qui peuvent être utilisés pour remplacer les plastiques [37]. Il s'agit de polyesters linéaires synthétisés et accumulés sous forme d'inclusions microscopiques dans le cytoplasme de nombreux microorganismes qui possèdent l'aptitude de mettre en place un mécanisme de survie lorsqu'ils sont soumis à une carence en certains nutriments ou en présence d'un excès de carbone dans leur milieu nutritif [100]. En raison de leurs excellentes propriétés barrières aux gaz comme l'oxygène ou le dioxyde de carbone, de leur compatibilité et de leurs propriétés ajustables, les PHA peuvent être utilisés dans les matériaux d'emballage, de matériaux médicaux et d'implants ou encore comme vecteurs de principe actifs [100]. Plus de 300 espèces bactériennes, y compris plusieurs bactéries halophiles (*Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Cobetia*, *Kushneria*, *Marinobacter* et *Planomicrobium*) et archées appartenant aux genres *Haloferax*,

*Haloarcula*, *Natrialba*, *Haloterrigena*, *Halococcus* et *Halobacterium* sont capable de produire différents type de PHA [101,102].

En effet, L'utilisation des halophiles comme source prometteuse de PHA apporte de nombreux avantages découlant notamment de la robustesse accrue du procédé contre la contamination par la microflore mésophiles, de la facilité et du coût réduit du processus de récupération du PHA (lyse par l'eau de robinet) et de leur capacité à utiliser un large éventail de substrats bon marchés [103].

### 1.5.2 Exopolysaccharides (EPS)

De nombreuses bactéries halophiles produisent des exopolysaccharides (EPS) de grande diversité structurale et fonctionnelle comme moyen de protection et d'adaptation aux conditions hostiles des milieux hypersalins [104]. En fait, les EPS sont des polymères glucidiques de poids moléculaire élevé, composés principalement de monosaccharides et de leurs dérivés [104]. Il convient de noter que la production des EPS a été étudiée surtout chez les bactéries que les archées halophiles [92]. Parmi les bactéries halophiles qui sont des principaux producteurs d'EPS, on peut citer les espèces appartenant à la famille des *Halomonadaceae* et des *Alteromonadaceae* et la cyanobactérie halophile *Aphanotece halophytica* [105].

Cependant, plusieurs souches productrices d'EPS parmi les genres d'archées halophiles ont été décrites (*Haloferax*, *Haloarcula*, *Halococcus*, *Natronococcus* et *Halobacterium* [92]. La plupart des EPS produits par les bactéries halophiles sont des hétéropolysaccharides, composés généralement de mannose et de glucose [106]. La grande diversité chimique et structurale des EPS les rendent adaptés à diverses applications dans le domaine industriel, à savoir l'industrie alimentaire, pharmaceutique, biomédicale, cosmétique et dans la bioremédiation et le traitement des eaux usées [106]. Ils peuvent être utilisés comme agents gélifiants, stabilisants, émulsifiants et viscosifiants [107,108,109]. De plus, certains EPS halophiles possèdent des effets bénéfiques sur la santé tels que des propriétés antioxydantes, anticancéreuses et anti-cytotoxiques [92, 110, 111,112].

### 1.5.3 Enzymes hydrolytiques

Malgré le nombre intensif des projets de recherche sur l'application et l'exploitation biotechnologique des enzymes hydrolytiques dérivées des microorganismes halophiles, il est évident que peu d'enzymes halophiles ont trouvé des applications biotechnologiques, par rapport aux autres enzymes extrêmophiles [113]. De plus, L'intérêt biotechnologique de ces enzymes a été mieux étudié chez les bactéries halophiles que leurs homologues archées [114]. Il s'agit essentiellement des enzymes produites par des microorganismes haloalcaliphiles et /ou thermotolérants [115] et utilisés généralement dans la fabrication des textiles, l'industrie des détergents à lessive et la transformation des aliments (notamment celle des céréales et de l'amidon) [116,117]. A titre d'exemple, les enzymes utilisées dans les produits de nettoyage doivent être compatibles avec les pratiques de la lessive, à savoir une alcalinité élevée, des températures élevées et l'utilisation d'eau de Javel [113]. Plusieurs particularité rendent les halophiles, notamment les archées, la source la plus probable de telles enzymes hydrolytiques, à savoir leur stabilité dans des concentrations élevées en sels, des températures relativement importantes et de pH extrême, ce qui réduit fortement les risques de contamination au cours des processus industriels [118]. En contrepartie, il faut noter que l'exigence de fortes concentrations en sels pour l'activité de certaines protéines et enzymes halophiles peut compliquer leur manipulation et purification [37].

D'une manière générale, malgré toutes ces propriétés pour sélectionner l'enzyme de l'un ou de l'autre microorganisme, aucune enzyme n'est utilisée telle quelle. Toutes les molécules d'enzymes ont été fortement modifiées par l'ingénierie de protéines pour répondre à des applications spécifiques [113]. Des exemples d'enzymes halophiles et leur tolérance à différentes concentrations de sels sont représentés dans le tableau 1.2.

**Tableau 1.2.** Enzymes produites par les microorganismes halophiles [44]

Enzyme	Organisme	NaCl (% p/v)
Amylase	<i>Halobacillus</i> sp	5
	<i>Amphibacillus</i> sp. NM-Ra 2	0-25
α- Amylase	<i>Haloferax mediterranei</i>	10-23
	<i>Haloferax orenii</i>	5
	<i>Bacillus</i> sp. TSCVKK	10
	<i>Nesterenkonia</i> sp. strain F	0-17
Xylanase	<i>Oceanospirillum</i> CL8	23
	<i>Chromohalobacter</i> sp	20
	<i>Gracilibacillus</i> sp. TSCPVG	3,5
β-Xylanase, β- Xylosidase	<i>Halorhabdus utahensis</i>	5-15
Protéase CPI	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. CP76	7,5
Aldéhyde déshydrogénase	<i>Halomonas salina</i> AS 11	5
2-Hydroxy acide déshydrogénase	<i>Haloferax mediterranei</i>	23
Endo-1,4-β-Xylanase	<i>Nestrenkononia</i> sp.	2,5
Endo-β-Xylanase	<i>Glaciecola mesophila</i>	15
Amylopullulanase	<i>Halorubrum</i> sp. Ha 25	3-4
DNase	<i>Halobacillus</i> sp.	23
Alcool déshydrogénase	<i>Haloferax volcanii</i> H1895	12
Protéase	<i>Halobacterium</i> sp. HP25	30
	<i>Alkalibacillus</i> sp. NM-Fa4	6
Cellulase	<i>Gracilibacillus</i> sp.	7,5-17,5
Esterase	<i>Bacillus cereus</i> AGP-03	3-11
Cyclodextrin glycosyl transférase	<i>Haloferax mediterranei</i>	23

#### 1.5.4 Solutés compatibles

La plupart des microorganismes halophiles et halotolérantes (à l'exception des *Halobacteria* et les *Halanaerobiales*) ont la capacité de synthétiser ou accumuler dans leur cytoplasme des solutés compatibles, pour faire face à l'osmolarité élevée du milieu environnant [97]. En raison de leurs propriétés particulières, les solutés compatibles contribuent d'une manière significative dans différentes applications biotechnologiques. Certains solutés compatibles, en particulier la glycine, la betaine et l'ectoïne peuvent être utilisés comme protecteurs contre le stress causé par la salinité élevée, la dénaturation thermique et la congélation ainsi comme stabilisateurs

d'enzymes, d'acides nucléiques, de membranes et de cellules entières [119]. De plus, l'ajout de l'ectoïne dans les préparations cosmétiques a été testé pour augmenter l'activité hydratante et protectrice contre les rayons UV des crèmes dermatologiques [97].

#### 1.5.5 $\beta$ -Carotène

L'algue *Dunaleilla salina*, produit une grande quantité de pigment  $\beta$ -Carotène pour se protéger des radiations solaires. Ce pigment est utilisé en tant que antioxydant, source de provitamine A ou encore colorant alimentaire [120].

#### 1.5.6. Halocine

Les halocines sont un groupe d'antibiotiques peptidiques potentiellement intéressant qui inhibent les haloarchées phylogénétiquement liées [13]. Les peptides antimicrobiens décrits à ce jour dans les milieux hypersalins sont exclusivement produits par les archées [121].

### 1.6 Techniques d'étude de la diversité microbienne

L'un des plus grands enjeux en écologie microbienne est de déterminer la diversité des populations microbiennes 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 [122].

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.

#### 1.6.1 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 [123]. 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.) [124]. Cependant, ces méthodes présentent l'inconvénient majeur d'illustrer une faible proportion des communautés microbiennes présentes dans un écosystème donné [125]. En effet, la fraction cultivable dans les conditions du laboratoire est estimée à 0,1-10% [126]. De plus, l'approche culturale favorise des espèces par rapport aux autres en fonction des conditions de la culture microbienne [127].

### 1.6.2 Approches moléculaires

L'utilisation de méthodes moléculaires pour étudier la biodiversité procaryote est devenue très populaire dans les dernières 25 années [128]. Elles permettent l'étude moléculaire d'une population microbienne et reposent principalement sur l'amplification directe du gène codant l'ARNr 16S par PCR suivie par séquençage [129]. Ces techniques qui sont utilisées pour comparer, caractériser des populations ou mettre en évidence certains genres, espèces ou souches dans un échantillon [130] ont montré que les microorganismes cultivés sont généralement différents de ceux qui dominent dans le milieu naturel [131].

Les techniques d'empreinte basées sur la PCR donnent une résolution plus élevée et fournissent des informations sur les modifications de la structure communautaire à l'échelle temporelle et spatiale. Elles génèrent des bandes par électrophorèse sur gel, et dans des meilleurs cas, chaque bande se rapporte à un seul taxon [132]. L'ensemble des techniques moléculaires sont résumées dans le tableau 1.4.

### 1.6.3 Approche métagénomique

La métagénomique de la technologie NGS apporte des réponses satisfaisantes aux questions de l'écologie microbienne [133]. Avec l'évolution de ces techniques, les approches métagénomiques sont désormais de plus en plus utilisées afin d'étudier l'ensemble d'une communauté microbienne au sein d'un environnement donné. 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 [134].

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) [135], 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 [135].

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 [136], 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 [137]. 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 [138].

#### 1.6.4 Autres approches

Des techniques de marquage comme les études avec des isotopes stables (Stable Isotope Probing, SIP) reposent sur l'utilisation de substrat marqué au  $^{13}\text{C}$  pour déterminer les microorganismes présent dans une communauté qui utilisent activement un substrat marqué au  $^{13}\text{C}$  et qui permet de faire le lien entre la caractérisation phylogénétique et l'activité métabolique à l'échelle d'une cellule microbienne [139]. 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 [140]. 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). 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 [141].

**Tableau 1.4 :** Caractéristiques des techniques de biologie moléculaire couramment utilisées en écologie microbienne pour l'étude de la biodiversité microbienne [142]

Méthodes	Principes	Avantages	Inconvénients
DGGE/ TGGE	Des fragments ayant presque la même longueur mais qui diffèrent par un nucléotide peuvent être séparés par électrophorèse sur un gradient dénaturant chimique (DGGE) ou thermique (TGGE) et la séparation est fonction de la température de fusion de chaque fragment.	- Etude de la structure de la communauté bactérienne d'un environnement donné. -Elle peut être semi-quantitative. Selon le besoin, des bandes peuvent être séquencées pour identification taxonomique. -Plusieurs échantillons peuvent être comparés	- Nécessité d'une mise au point préalable à l'échelle de l'extraction d'ADN ou ARN, de la PCR mais aussi du gradient de dénaturation. - Co-migration de plusieurs bandes qui entraîne une sous-estimation de la diversité. -Formation de bandes chimériques qui induisent une surestimation de la diversité. - La taille de fragment à amplifier est limitée.
T-RFLP (Terminal-Restriction fragment length polymorphism)	Digestion de fragments d'ADN double-brin par des enzymes de restriction et séparation par électrophorèse en gel d'agarose ou de polyacrylamide	- Détection d'espèces rares d'une communauté. - Méthode semi-quantitative (T-RFLP). -Méthode reproductible	De nombreuses enzymes de restriction doivent être utilisées pour avoir une résolution maximale. Technique très coûteuse
ARISA/ RISA (Ribosomal intergenic spacer analysis)	Cette méthode est basée sur l'analyse du polymorphisme de l'espace intergénique en sous-unités 16S et 23S de l'ARNr. Les fragments amplifiés sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose.	C'est une méthode automatique qui ne nécessite pas une mise au point préalable.	Cette méthode ne renseigne pas sur la richesse spécifique et ne permet pas l'identification des espèces présentes.
SSCP (Single strand conformation polymorphism)	Séparation de fragments d'ADN simple-brin sur gel d'acrylamide ou par électrophorèse sur capillaire. Cette méthode est basée sur le principe que les ADN simple-brin possèdent une conformation tridimensionnelle déterminée par les interactions intramoléculaires qui affectent la mobilité électrophorétique à faible température	Bonne résolution - La séparation par capillaire permet l'identification par comparaison des pics obtenus à des pics d'espèces connues. -Méthode reproductible	- La taille du fragment à amplifier et à séparer est limitée. Elle doit être courte pour une bonne résolution. -Co-migration de plusieurs bandes

# **Chapitre 2**

## **Matériel et méthodes**

## Chapitre 2 : MATERIEL ET METHODES

Ce travail de recherche a été réalisé au niveau de plusieurs laboratoires à savoir :

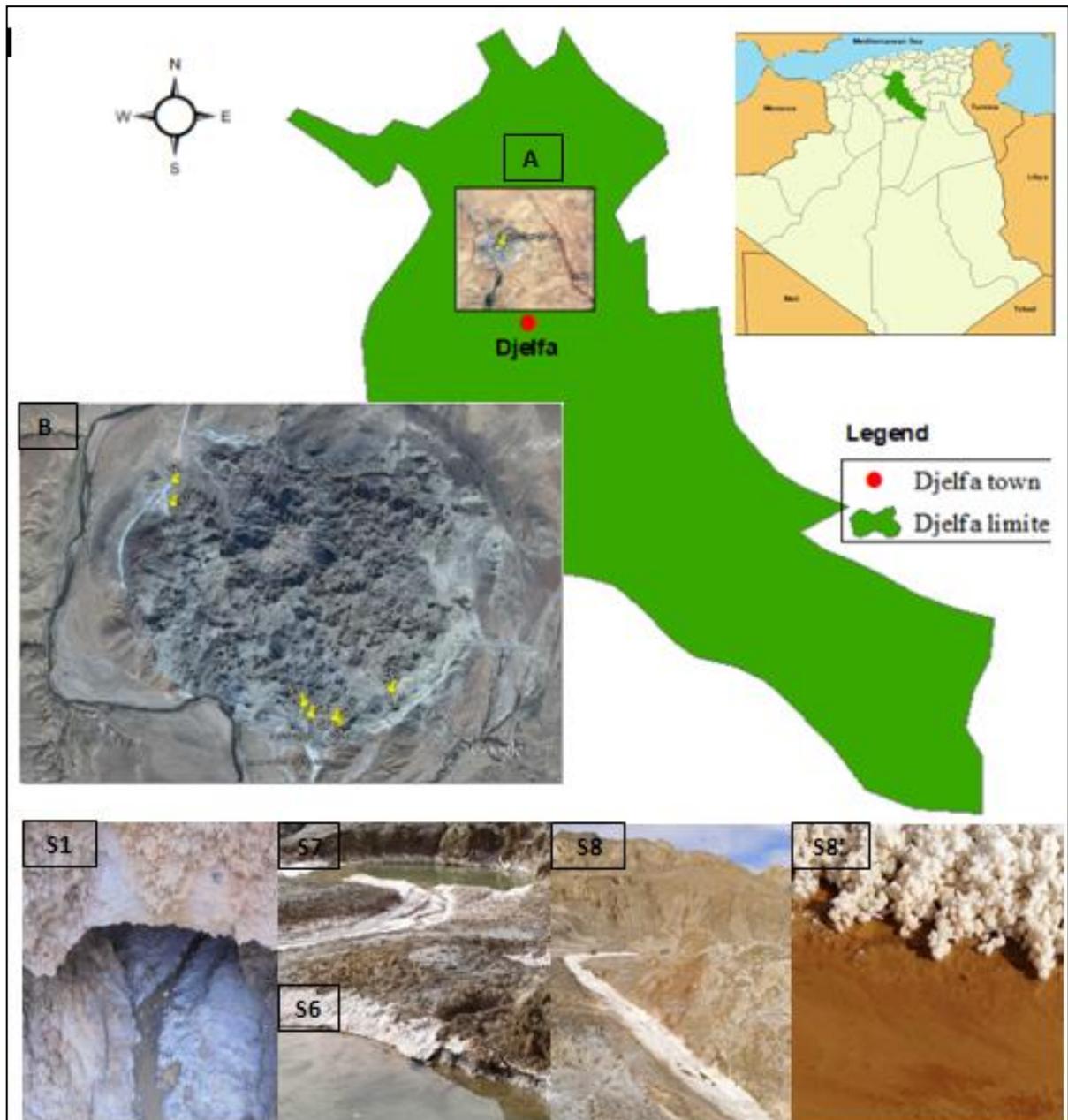
- ✓ Le laboratoire de l'Algérienne des eaux (ADE) de la wilaya de Tissemsilt,
- ✓ Le laboratoire de l'institut de biologie (IBIOL) de l'académie roumaine à Bucarest, en Roumanie.
- ✓ Le laboratoire pédagogique de l'université de Djelfa.

### 2.1 Description du site d'échantillonnage « Rocher de sel »

#### 2.1.1 Localisation géographique

Le rocher de sel nommé Hadjr El Melh se situe dans le massif Ouled Nail à 25 Km au nord de la ville de Djelfa, commune d'Ain Maâbed (latitude : 34°77' 39.04" Nord et longitude : 3°17' 37.89" Est, altitude de 1083 m) (Fig.2.1). Selon Gautier [143], Il s'agit d'un pointement triasique qui culmine 110 m de hauteur. Il est constitué essentiellement de sel gemme, de boues salées et de gypse. Ce site salifère est dépourvu de végétation, sauf quelques touffes d'alfa et quelques arbustes de tamaris. Dans le rocher de sel entier, et tout particulièrement dans la région des grandes falaises abruptes, il y a plusieurs vallées contenant des cours d'eau permanents ou temporaires qui réapparaissent après une longue circulation souterraine des eaux de pluie qui s'engouffrent après un court ruissellement dans les trous qui criblent la face de la montagne. Il y a aussi des avens allongés au fond des quels se trouvent des tronçons de la rivière Oued El Malah qui longe ce site de l'est à l'ouest.

**Figure 2.1.** Localisation de la zone d'étude et des sites d'échantillonnage. **A.** Image satellitaire de la zone d'étude "Hadjr El Melh" au Nord de la commune



Djelfa. **B.** Image satellitaires des quelques sites d'échantillonnage du rocher de sel "Hadjr El Melh". **S1** (34, 83571° N, 3, 08809°E). **S6, S7** et **S8** (34, 83038°N, 3, 09513°E). **C.** L'eau des différents échantillons est saturée en sel qui forme une croûte blanche dans des conditions d'évaporation solaire et de sécheresse.

### 2.1.2 Echantillonnage

Les saumures ont été prélevés durant la période estivale de l'année 2015 à partir des cours d'eau temporaires et permanents du rocher de sel (Fig. 2.1) et collectés dans des flacons stériles de 500 ml puis acheminés au laboratoire dans des glacières. Chaque échantillon a été prélevé en duplicata : l'un pour l'analyse physico-chimique, l'autre pour l'isolement des souches halophiles. L'analyse métagénomique concerne uniquement les cours d'eau permanents du rocher de sel (S4, S6, S7 et S8). Le choix des points de prélèvement a été effectué dans les différents cours d'eau de la région d'étude.

## 2.2 Analyses physico-chimiques des saumures du rocher de sel "Hadjr El Melh"

### 2.2.1 Etape pré-analytique

En raison de la turbidité significative des échantillons d'eau prélevés qui pourrait fausser les résultats analytiques par le manque d'homogénéité du prélèvement même après remise en suspension, par la difficulté des analyses microbiologiques et des mesures effectuées par spectrophotométrie, par gravimétrie...etc, il est nécessaire de séparer les matières en suspension par filtration à travers du papier Whatman™ [144].

Les échantillons de saumures préfiltrés ont fait l'objet d'une analyse physico-chimique qui comporte la mesure du pH, la détermination de la concentration en sel total et de la composition ionique, principalement en cations divalents ( $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$ ). Ces paramètres sont importants à déterminer car ce sont les principaux facteurs qui déterminent la distribution des microorganismes halophiles dans les environnements hypersalins [42].

### 2.2.2 Mesure du pH

La mesure de pH a été effectuée à l'aide d'un pH mètre de marque Hach company sension 156.

### 2.2.3 Mesure de la conductivité électrique

La conductivité donne une indication rapide sur le degré de minéralisation d'une eau [144]. Elle a été mesurée par un conductimètre de type Hach company sension 156 et exprimée en ms/cm.

### 2.2.4 Mesure de la chlorinité (Cl‰)

La mesure de la chlorinité a été réalisée en milieu neutre par la méthode de Mohr [144]. Il s'agit d'un dosage direct des ions chlorures présents dans les différents échantillons d'eau prélevé du rocher de sel par des ions d'argent ( $\text{AgNO}_3$ ) en présence de chromate de potassium neutre ( $\text{K}_2\text{CrO}_4$ ) comme indicateur colorée de fin de réaction. Lorsque la totalité des ions chlorure ont réagi avec les ions d'argent, ce sont les ions chromate ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ) qui réagissent avec les ions d'argent pour former un précipité rouge brique ( $\text{Ag}_2\text{CrO}_4$ ) indiquant que l'équivalence est atteinte [144].

### 2.2.5 Détermination de la salinité (S ‰)

La salinité qui désigne la teneur en sels dissous dans l'eau de mer a été déterminée en termes de chlorinité par la formule suivante : **S ‰ = 1,80655. Cl‰** [144].

### 2.2.6 Dosage des ions $\text{Ca}^{2+}$

Le dosage des ions  $\text{Ca}^{2+}$  a été réalisé par titrimétrie avec l'EDTA di-sodique dans un milieu alcalin après dilution de la prise d'essai. Le point d'équivalence est repéré par le changement de la couleur rose de la solution vers le violet, grâce à la présence de murexide comme indicateur coloré de fin de réaction [144]. La concentration en ions  $\text{Ca}^{2+}$  a été déterminée selon la formule suivante :

$$[\text{Ca}^{2+}] = \text{Ve} * \text{F} * 8,016$$

Sachant que :

Ve : volume de la solution EDTA pour atteindre l'équivalence du dosage.

F : facteur de dilution qui est égale à 5.

### 2.2.7 Dosage des ions Mg<sup>2+</sup>

Le dosage des ions Mg<sup>2+</sup> a été effectué par titrimétrie avec l'EDTA dans un milieu alcalin (en ajoutant le NH<sub>4</sub>OH) après dilution de la prise d'essai. L'équivalence est repérée par le changement de la couleur violet de la solution vers le bleu, grâce à la présence de l'eriochrome comme indicateur coloré de fin de réaction [144]. La concentration en ions Mg<sup>2+</sup> est déterminée selon la formule suivante :

$$[\text{Mg}^{2+}] = (\text{Ve}_{\text{Mg}^{2+}} - \text{Ve}_{\text{Ca}^{2+}}) * F * 4,86$$

Sachant que :

Ve : volume de la solution EDTA pour atteindre l'équivalence du dosage.

F : facteur de dilution qui est égale à 5.

### 2.2.8 Dosage des ions sulfate

Le dosage des ions sulfates a été réalisé par spectrophotométrie à la longueur d'onde  $\lambda=420\text{nm}$ , après ajout d'une solution stabilisante et du chlorure de Baryum à la prise d'essai de l'échantillon à analyser [144].

### 2.2.9 Dosage des HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (hydrogénocarbonates)

Le dosage des ions HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> se fait par neutralisation d'un certain volume d'eau à analyser par un acide fort dilué de normalité N, en présence de méthyl orange, jusqu'au virage au rose [144]. La concentration en ions bicarbonates est exprimée en mg/l selon la formule suivante :

$$[\text{HCO}_3^-] = ([\text{HCl}] * V_{\text{HCl}}) / V_e$$

D'où:

[HCl] : concentration de la solution d'HCl utilisée pour le titrage

V<sub>HCl</sub> : volume de la solution d'HCl utilisé pour le titrage

Ve : volume de l'échantillon en ml

## 2.3 Analyse microbiologique

### 2.3.1 Isolement, purification et conservation des archées aérobies halophiles

L'isolement des archées et bactéries halophiles et halotolérantes a été réalisé par filtration de 100 ml de chaque échantillon à travers une membrane de nitrocellulose de (0,22  $\mu\text{m}$  de porosité) [145]. La membrane est ensuite déposée à la surface de deux milieux de culture solides : Sehgal and Gibbons (SG) (KCl 2,0 g ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  20,0 g ;  $\text{FeCl}_2$  0,023 g ; Na-citrate 3,0 g ; Casaminoacids 7,5 g ; Extrait de levure 10,0 g ; Agarose 15,0 g ; Eau 1000 ml ; pH 7,2) [146] et MSH ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  50,0 g ;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  32,0 g ; KCl 5,0 g ;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,8 g ; NaBr 0,6 g ;  $\text{NaHCO}_3$  0,16 g ; Extrait de levure 5,0 g ; Agarose 15,0 g ; Eau 1000 ml, pH 7.2) contenant chacun 15%, 20% et 25% (p/v) de NaCl. Ces deux milieux de cultures avec différentes concentrations de NaCl ont été utilisés pour couvrir une large gamme des besoins nutritifs et particulièrement l'éventail du spectre salin. L'incubation des boîtes de Pétri a été réalisée à une température de 40°C pendant une durée d'incubation allant de 8 à 20 jours dans des sacs hermétiquement fermés pour éviter la dessiccation [146]. Les colonies isolées ont été purifiées par quatre repiquages successifs et conservées sur le milieu d'isolement incliné à une température 4°C.

### 2.3.2 Sélection des souches halophiles obligatoires

Afin de sélectionner les souches halophiles strictes des autres souches halotolérantes, une culture pour chaque souche a été préparée en milieu liquide MSH sans NaCl avec ajustement de l' $A_{260\text{nm}}$  de l'inoculum initial à 0.1. La présence ou l'absence de croissance de chaque souche a été déterminée par mesure de l' $A_{260\text{nm}}$  après 6 jours d'incubation à une température de 40°C sous agitation.

### 2.3.3 Identification phénotypique préliminaire des souches halophiles

L'identification des souches a été réalisée selon les tests proposés par Oren et al [147] pour la description de nouveaux taxons dans la famille des *Halobacteriaceae*.

### 2.3.3.1 Examen macroscopique

L'aspect macroscopique des colonies (taille, forme, relief, contour et consistance) d'une culture fraîche de 5 à 8 jours a été déterminé sur milieu de culture solide (MSH) à l'œil nu et sous la loupe binoculaire dans les conditions optimales de croissance. En ce qui concerne la pigmentation, elle a été examinée en fonction de différentes concentrations de NaCl [147].

### 2.3.3.2 Examen microscopique

La mobilité a été vérifiée par examen microscopique à l'état frais (microscope optique et de contraste de phase). La morphologie et l'arrangement ont été déterminés par examen microscopique après coloration de Gram modifiée décrite par Dussault [148] qui est complétée par microscopie à contraste de phase et par microscopie électronique à balayage.

#### 2.3.3.2.1 Coloration de Gram modifiée (Coloration de Dussault)

Du fait de l'absence du peptidoglycane chez les haloarchées, la coloration de Gram ne permet pas la distinction entre les halophiles à Gram positif et négatif. La coloration de Dussault qui est largement utilisée pour la coloration des haloarchées consiste à suspendre plusieurs colonies dans une solution saline à 20% (p/v). La solution est ensuite agitée vigoureusement pour disloquer les agglomérats. Après avoir étalé une goutte volumineuse sur une lame propre et dessèchement à l'air, la lame est fixée et dessalée simultanément par immersion dans une solution d'acide acétique à 5% (p/v) pendant 5 minutes. Le frottis est coloré avec une solution de cristal violet à 0.25% (p/v) pendant trois minutes après rejet de l'acide acétique et dessèchement de la lame à l'air libre sans rinçage. Une contre coloration par la fuchsine pendant 1 minute 30 secondes est exercée. La lame est rincée par l'eau et séchée, puis observée au microscope optique à immersion [148].

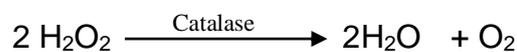
### 2.3.3.2 Examen au microscope électronique à balayage

Le microscope électronique à balayage a été utilisé pour visualiser l'aspect extérieur des souches isolées qui ont été préalablement fixées par le glutaraldéhyde à 3% (p/v) pendant 1 heure 30 minutes, lavées avec du tampon cacodylate 0,1 M, post fixées par 1% (p/v) d'OsO<sub>4</sub> pendant 2 heures à 4°C et déshydratées par une série de gradient croissant d'acétone pendant 10 minutes chacun (50%, 70%, 80%, 90%, 95% et 99,8%), puis deux fois dans de l'acétone à 100% pendant 30 minutes. Après séchage à l'air, les échantillons ont été montés sur une lame en métal à l'aide d'un adhésif spécial, recouverts de 40 à 60 nm d'or, puis examinés au microscope électronique à balayage JEOL JSM-6610 [149].

### 2.3.3.3 Caractérisation biochimique

#### 2.3.3.3.1 Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme qui dégrade l'eau oxygénée en eau et en oxygène moléculaire selon la réaction suivante :



Une réaction positive se traduit par un dégagement immédiat de bulles gazeuses après dissociation d'un peu de la culture dans une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes [150].

#### 2.3.3.3.2 Recherche de l'oxydase

Le test oxydase permet la mise en évidence de la présence d'enzyme cytochrome oxydase. Un disque imprégné de réactif est ajouté dans la suspension archéenne préparée dans une solution de NaCl concentration optimale pour chaque souche). Une réaction positive se manifeste par l'apparition d'une couleur rose violette à la température ambiante [150].

#### 2.3.3.3.3 Test de lyse par l'eau distillée

Chaque isolat estensemencé dans 20 µl d'eau distillée milliQ. L'obtention d'une solution visqueuse se traduit par la lyse de la souche dans de l'eau distillée [6]. Ce test a été réalisé dans le but de confirmer si les souches testées appartiennent à des haloarchées non coccoïdes extrêmes [149].

#### 2.3.3.3.4 Détermination de la concentration optimale en NaCl à la croissance

La croissance à différentes concentrations de NaCl a été examinée en milieu MSH liquide additionné de 2 à 25% (p/v) de NaCl, à 40°C sous agitation. Le suivi de la croissance a été réalisé par mesure de l' $A_{260nm}$  après 5 jours d'incubation.

#### 2.3.3.3.5 Utilisation des substrats carbonés

La gamme des substrats carbonés utilisés comme seule source de carbone et d'énergie a été révélée en milieu MSH liquide sans extrait de levure contenant 10 g/l du sucre testé (Glucose, arabinose, amidon, mannose, lactose, fructose, galactose, maltose, saccharose) ou 1 g/l de l'alcool testé (mannitol, glycérol), 0.005 g/l of  $KH_2PO_4$  et 0.5 g/l  $NH_4Cl$  (pH 7,2) [151]. L'utilisation des substrats carbonés a été mise en évidence par mesure de l' $A_{600nm}$  par rapport à celle du témoin (sans substrat carboné).

#### 2.3.3.3.6 Croissance en anaérobiose

##### Fermentation de l'arginine

La croissance en anaérobiose en présence de l'arginine comme accepteur final d'électrons a été testée par mesure de l' $A_{600nm}$  d'une culture liquide en milieu MSH contenant 5 g/l de L-arginine-HCl. L'inoculum a été préalablement préparé à partir d'une pré-culture des isolats en milieu MSH liquide à 40°C avec agitation. Après 5-7 jours d'incubation à 40°C et à l'obscurité, l'absorbance des cultures a été comparée avec celle des cultures témoins sans arginine. Un résultat positif se traduit par une  $A_{600nm}$  qui est au moins deux fois celle du témoin sans arginine [152].

### Réduction des nitrates

La réduction des nitrates a été testée par colorimétrie sur milieu MSH additionné 0,1% (p/v) de  $\text{KNO}_3$  [151]. La production de nitrites à partir des nitrates se traduit par l'apparition d'une coloration rose après avoir ajouté les réactifs de Griess. Un peu de poudre de zinc a été ajouté aux cultures qui ne montrent pas de nitrites. L'absence de coloration indique la réduction des nitrates au-delà du stade nitrites [150].

### 2.3.3.4 Test de sensibilité aux antibiotiques et aux sels biliaires

#### 2.3.3.4.1 Test de sensibilité aux antibiotiques

Le test de sensibilité aux antibiotiques a été réalisé par la méthode de diffusion des disques imprégnés aux antibiotiques selon les directives du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) [153] avec de légères modifications. Le milieu utilisé pour les haloarchées est le milieu MSH à la concentration optimale de NaCl au lieu du milieu solide standard Muller Hinton. L'inoculum a été préparé conformément aux directives du CLSI [153]. La turbidité de la culture en phase exponentielle a été ajustée pour correspondre la turbidité 0.5 McFarland. La température d'incubation est 40°C pendant 5 à 7 jours jusqu'à l'apparition d'une culture. Les antibiotiques utilisés sont : Ampicilline (10 µg), acide nalidixique (30 µg), chloramphenicol (30 µg), bacitracine (10 µg), oxacilline (5 µg), gentamycine (30 µg), ceftazidime (30 µg), néomycine (30 µg), tetracycline (30 µg), triméthoprim (25 µg), erythromycine (15 µg) et la novobiocine (30 µg). Les résultats ont été enregistrés comme sensibles ou résistants après incubation pendant 5 à 10 jours (apparition d'une culture) à 40°C. La sensibilité a été définie par l'apparition d'une zone d'inhibition qui s'étend au moins 2 mm au-delà du disque d'antibiotique [154].

#### 2.3.3.4.2 Test de sensibilité aux sels biliaires

Dans le but de déterminer si les isolats appartiennent aux archées halophiles, la réaction de chaque souche est testée vis-à-vis les sels biliaires et le chloramphenicol. En effet, les archées halophiles se caractérisent par leur sensibilité au deoxycholate de sodium comme sels biliaires et leur résistance au chloramphenicol [155].

La sensibilité au chloramphénicol a été déterminée par la méthode de diffusion des disques imprégnés. Par contre, la sensibilité au déoxycholate de sodium a été étudiée par ensemencement d'une colonie de la souche en question sur milieu MSH solide contenant 0.004% de deoxycholate de sodium et incubation à 40°C pendant 14 jours [155].

### 2.3.3.5 Caractérisation chimio taxonomique

#### 2.3.3.5.1. Extraction des lipides totaux

Les lipides membranaires sont extraits et analysés par chromatographie sur couche mince selon la technique décrite par Oren et al [156] en utilisant 90 ml de culture jeune qui ont été centrifugés pendant 25 minutes à 9000 tours/minute et à 4°C. Le culot est suspendu dans 3 ml d'eau distillée.

#### 1<sup>ère</sup> extraction

9 ml d'un mélange méthanol/ chloroforme (6 : 3. v/v) a été ajouté. Après une agitation pendant 4 heures, le surnageant est récupéré par centrifugation à 9000 tours/minute pendant 20 minutes.

#### 2<sup>e</sup> extraction

Le culot subit une 2<sup>e</sup> extraction par 4 ml d'un mélange méthanol-chloroforme-eau (2 :1 :1. v/v) suivie d'une agitation pendant 1 heure. Une centrifugation de 9000 tours/minute pendant 25 minutes a été exercée pour récupérer le surnageant.

Le surnageant de la 1<sup>ère</sup> et de la 2<sup>e</sup> extraction sont regroupés pour y ajouter 5 ml de chloroforme et 5 ml d'eau distillée. Le mélange est centrifugé à 9000 tours/minutes pendant 10 minutes pour récupérer la phase profonde qui correspond à la phase chloroforme contenant la fraction lipidique. Après évaporation, le produit est concentré et repris dans 200 µl de chloroforme.

#### 2.3.3.5.2 Analyse de l'extrait total de lipides par chromatographie sur couche mince

La cuve est saturée au moins 30 minutes avant le développement par l'éluant qui est un mélange chloroforme-méthanol-acide acétique-eau (85 :22,5 :10 :4) et la plaque de silice doit être réactivée préalablement à 120°C [152].

#### 2.3.3.5.3 Révélation

Après migration et séchage de la plaque, les spots de glycolipides sont révélés par pulvérisation de 0.5% (p/v) de  $\alpha$ -naphthol dans 50% (v/v) de méthanol puis 5% (v/v)  $H_2SO_4$  dans l'éthanol suivie d'un séchage à 150°C. Cependant, les phospholipides sont détectés par pulvérisation d'une solution molybdate d'ammonium dans l'acide sulfurique [157, 158]. La plaque est ensuite séchée à 150°C pendant 5-10 minutes.

Les Références frontales ( $R_f$ ) calculées pour chaque souche sont comparées aux autres  $R_f$  de la littérature [149].

### 2.3.4 Identification moléculaire

#### 2.3.4.1 Extraction de l'ADN génomique

Les différentes souches sont cultivées en milieu MSH liquide contenant la concentration optimale en NaCl à la croissance pour chaque souche. Après avoir obtenu une culture dense, les cellules sont récupérées par centrifugation à 9000 rpm à 4°C. L'ADN génomique des différentes souches a été extrait par le kit DNeasy®blood & tissue (Qiagen) selon les instructions du fabricant.

#### 2.3.4.2 Contrôle de la qualité et détermination de la quantité d'ADN en solution

La pureté de l'ADN a été évaluée par mesure des rapports  $A_{260nm}/A_{280nm}$  et  $A_{260nm}/A_{230nm}$ . Le premier rapport doit être compris entre 1,8 et 2,0. Une contamination par les protéines ou le phénol est attribuée à un rapport  $A_{260nm}/A_{280nm}$  inférieure à 1,8. S'il est supérieur à 2,0, la contamination est due à la présence de l'ARN. Le rapport  $A_{260nm}/A_{230nm}$  doit être compris entre 0,3 et 0,9. Lorsqu'il est supérieur 0,9 cela indique une contamination par les sels.

La concentration de l'ADN a été déterminée directement par Nanodrop en utilisant l'eau distillée MilliQ comme blanc (<https://worldwide.promega.com/>).

#### 2.3.4.3 Amplification du gène codant l'ARNr 16S par PCR

Les gènes codant l'ARNr 16S ont été amplifiés par PCR en utilisant les amorces sens et anti-sens spécifiques aux archées A20F (5'-TCCGGTTGATCCTGCCG-3') et A1540R (5'-GGAGGTGATCCAGCCG-3'), respectivement [158].

Toutes les réactions ont été réalisées dans un mélange réactionnel de 50 µl contenant 25 µl de GoTaq® Hot Start Green Master Mix (2×), 10 µM de chaque amorce, 1 µl de l'ADN matrice (<250 ng) et l'eau exempt de nucléase. L'amplification par PCR a été réalisée selon le programme indiqué dans le tableau ci-dessous (tableau.2.1).

**Tableau 2.1** : Programme d'amplification par PCR

Couple d'amorces	Etapes	T°/ temps	Nombre de Cycles
<b>A20F/A1540R</b>	Pré-dénaturation	95°C/ 2 minutes	1
	Dénaturation	95°C/ 30 secondes	35
	Hybridation	55°C/ 30 secondes	
	Elongation	72°C/ 1 minute 30 secondes	
	Elongation finale	72°C/ 5 minutes	1

#### 2.3.4.4 Electrophorèse sur gel d'agarose

Afin de visualiser le résultat de l'amplification par PCR, une électrophorèse sur gel d'agarose à 1% (p/v) a été réalisée avec le tampon TAE (Tris-Acétate-EDTA) 1X (obtenu par dilution de la solution mère de ce tampon 50X (pH. 8,0), en présence des marqueurs de taille (1Kb DNA leader, New England Biolabs) et sous une tension de 100 volts. Le colorant d'ADN incorporé dans le gel d'agarose est le

RedSafe™ (20.000X). Le colorant de chargement (orange loading dye 6X) a été employé pour permettre le chargement des marqueurs de taille et des échantillons d'ADN dans les puits du gel d'agarose, leur visualisation et la détermination de la distance à laquelle les échantillons ont migré lors de l'exécution. Lorsque l'exécution de l'électrophorèse est finie, les fragments d'ADN ont été visualisés par la mise en place du gel coloré dans un système d'imagerie de gel qui contient une source de lumière UV (UV-Trans illuminateur) qui provoque la fluorescence de l'ADN, une hotte ou chambre noire pour protéger l'expérimentateur des rayons UV et une caméra pour la capture d'images.

#### 2.3.4.5 Purification et séquençage

La purification des produits de la PCR est une étape cruciale pour éliminer les impuretés réactionnelles telles que les amorces, les dNTPs et les enzymes couramment utilisés dans la réaction de PCR et qui peuvent influencer négativement le déroulement des réactions en aval comme le séquençage. Cette opération a été réalisée par le kit de purification PureLink™ PCR (Invitrogen™) qui se base sur la technologie des membranes de silice pour lier l'ADN double brin tandis que les sous-produits indésirables sont éliminés ; dans une première étape un tampon de liaison à base de sels chaotropiques est ajouté à la réaction de PCR terminée pour faciliter la liaison de l'ADN à la membrane de silice en rendant les acides nucléiques hydrophobes. Cela expose les résidus de phosphate de l'ADN afin qu'ils soient disponibles pour l'adsorption. Une fois ajouté à la colonne de centrifugation PureLink™, le mélange est centrifugé pour lier l'ADN à la silice. La membrane est ensuite lavée avec un tampon contenant de l'éthanol, puis centrifugée pour éliminer l'excès d'éthanol. La libération de l'ADN de la silice a été effectuée par un tampon d'élution de faible teneur en sel suivi d'une centrifugation. Ainsi, les ADN exempts de toutes impuretés et plus concentrés qu'au départ (grâce au volume d'élution réduit) ont fait l'objet d'un séquençage Sanger par la paire d'amorce A20F/A1540R en utilisant le séquenceur ABI 3730 XL au niveau de la société CeMIA (cellular and molecular immunological applications), Grèce.

#### 2.3.4.6 Analyse phylogénétique

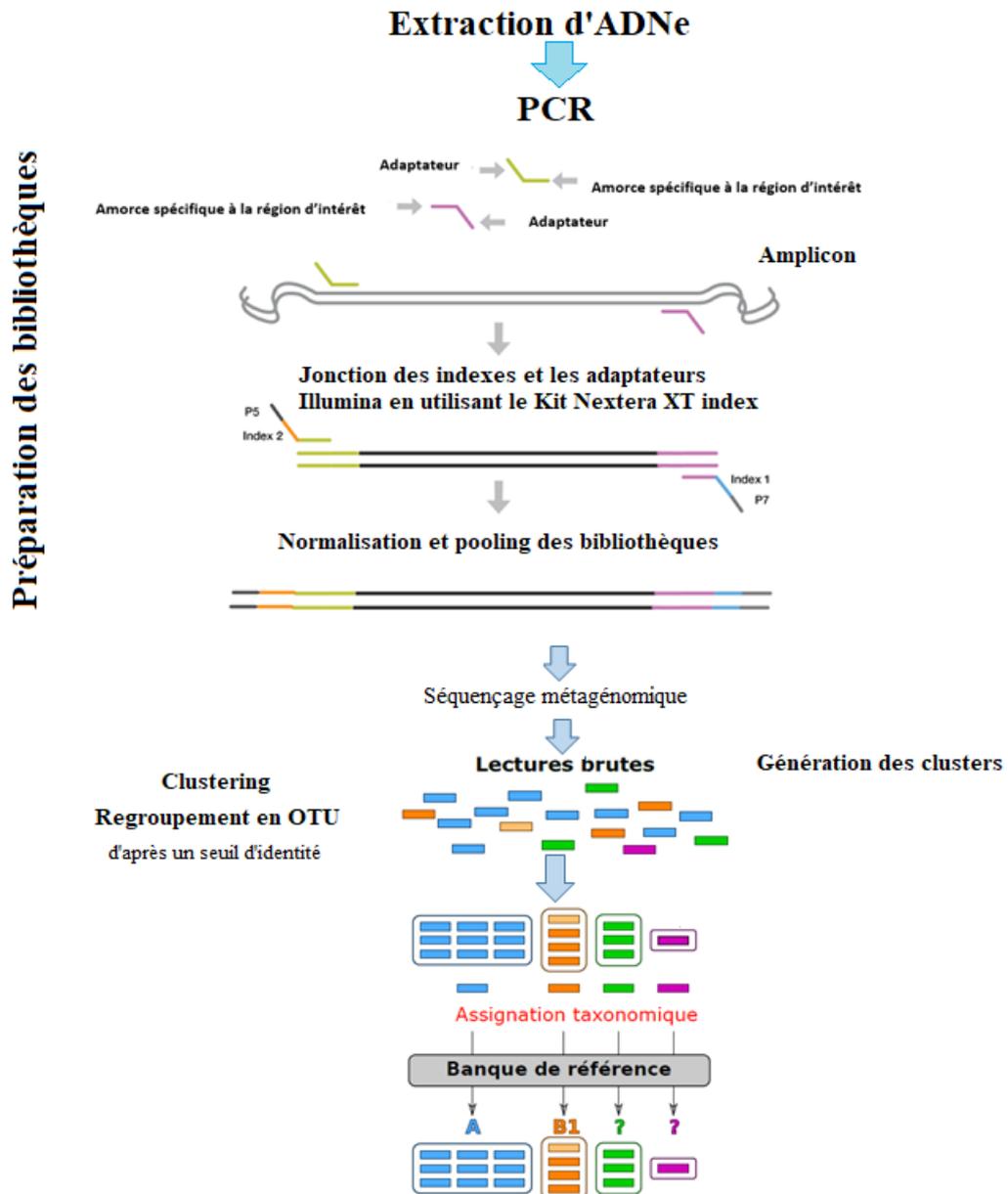
Les liens de parenté entre les isolats de cette présente étude et les souches les plus proches ont été étudiés en se basant sur les séquences du gène codant l'ARNr 16S.

Tout d'abord, les séquences nucléotidiques brutes du gène codant l'ARNr 16S reçus à partir de la société CeMIA, Grèce, ont fait l'objet d'un traitement bioinformatique. Il consiste à un alignement des séquences qui est réalisé en utilisant le programme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) sur le site NCBI (National Center for Biotechnology Information) et le serveur EzBiocloud (<http://Eztaxon-e.ezbiocloud.net>); Il s'agit d'une recherche par similarité qui consiste à comparer les séquences d'intérêt (query sequence) avec chacune des séquences des bases de données « GenBank » et « Ez Taxon », respectivement.

Ensuite, l'arbre phylogénétique a été établi par le logiciel MEGA X (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) [159] en commençant par alignement multiples des séquences retenues (requêtes et référence) pour la phylogénie par le programme CLUSTEL W du logiciel MEGA X [159]. Plusieurs modèles de substitutions ont été choisis pour construire l'arbre phylogénétique par la méthode Neighbor joining [160]. La robustesse et la fiabilité de l'arbre phylogénétique a été vérifiée par le test bootstrap impliquant 1000 réplifications [161]. La séquence du gène codant l'ARNr 16S de la souche type *Methanobacterium formicicum* DSM 1535<sup>T</sup> a été utilisée comme out group pour permettre l'enracinement de l'arbre.

## 2.4 Etude de la biodiversité microbienne procaryote par séquençage haut-débit

Du fait que l'analyse de la diversité microbienne par culture est problématique pour une fraction importante des bactéries et des archées, nous avons eu recours au séquençage haut-débit par métagénomique ciblée qui s'est effectuée selon le protocole suivant (Fig. 2.2) :



**Figure 2.2** Représentation simplifiée du Workflow de séquençage métagénomique ciblé 16S (originale).

### 2.4.1 Préparation des échantillons pour l'analyse métagénomique

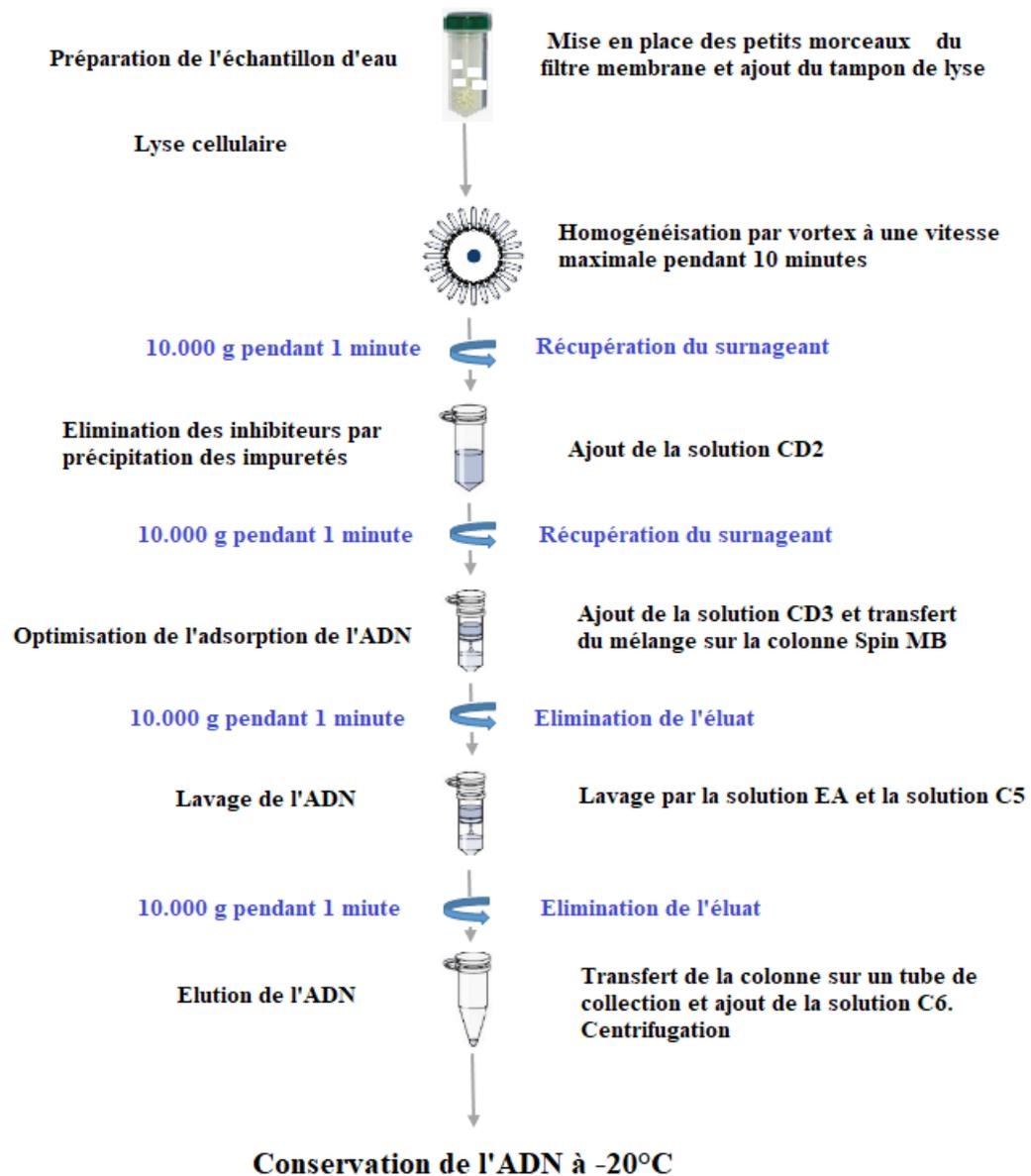
Quatre cours d'eau permanents (S4, S6, S7 et S8) ont été choisis pour l'analyse métagénomique des échantillons d'eau prélevés. Les différents échantillons d'eau du rocher de sel sont filtrés au travers du papier Whatman™ pour éliminer les cellules eucaryotes et les substances solides.

Les filtrats obtenus sont ensuite filtrés au travers des filtres membranes de 0.22 µm de porosité pour retenir toutes les cellules procaryotes dont le diamètre est supérieur à celui de la porosité du filtre membrane.

### 2.5.2 Extraction de l'ADN environnemental (ADNe)

L'étape d'extraction de l'ADNe permet d'accéder à l'ADN des organismes existants, sans distinguer entre cellules vivantes et mortes.

L'ADNe des différents échantillons d'eau hypersalée est extrait par la technique bead beating en utilisant le DNeasy Power Soil Prokit (Qiagen) avec de légères modifications ([DNeasy PowerSoil Pro Kit \(Qiagen.com\)](https://www.qiagen.com/fr/products/90040/dneasy-power-soil-pro-kit)). Le processus d'isolement de l'ADNe commence par filtration de 100 ml d'eau au travers des filtres membranes de 0.22 µm de porosité pour piéger les microorganismes. La membrane découpée aseptiquement et le tampon de lyse sont ensuite placés successivement dans un tube homogénéisateur (capacité 2 ml) contenant des billes de lyse. Cette étape qui combine la lyse mécanique et chimique (tampon de lyse optimisé) permet une lyse rapide et efficace tout en améliorant l'isolement des microorganismes des filtres membranes et en évitant les biais en faveur des espèces abondantes. Après élimination des protéines et des inhibiteurs, le lysat purifié est mélangé avec une solution contenant une concentration élevée en sels pour optimiser la fixation de l'ADN sur la membrane de la colonne MB Spin. Une fois capturé, l'ADN est ensuite soumis au lavage en deux étapes puis élué par un tampon Tris (10 Mm). Grâce à la technologie d'élimination des inhibiteurs, ce kit permet d'obtenir un rendement élevé en ADN pur (de haute qualité) qui peut être utilisé immédiatement dans le séquençage nouvelle génération (NGS). Le protocole d'extraction de l'ADN total a été réalisé selon le protocole montré dans la figure 2.3.



**Figure 2.3.** Protocole d'extraction de l'ADN génomique par DNeasy Power Soil Prokit (Qiagen)

#### 2.4.3 Dosage et contrôle de la pureté de l'ADN

Le dosage de l'ADN extrait et le contrôle de sa qualité se sont effectués comme il a été décrit précédemment (<https://worldwide.promega.com/>).

#### 2.4.4 Préparation de la bibliothèque Hiseq par amplification et séquençage

La bibliothèque a été préparée à partir des amplicons PCR de la région hypervariable V<sub>4</sub>-V<sub>5</sub> après avoir ajouté à leurs extrémités des étiquettes permettant de définir l'origine des fragments lors du séquençage simultané de plusieurs échantillons, la fixation des fragments sur un support solide et l'initiation de la réaction de séquençage par incorporation des dNTPs marqués par fluorescence.

##### 2.4.4.1 Amplification par PCR

La diversité des communautés bactériennes et archéennes des saumures du rocher de sel a été estimée par métagénomique ciblée en se basant sur le gène codant l'ARNr 16S comme marqueur génomique. En effet, la région hypervariable V<sub>4</sub>-V<sub>5</sub> de ce marqueur a été ciblée et amplifiée par PCR en utilisant les sondes sens et anti-sens (Illumina), (5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTGYCAGCMGCCGCGGTA A-3') (5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCGYCAATTYMTTTRAGT TT-3') respectivement. La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a été réalisée dans 25 µl de milieu réactionnel contenant 2.5 µl d'ADN (5 ng/µl), 2.5 µl de 16S V4-V5 Primer Mix, 12.5 µl MGX Master Mix et 7.5 µl d'eau grade PCR. Les conditions d'amplification suivantes ont été suivies : dénaturation préliminaire à 95°C pendant 3 minutes suivie de 25 cycles impliquant chacun 95°C pendant 30 secondes, 30 secondes à 55°C, et 30 secondes à 72°C. Une étape d'élongation finale à 72°C pendant 5 minutes termine la PCR. Ensuite, l'amplicon Illumina de la région hypervariable V<sub>4</sub>-V<sub>5</sub> a été utilisé dans le séquençage haut-débit (Illumina Hiseq™ 4000 paired-end reads) à macrogen Inc. ([http : //www.macrogen.com](http://www.macrogen.com), Seoul, South Korea) pour caractériser la communauté halophiles des saumures du rocher de sel selon les instructions du fabricant.

## 2.4.5 Procédure d'analyse

### 2.4.5.1 Prétraitement (preprocessing)

Le prétraitement a pour but d'éliminer les lectures contenant des bases inconnues (N), les lectures trop courtes non informatives pour l'assignation taxonomique, ou longues qui peuvent être des chimères et les lectures ne contenant pas les amorces, ou avec des erreurs dans les amorces. Il permet également, grâce au repérage des barcodes d'associer les lectures à l'échantillon d'origine quand plusieurs échantillons ont été séquencés dans une même piste d'Illumina. Toutes ces étapes sont dirigées par le pipeline d'analyse QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) <http://qiime.org>.

### 2.4.5.2 Analyse primaire

Les lectures qui ne se chevauchent pas sont regroupées en unités taxonomiques opérationnelles (OTUs) de sorte que le seuil de similarité entre les séquences du même cluster (OTU) est fixé à 97% [163].

### 2.4.5.3 Assignation Taxonomique

Une fois les OTU formés, une séquence représentative est sélectionnée pour chacun d'eux afin de les assigner en comparant cette séquence à une banque de séquences référence (dans notre cas c'est la banque ribosomal database project ou RDP) par alignement des séquences de type BLAST [164]. Cette assignation étant étendue à toutes les lectures appartenant à l'OTU. Cette étape donne lieu un tableau de comptage des OTU.

### 2.4.5.4 Tableau d'OTU

C'est un tableau à double entrées contenant le nombre de séquences par OTU pour décrire l'abondance. Ces abondances absolues sont normalisées par l'utilisation des pourcentages afin de rendre les échantillons comparables <https://dridk.me/metagenomique.html>.

#### 2.4.5.5 Analyse secondaire

L'analyse secondaire porte sur les différentes analyses statistiques et leur interprétation.

#### 2.4.5.6 Analyse de la diversité

La diversité microbienne a été décrite par génération des courbes de raréfaction et calcul de différents indices de diversité (Chao, Shannon, Simpson, Good's coverage) en utilisant QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) <http://qiime.org>.

### 2.5 Sélection des souches productrices d'enzymes hydrolytiques extracellulaires

Les différents isolats ont été testés pour la production qualitative d'amylase, estérase, lécithinase, lipase, gélatinase, protéase et de la cellulase.

La mise en évidence qualitative de la production des enzymes hydrolytiques extracellulaires a été réalisée sur milieu MSH solide modifié par réduction de la quantité d'extrait de levure à 0,3 g/l au lieu de 5 g/l et à la concentration optimale de NaCl plus le substrat convenable pour chaque enzyme [162].

Une colonie d'une culture jeune de chaque isolat a été utilisée pour l'ensemencement par spot ou stries du milieu convenable à chaque activité enzymatique. L'incubation des boîtes de Pétri a été réalisée à 40°C pendant une à deux semaines.

#### 2.5.1 Activité amylase

L'activité amylase a été mise en évidence sur le milieu de base décrit ci-dessus additionné d'amidon soluble à une concentration finale égale à 1% (p/v). L'hydrolyse de l'amidon a été décelée après incubation par inondation de la surface de la gélose par une solution de lugol. Une zone claire autour de la colonie indique l'hydrolyse de l'amidon [150].

### 2.5.2 Activité cellulasique

L'activité cellulase a été mise en évidence sur le milieu de base décrit ci-dessus additionné de carboxyméthylcellulose (CMC) à une concentration finale égale à 0,5% (p/v). L'hydrolyse de la cellulose a été décelée après incubation par inondation de la surface de la gélose par une solution de rouge Congo à 0,1% (p/v). Une zone claire autour de la colonie indique l'hydrolyse de La CMC [150].

### 2.5.3 Activité Protéasique (caséinase)

L'activité protéase a été mise en évidence sur le milieu de base décrit ci-dessus additionné de la caséine à une concentration finale égale à 1% (p/v). L'hydrolyse de la caséine a été détectée après incubation par apparition d'une zone claire autour de la colonie [150].

### 2.5.4 Activité gélatinasiq

Ce test consiste à ensemercer le milieu à base de gélatine contenu dans un tube à essai (la gélatine a été utilisée comme agent de solidification à la place de l'agar agar) par un inoculum dense de l'isolat testé par 4 à 5 piqûres à l'aide d'une pipette Pasteur. Comme la gélatine se liquéfie normalement à une température supérieure ou égale à 28°C, l'origine de la liquéfaction de la gélatine doit être confirmée par la mise en place des tubes ensemençés et témoin dans le réfrigérateur pendant 30 minutes pour favoriser la solidification du milieu contenu dans les tubes. L'hydrolyse de la gélatine se traduit par la liquéfaction de la gélatine du milieu ensemençé qui empêche la formation de la gélose après réfrigération. Le milieu du tube témoin doit se solidifier même après réfrigération [165].

### 2.5.5 Activité estérasique

La production de l'estérase a été mise en évidence sur le milieu MSH modifié additionné de 1% (p/v) de tween 80. Un halo ou un précipité autour des colonies témoigne une activité estérase positive [150].

### 2.5.6 Activité lipasique

La production de la lipase a été détectée sur le milieu MSH modifié additionné de 2, 5% (p/v) d'huile d'olive. Un halo ou un précipité autour des colonies indique la production de la lipase [150].

### 2.5.7 Activité lécithinasique

La production de la lécithinase a été mise en évidence sur le milieu MSH modifié additionné de 2 ml d'une suspension de jaune d'œuf dans de l'eau physiologique (v/v). L'hydrolyse de la lécithine a été indiquée par formation d'un précipité autour de la colonie [150].

# **Chapitre 3**

## **Résultats et discussion**

## Chapitre 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

### 3.1 Résultats de l'analyse physicochimique des saumures du rocher de sel

Neuf (09) échantillons d'eau ont été récoltés pour l'analyse physicochimique et l'étude de la diversité microbienne procaryote culturale. Les écosystèmes hypersalins athalassohalins diffèrent considérablement par leur composition ionique, leur concentration totale en sels et leur pH [8]. Selon les résultats de l'analyse physicochimique, les valeurs de pH des différents échantillons de saumures du rocher de sel enregistrées dans le tableau 3.1 sont légèrement acides à neutre. Elles varient de 6,55 à 7,36. Ces valeurs de pH qui peuvent favoriser le développement d'une flore microbienne généralement neutrophile sont inférieures à celles mesurées dans le grand lac salé Utah (USA) (7,7-8,4) [166] et supérieure à celle de la mer morte (pH 5.9) [20].

**Tableau 3.1** : Caractéristiques physicochimiques des échantillons de saumures du rocher de sel

Echantillon	pH	Conductivité ms/cm	Cl <sup>-</sup> ‰	S ‰	Ca <sup>2+</sup> g/l	Mg <sup>2+</sup> g/l	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> g/l	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> g/l
<b>S1</b>	7,07	233,33	202,36	356,57	1,524	0,4382	0,0732	3,5511
<b>S2</b>	6,87	233,67	231,97	409,06	1,554	0,4147	0,061	2,8312
<b>S3</b>	6,77	235	273,4	493,91	n.d	n.d	n.d	00
<b>S4</b>	7,12	32,1	17,16	31	1,206	0,3863	0,061	2,1374
<b>S5</b>	6,55	n.d	194,11	350,67	1,733	0,4519	n.d	2,7163
<b>S6</b>	6,59	194,03	143,19	258,68	1,703	0,4483	0,1098	1,7952
<b>S7</b>	7,05	557,5	247,37	446,88	1,621	0,4851	0,1403	3,1796
<b>S8</b>	7,36	234,67	181,08	327,13	1,418	0,5151	0,0915	3,3915
<b>S9</b>	6,75	562,5	190,55	344,24	1,425	0,5597	n.d	3,525

n.d : non déterminé

Par comparaison avec certains écosystèmes algériens, l'intervalle de pH des échantillons d'eau du rocher de sel est relativement similaire à celui rencontré dans les échantillons d'eau de la sebkha Chott El Beida de Sétif (6,16 à 7,24) [167], légèrement inférieur à celui des échantillons de saumure de la sebkha Ezzemoul (Ain M'lila) (7,3 à 7,5) [4] et de Sidi Aneur (7.4) [5] et en contraste avec celui d'El

Golea (8,5 à 9) [3]. A l'exception de l'échantillon S4 qui se montre différente à l'échelle de la conductivité (32,1 ms/cm), de la chlorinité (17,16‰), et de la salinité (31‰), les valeurs de la conductivité électrique des autres échantillons de saumures allant de 194,03 ms/cm à 562,5 ms/cm montrent une minéralisation moyenne par rapport à la conductivité des échantillons d'eau du lac Sidi Ameer (>5000 ms/cm) [5].

Pour déterminer la nature des éléments chimiques contribuant à la salinité, l'analyse chimique de l'eau du rocher de sel a indiqué que les concentrations des ions  $\text{Cl}^-$  qui varient de 143,19 ‰ à 273,4 ‰ correspondent à des salinités de 258,68 ‰ et 493,91 ‰, respectivement. Les concentrations en ions  $\text{Mg}^{2+}$  (0,3863- 0,5597 g/l) et  $\text{Ca}^{2+}$  (1,125-1,733 g/l) enregistrées sont près de dix fois (0,046 g/l) et cinquante fois (0,024 g/l) supérieures à celle de la mer morte [20]. Le sulfate est un accepteur d'électrons important impliqué dans la minéralisation de la matière organique dans les écosystèmes hypersalins [17]. Sa concentration allant de 1,795 g/l à 3,551 g/l est en contraste avec la faible concentration de ces ions dans la mer morte 0,384 g/l [168]. La concentration en bicarbonate qui oscille entre 0,061 g/l et 0,140 g/l est inférieure à celle du grand lac salé (Utah) (0,5 g/l) [25] et de la mer morte (0,2 g/l) [169]. La composition des différents échantillons de saumures du rocher de sel reflète la géologie du site, la topographie et les conditions climatiques. Elle est particulièrement influencée par la dissolution des gisements minéraux. En se référant aux résultats de la salinité et du pH des différents échantillons (sauf S4), il se montre que les saumures du rocher de sel de Djelfa constituent un habitat convenable pour les archées halophiles qui nécessitent au moins 1,5 M de NaCl et un pH entre 7,0 et 7,5 [170].

Cependant en raison des fortes concentrations des ions  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{Ca}^{2+}$  qui étaient dix fois et cinquante fois plus élevées que celle de l'eau de la mer morte, les saumures du rocher de sel de Djelfa constituent un environnement athalassohalin très hostile pour la vie microbienne. En fait, les ions  $\text{Mg}^{2+}$  ont un effet chaotropique sur les protéines et les autres composants cellulaires. Ionesco et ses collaborateurs [171] ont indiqué que l'augmentation de la salinité à la suite de l'évaporation et la concentration élevée en ions  $\text{Mg}^{2+}$  rendent la mère morte un environnement hostile que la plupart des espèces ne peuvent pas tolérer.

### 3.2 Résultats de l'identification phénotypique

Notre étude préliminaire de la biodiversité dans les échantillons de saumures du rocher de sel par les méthodes culturales s'est focalisée sur l'isolement et l'identification polyphasique des archées halophiles extrêmes.

#### 3.2.1 Isolement et sélection des halophiles

Dans ce présent travail, les échantillons d'eau hypersalée du rocher de sel ont été utilisés comme matrice pour l'isolement des archées aérobies, halophiles sur deux milieux de culture solides. Après une durée d'incubation d'environ deux semaines à 40°C, plusieurs colonies de couleur orange, rose et blanche ont été obtenues sur milieu MSH incorporé de différentes concentrations de NaCl. L'absence de culture sur le milieu de culture SG pourrait être due à sa faible concentration en magnésium par rapport au milieu MSH. Bien qu'il soit riche en acides aminés, protéines et en vitamine B, le milieu de culture SG n'est pas adapté à la croissance des microorganismes halophiles de cet habitat qui semblent exigeants pour le magnésium. L'incorporation de plusieurs concentrations de NaCl dans le milieu a pour but de couvrir au maximum les différents spectres salins des bactéries et archées halophiles cultivables.

Selon Oren et Rodriguez [170], la fraction cultivable représentée par des colonies pigmentées par les nuances de la couleur orange et qui pourrait être constituée des archées halophiles fait l'objet d'une identification polyphasique dans cette étude. Le choix des colonies s'est basé sur les différences macroscopiques.

#### 3.2.2 Distribution des isolats selon le point de prélèvement

Au total, 80 isolats ont été retenus après l'étape d'isolement des sept points de prélèvement (les deux autres sites de prélèvement se sont asséchés). Après purification par quatre repiquages, plusieurs souches ont été perdues et seulement 30 isolats ont été retenus pour une identification polyphasique. Sur ce total, 10 isolats ont été obtenus du site S2, 5 isolats à partir du S6, 4 isolats du site S5, 3 isolats à partir des sites S7, S8 et S1 et 2 isolats à partir du site S9.

### 3.2.3 Caractérisation phénotypique des isolats

Les caractéristiques macroscopiques et microscopiques sont rassemblées dans le tableau 3.2.

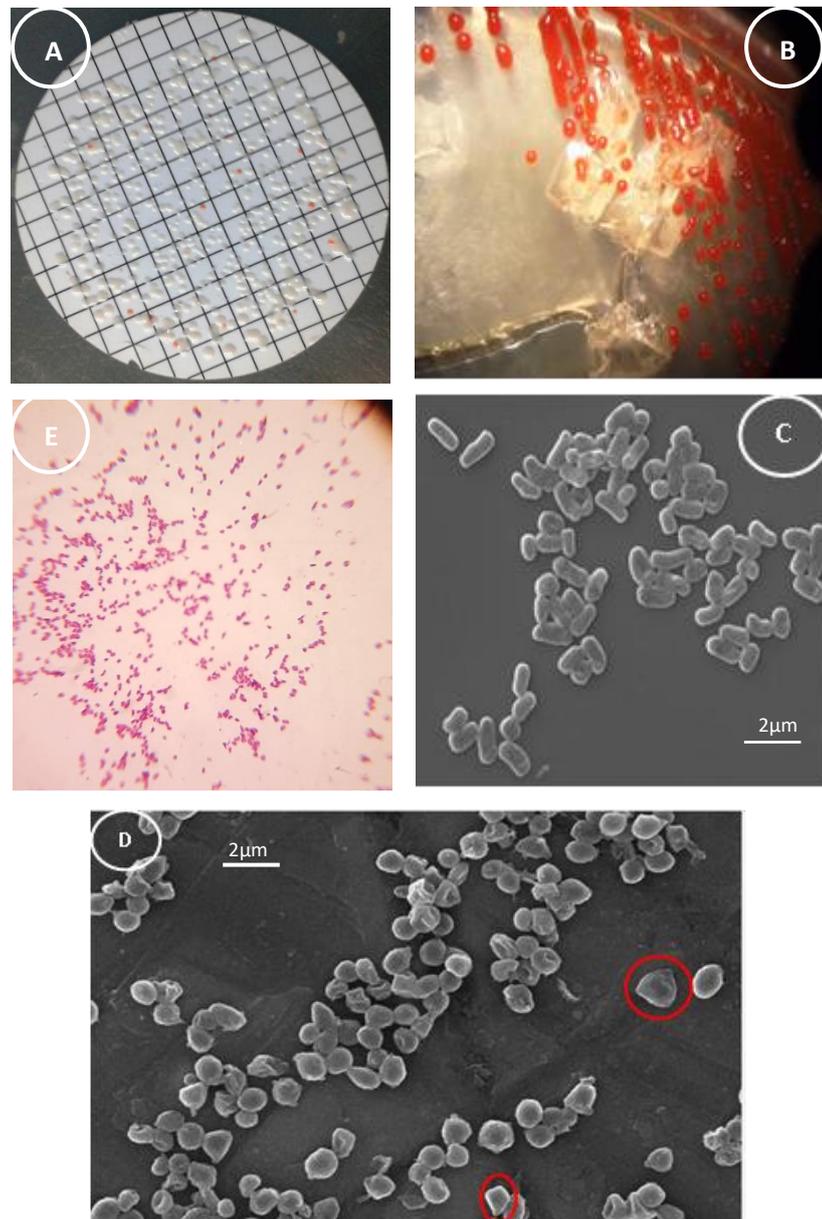
**Tableau 3.2** : Caractères macroscopiques et microscopiques des isolats

Isolat	Site d'isolement	Caractères	Forme des	Mobilité
		macroscopiques	cellules	
		Aspect des colonies		
S1-3	S1	Orange claire	Pléomorphe <sup>(a)</sup>	+
S1-1		Orange foncé	Pléomorphe <sup>(a)</sup>	+
1. OC.2		Orange	Pléomorphe <sup>(a)</sup>	+
S2-2	S2	Rouge	Pléomorphe <sup>(a)</sup>	+
S2-3				
S2-6				
2.1		Orange foncé	Pléomorphe <sup>(a)</sup>	+
S2-4		Rouge	ovale	-
S2-5		Orange	pléomorphe	+
S2-1		Rose	bâtonnet	+
S2-7		Rouge claire	bâtonnet	+
S2-8		Orange	pléomorphe	+
S2-9		Rouge foncé	bâtonnet	+
5RS8	S5	Rose	bâtonnet	+
S5-2				
S5-1				
S5-3	Rose pale	Ovale	-	
6. OF.1	S6	Orange	pléomorphe <sup>(a)</sup>	+
6. OF.3		Rose	bâtonnet	+
6. OF.5		Rouge	Ovale	-
6. OF.4		Rouge	pléomorphe	+
6. OF.2		Rouge	bâtonnet	+
7. OC.1	S7		pléomorphe	
7. OF.2		Orange	pléomorphe	+
7. OC.3		Rouge claire	bâtonnet	+
8. OF.1	S8	Orange	pléomorphe	+
8.2		Orange	ovale	+
8.3		Rouge	bâtonnet pléomorphe	+
9. OF.1	S9	Orange	pléomorphe	+
9. OC.2				

<sup>(a)</sup> présence des formes angulaires (triangle et trapézoïde) ; + : mobiles ; - : immobiles

### 3.2.3.1 Aspect macroscopique

L'examen microscopique avec la loupe binoculaire montre que les isolats forment des colonies muqueuses, lisses de petite taille de 1-2 mm de diamètre, de couleur rouge, orange ou rose, brillantes, convexes, opaques à bord régulier (fig.3.1).



**Figure 3.1.** Aspects macroscopique et microscopique des isolats. **A.** Colonies de couleur orange et blanche ont été obtenues à partir du site de prélèvement S6 sur MSH 15% de NaCl. **B.** colonies orange, brillantes, rondes, convexes et opaques de l'isolat S2-2. **E.** Cellules pleiomorphes colorées en rose par coloration de Dussault (grossissement  $\times 1000$ ). **C.** Photomicrographie électronique à balayage montrant des cellules de forme bacillaire de la souche

5RS8. D. Photomicrographie électronique à balayage montrant des cellules pléomorphes avec des formes triangulaire et trapézoïde particulières de la souche S1-1.

L'aspect visqueux des colonies est dû à la production des EPS. En fait, les bactéries et les archées halophiles produisent les EPS pour se protéger contre la dessiccation [172] et sont utiles pour former des biofilms [173].

### 3.2.3.2 Aspect microscopique

Toutes les cellules sont Gram négatif. Cette réaction négative est due à la structure particulière de leur paroi dépourvue de peptidoglycane [42]. A l'exception du genre *Natronococcus* (Gram variable), la plupart des *Halobacteria* sont Gram négatif [147].

La forme des cellules sous microscope optique et confirmée par le microscope à contraste de phase et électronique à balayage montre une diversité morphologique notable caractérisée par la forme bacillaire ordinaire chez les membres du genre *Halobacterium*, pléomorphe chez les membres du genre *Haloarcula*, cellules rondes ou ovales et aplaties chez les membres du genre *Haloferax*. Des formes inhabituelles ont également été observées par microscope électronique à balayage comme la forme triangulaire et trapézoïde. Selon Grant et al [174], la forme angulaire est largement répandue chez les *Haloarchaea* et particulièrement le genre *Haloarcula*. La forme des cellules des haloarchées est largement influencée par la concentration de NaCl et du magnésium ; A des concentrations faibles de NaCl la forme ronde ou ovale est la plus fréquente. Cependant, lorsque la concentration des ions magnésium est très élevée, les cellules adoptent une forme irrégulière en formant des agrégats en milieu liquide [175]. A l'exception de trois isolats (S2-4, 6.OF.4 et S5-3), tous les isolats sont mobiles.

### 3.2.3 Caractérisation biochimique des isolats

Tous les isolats montrent une réaction positive pour la catalase et l'oxydase. La croissance anaérobie en utilisant L-arginine a été observée chez 3 isolats. Les mêmes résultats ont été obtenus par Oren et Litchfield [152] qui ont indiqué que la croissance en anaérobiose sur L-arginine n'est pas un caractère commun chez les *Halobacteria*. En fait, la fermentation de l'arginine est un caractère spécifique au

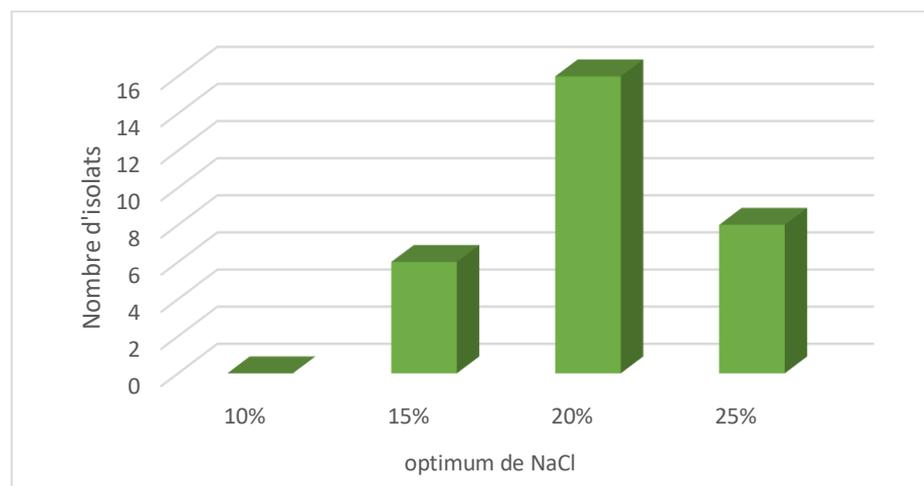
genre *Halobacterium* [152]. 16 souches sont capables de croître en anaérobiose en présence des nitrates comme accepteur final d'électrons.

La croissance en anaérobiose en présence de nitrates est largement répandue chez les Halobactéries [176, 72]. La plupart des haloarchées sont capables de croître en anaérobiose en présence de différentes substances chimiques en raison de la faible solubilité de l'oxygène en conditions de salinité élevée [177].

Le test d'utilisation des sucres comme seule source de carbone montre que le glucose et le saccharose sont les sucres les plus utilisés. Alors que S2-2, S2-8 et 7.OC.1 utilisent un nombre important de sucres, 5RS8 et S5-2 sont les isolats qui utilisent moins de sucres testés.

### 3.2.3.1 Salinité

L'isolement des haloarchées a été réalisé sur milieu contenant différentes concentrations de NaCl pour favoriser la croissance de la flore halophile au détriment des autres populations. A la température d'incubation 40°C, tous les isolats peuvent se développer à une concentration de NaCl de 25% (p/v) (4,2 M) avec un optimum de croissance allant de 15% (p/v) (2,5 M) à 25% (p/v) (4,2 M) selon la souche (Fig. 3.2).



**Figure 3.2.** Répartition des isolats archéens selon la concentration optimale de NaCl pour la croissance

A l'exception des souches 2.1, 6.OF.1, 6.OF.4 et 7.OC.1 qui sont capables de se développer à 10% (p/v) tous les autres isolats sont incapables de croître dans un

milieu contenant des concentrations de NaCl inférieures ou égale à 10% (p/v) (1,7 M). De plus, la lyse dans de l'eau distillée a été observée chez tous les isolats.

Ces résultats montrent que les souches isolées dans cette étude sont des halophiles obligatoires extrêmes incapables de se développer à des concentrations de NaCl inférieures à 10%. Kushner [39] a distingué entre les halophiles obligatoires modérés et extrêmes selon leurs réponses physiologiques au NaCl. En fait, les premiers nécessitent entre 0,5 M et 3,5 M de NaCl. Alors que les autres exigent des concentrations de NaCl allant de 3,5 M jusqu'à la saturation. Dans les environnements hypersalins, notamment ceux où la salinité dépasse 1,5 M, les deux principaux groupes de microorganismes qui prédominent sont les bactéries halophiles modérées et les microorganismes (archées et bactéries) halophiles extrêmes [178]. La température est un facteur critique qui influence largement la réponse des microorganismes au sel. Il a été rapporté que l'exigence en sel augmente avec l'augmentation de la température [179]. A titre d'exemple, *Haloferax volcanii* croit à des concentrations en NaCl allant de 1M à 4 M avec un optimum de 1,7 M à 30°C. Cependant, l'optimum de croissance est enregistré à 2,5 M avec un intervalle de croissance entre 1,1 M et 5,4 M de NaCl, à 40°C [180].

### 3.2.3.2 Sensibilité aux antibiotiques

Les données tirées du test de la sensibilité aux antibiotiques sont parmi les données les plus fortement requises dans le standard des données minimales proposé pour l'identification de nouveaux isolats dans l'ordre des *Halobactériales*. Ce test permet de différencier les archées qui ont large spectre de résistance aux agents antibactériens. De plus, il peut être exploité en biotechnologie pour exclure les souches archéennes halophiles indésirables. Dans cette étude, tous les isolats sont résistants à l'ampicilline, la gentamycine, le chloramphénicol, la cefazidine et l'acide nalidixique et sensibles à la novobiocine et la bacitracine. La sensibilité au triméthoprime, à la tétracycline et la néomycine est différente entre les isolats (tableau. 3.3).

**Tableau 3.3** : Résultats de la sensibilité des isolats aux antibiotiques

	S1-3	S1-1	1. OC.2	S2-2	2.1	S2-1	S2-3	S2-4	S2-5	S2-6
Amp	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ch	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Tet	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
Neo	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R
Trim	S	R	S	S	R	R	S	S	R	R
Nov	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Cef	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A. nx	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
G	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	S2-7	S2-8	S2-9	5RS8	S5-1	S5-2	S5-3	6. OF.1	6. OF. 3	6. OF.2
Amp	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ch	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Tet	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R
Neo	R	S	R	R	S	R		S	S	R
Trim	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S
Nov	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Cef	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A.nx	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
G	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	6. OF.4	6.OF.5	7. OC.1	7. OF.2	7. OC.3	8. OF.1	8.2	8.3	9. OF.1	9. OC.2
Amp	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ch	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Tet	R	R	R	S	R	S	R	R	S	S
Neo	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
Trim	S	S	R	S	R	S	R	S	R	R
Nov	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Cef	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A.nx	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
G	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Amp: ampicilline, Ch: chloramphenicol, Tet: tetracycline, Neo: néomycine, Trim: triméthoprime, Nov: novobiocine, B: bacitracine, Cef: ceftazidine, A.nx: acidenalidixique, G: gentamycine. R : résistant, S : sensible

Bonelo et al [181] ont indiqué que les membres de la classe *Halobacteria* sont généralement résistants aux antibiotiques actifs contre les bactéries comme la pénicilline, l'ampicilline et la néomycine. En ce qui concerne la sensibilité au chloramphénicol, des informations contradictoires ont été rapportées : bien que plusieurs rapports aient indiqué leur résistance au chloramphénicol, Pecher et Böck [182] ont déjà trouvé que le chloramphénicol a une action inhibitrice, et ils ont également signalé une certaine sensibilité à la tétracycline. La sensibilité à la bacitracine et la novobiocine est un trait caractéristique des archées halophiles. La novobiocine est un inhibiteur de l'ADN gyrase qui agit sur la même cible chez les archées que chez les bactéries sensibles [183]. La novobiocine bloque également la biosynthèse des caroténoïdes [184]. La bacitracine inhibe la synthèse de la paroi glycoprotéique et la biosynthèse des lipides chez les archées halophiles non coccoïde [185,186].

### 3.2.3.3. Test de sensibilité aux sels biliaires

Tous les isolats étaient sensibles aux sels biliaires. En effet, ce caractère est un trait caractéristique des haloarchées non coccoïdes [155].

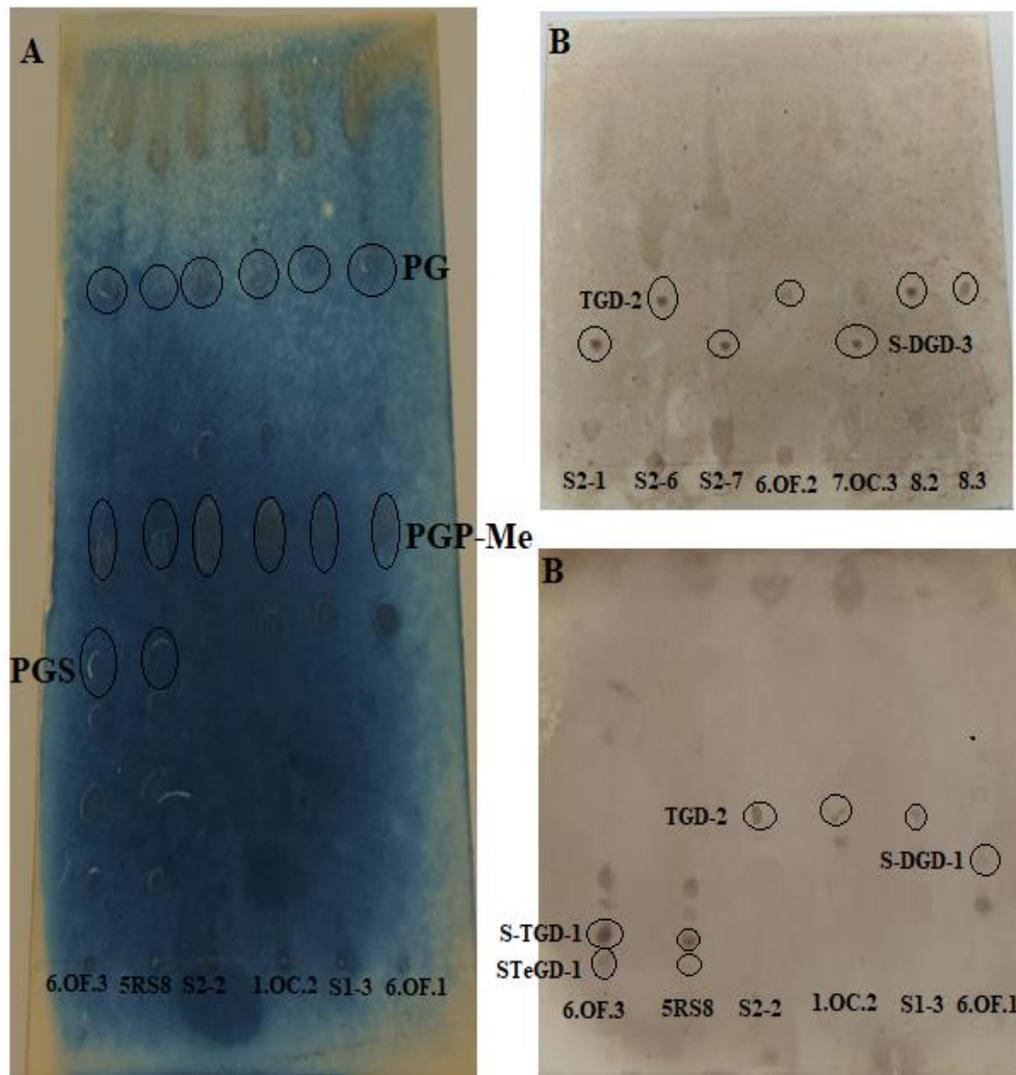
### 3.2.4 Caractérisation chimio taxonomique

Les lipides polaires qui représentent la fraction insoluble dans l'acétone de l'extrait lipidique sont des marqueurs taxonomiques importants pour l'identification des isolats à l'échelle du genre [186]. L'extrait de lipides totaux a été séparé par chromatographie sur couche mince et les principaux lipides polaires ont été déterminés en comparant les valeurs de Rf obtenues avec celles mentionnées dans la littérature. D'après les résultats, la présence des phospholipides de type Me-PGP et de PG chez tous les isolats confirme leur appartenance à la classe Halobacteria (Fig.3.3) [187]. La présence de PGS, S-TeGD-1 et S-TGD-1 chez les souches S2-9, 6.OF.3, 5RS8, S5-2 indiquent leur affiliation à l'espèce *Halobacterium salinarum* [31].

Les souches 1.OC.2, S1-3, S2-2, 2.1, S2-3, S2-5, S2-6, S2-8, S5-1, 6.OF.2, 7.OF.2, 8.2, 8.3, 8.OF.1, possèdent le glycolipide TGD-2 qui caractérise les membres du genre *Haloarcula* [31]. Bien que le glycolipide TGD-2 n'ait pas apparu dans le résultat de la CCM, les isolats S1-1, 9.OF.1 et 9.OC.2 ont été assignés au genre *Haloarcula* sur la base de leur identification moléculaire.

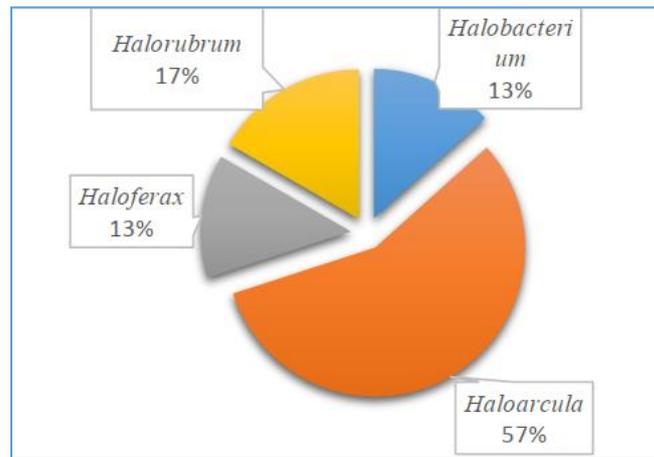
Les souches S2-4, S5-3, 6.OF.1 et 6.OF.4 se caractérisent par la présence du S-DGD-1 qui est un trait chimio taxonomique caractérisant les membres du genre *Haloferax* [189]. Les membres du genre *Halococcus* possèdent également ce glycolipide mais la forme des cellules et la lyse cellulaire dans de l'eau distillée suggéraient l'assignation de ces souches au genre *Haloferax*.

Quant aux souches S2-1, S2-7, 6.OF.5, 7.OC.1, 7.OC.3, elles ont le même glycolipide (S-DGD-3) que les membres du genre *Halorubrum* [190, 191].



**Figure 3.3.** Résultats de la chromatographie sur couche mince des lipides polaires membranaires des isolats archéens. **A.** Chromatogramme des phospholipides polaires. **B.** Chromatogramme des glycolipides. PG. phosphatidylglycérol ; PGP-Me. phosphatidylglycérol phosphate méthyl ester ; PGS. phosphatidylglycérol sulfate ; S-TeGD-1. tetraglycosyl sulfate di éther ; S-TGD-1. triglycosyl sulfate di éther ; S-DGD-1. diglycosyl sulfate di éther-1 ; TGD-2. triglycosyl di éther-2 ; S-DGD-3. diglycosyl sulfate di éther-3.

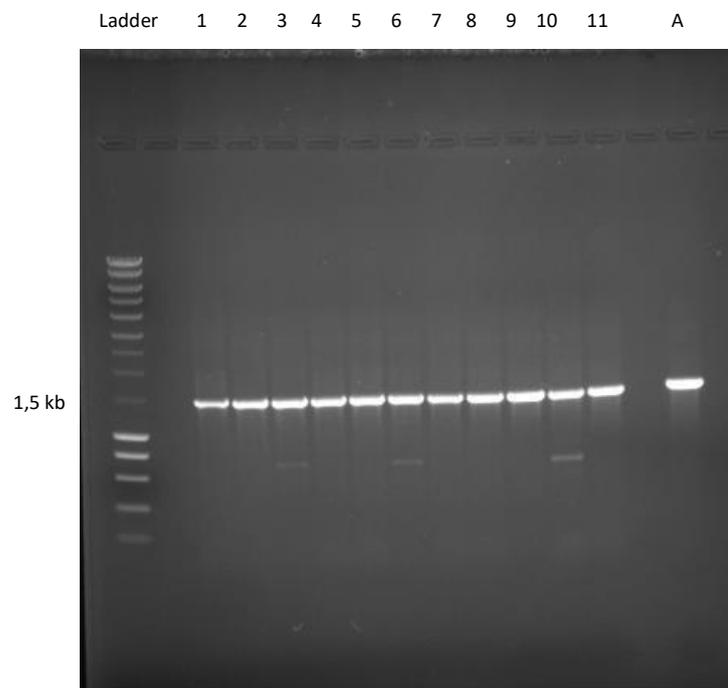
Les résultats de l'analyse des lipides polaires membranaires ont indiqué que les isolats testés appartenaient à quatre genres (*Haloarcula*, *Halorubrum*, *Haloferax* et *Halobacterium*) de la classe *Halobacteria* (Fig.3.4). Parmi les genres identifiés, *Haloarcula*, auquel appartenaient 56,66% des souches testées, est le genre le plus abondant par rapport aux autres.



**Figure 3.4.** Proportion des genres haloarchéens parmi les isolats selon la composition en lipides polaires

### 3.2.5 Caractérisation moléculaire

En raison de la biodiversité phénotypique et métabolique limitée au sein de ce groupe, la comparaison des gènes codant l'ARNr 16S constitue un outil taxonomique important pour l'identification des membres de la classe *Halobacteria* [73] en les rapprochant aux espèces existantes. En effet, l'utilisation de ce marqueur moléculaire a conduit à une nouvelle classification qui comporte la création de plusieurs nouveaux genres, la subdivision des genres existants et aussi dans de nombreux cas, la réintégration de deux espèces appartenant précédemment à deux genres séparés dans un seul genre [42]. La focalisation actuelle sur les données de séquençage du gène codant l'ARNr 16S pour déterminer la position phylogénétique des haloarchées a sous-estimé l'importance relative des lipides polaires comme marqueur chimiotaxonomique dans l'identification de ce groupe d'archées. L'inconvénient du marqueur chimiotaxonomique réside dans le fait que certains glycolipides peuvent être trouvés dans plus d'un genre et les membres de certains genres peuvent contenir plusieurs glycolipides [42]. L'amplification par PCR du gène codant l'ARNr 16S de chaque isolat a donné un amplicon de 1,5 kb (Fig. 3.5).



**Figure 3.5** Résultat de l'amplification du gène codant l'ARNr 16S sur gel d'agarose de 11 souches archéennes. Les colonnes de 1-11 correspondent à 8.OF.1, 1.OC.2, S1-3, S2-2, 2.1, 9.OF.1, 9.OC.2, 6.OF.3, 6.OF.1, S1-1, 5RS8. **A.** contrôle positif.

Les séquences brutes obtenues par séquençage Sanger sont traitées par le logiciel chromas (<https://chromas.software.informer.com/2.5/>) pour couper les nucléotides de faible qualité qui se trouvent aux extrémités et renommer les nucléotides non identifiés par le séquenceur (nucléotides N).

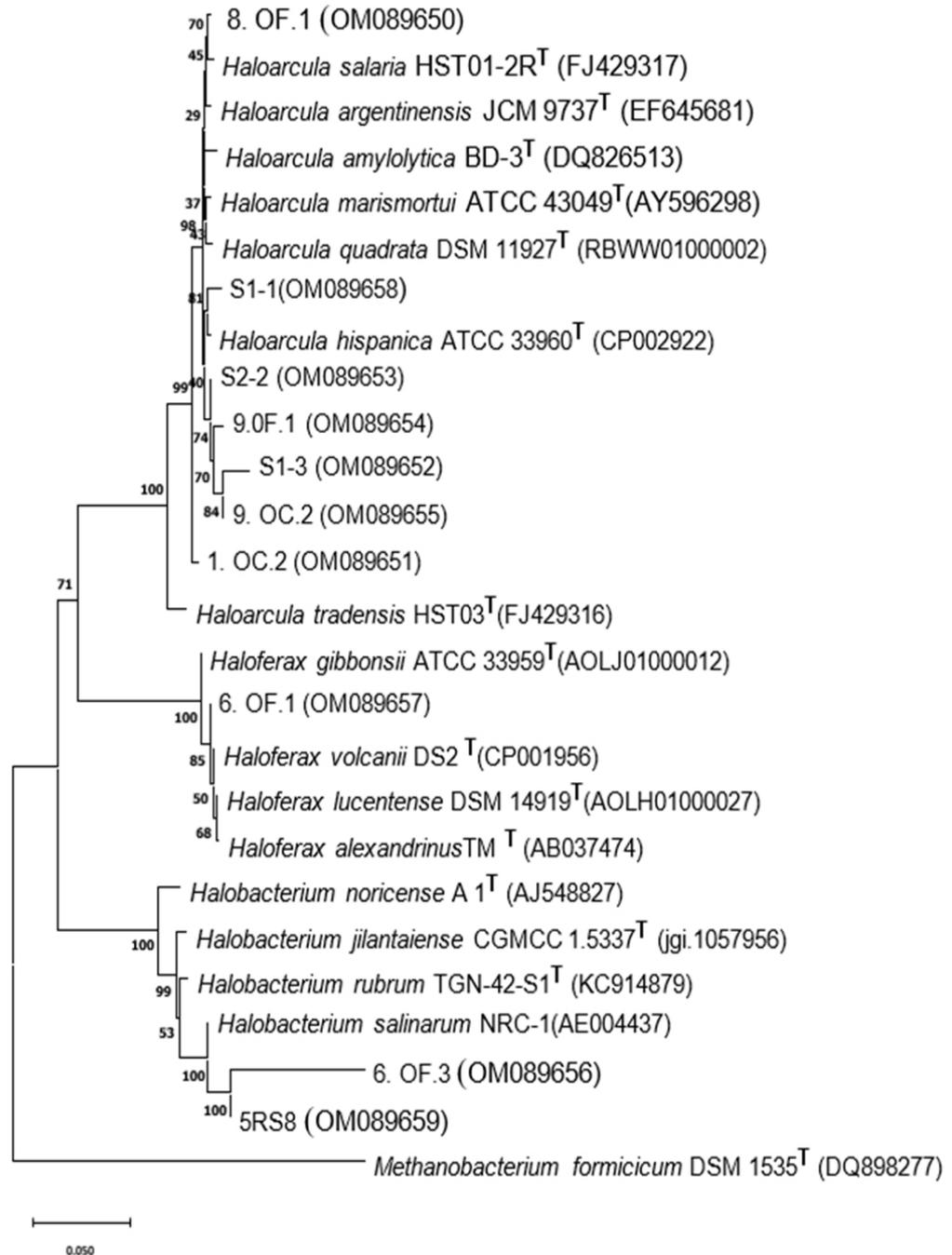
Les séquences traitées ont ensuite été déposées dans la base de données GenBank sous le numéro d'accèsion OM089650-OM089659, puis comparées avec les séquences références qui se trouvent dans deux banques de données génomiques (GenBank et EzTaxon) pour assigner chaque isolat au genre ou à l'espèce le plus proche avec un pourcentage de similitude. La séquence du gène codant l'ARNr 16S de la souche 2.1 avec les séquences de ce gène des autres dix-neuf souches qui ne figurent pas dans l'arbre phylogénétique ont été écartées de l'identification moléculaire parce qu'elles étaient endommagées.

Les résultats de comparaison des séquences cibles avec les séquences références montrent que tous les isolats appartiennent à la classe *Halobacteria*.

Parmi les dix souches identifiées, sept souches (S2-2, S1-3, 8.OF.1, 1.OC.2, 9.OF.1, 9.OC.2 et S1-1) ont été placées dans le genre *Haloarcula*. Deux souches (5RS8 et 6.OF.3) appartenaient au genre *Halobacterium* et une souche affiliée au genre *Haloferax*.

Les résultats EzTaxon des séquences du gène codant l'ARNr 16S extrait des différentes souches ont indiqué que les isolats S2-2 et 8.OF.1 montrent 99,90% et 99,47% de similitude avec la souche *Haloarcula argentinensis* JCM 9737, respectivement. Cependant, les isolats 9.OC.2, S1-1 et 9.OF.1 étaient proches de la souche *Haloarcula hispanica* ATTC 33960 avec un taux de similitude d'environ 99%. S1-3 était également affiliée à la souche *Haloarcula hispanica* ATTC 33960 avec 98,53% de similitude. 1.OC.2 était fortement apparentée à *Haloarcula salaria* HST01-2R avec 99,30% de similarité. L'isolat 6.OF.1 a montré une grande similitude (99,90%) avec la souche référence *Haloferax lucentense* DSM 14919. Les deux souches 5RS8 et 6.OF.3 étaient affiliées à la souche *Halobacterium salinarum* NRC-1 avec 99,86% et 98,84% de similarité, respectivement.

Afin d'établir les liens de parenté entre les 10 isolats testés, plusieurs arbres phylogénétiques ont été construits par la méthode Neighbor-joining en utilisant plusieurs modèles de substitution. L'arbre phylogénétique est en fait le même pour tous les modèles de substitution utilisés. Selon la figure 3.6, 8.OF.1 et *Haloarcula salaria* HST01-2R étaient fortement apparentées. Elles présentent 99,47% de similitude. De plus, L'isolat S2-2 présente 99,50% de similitude avec la souche *Haloarcula hispanica* ATTC 33960. Quant à la séquence du gène codant l'ARNr 16S qui correspond à l'isolat 6.OF.1, elle est regroupée dans le clade qui comprenait *Haloferax lucentense* DSM 14919 et *Haloferax alexandrinus* TM (99,80% de similarité entre les séquences). L'isolat 1.OC.2 qui n'est pas fortement apparenté aux membres du genre *Haloarcula* pourrait appartenir à une nouvelle espèce d'où la nécessité de réaliser d'autres tests complémentaires comme le séquençage du gène codant la sous unité B' de l'ARNp DNA-dépendant, l'hybridation ADN-ADN et le taux GC pour pouvoir affilier cet isolat.



**Figure 3.6.** Analyse phylogénétique des isolats haloarchéens basée sur la comparaison des séquences du gène codant l'ARNr 16S de dix isolats avec celles des seize souches type proches. L'arbre phylogénétique établi par la méthode Neighbor-joining a été déduit par le modèle à deux paramètres de Kimura et exprimé en termes de nombre de bases par site. Les valeurs de bootstrap basées sur 1000 analyses (>50%) sont figurées au niveau des nœuds de l'arbre. La barre d'échelle représente 5% de divergence de séquence estimée.

En se basant sur les résultats de l'identification polyphasique de l'approche culturale, *Haloarcula* est le genre dominant. Ces résultats s'accordent avec ceux trouvés par Mani et al [192]. Par contre, plusieurs études ont rapporté la prédominance du genre *Halorubrum* dans les environnements hypersalins [193, 194, 195]. Dans une autre étude menée sur les écosystèmes hypersalés algériens, Menasria et al [196] ont indiqué que le genre *Haloferax* a remarquablement prédominé le total des isolats archéens obtenus (44,12%). La prédominance du genre *Haloarcula* dans ce présent travail pourrait être due à plusieurs facteurs comme la technique d'isolement choisie, le milieu de culture utilisé pour cette étape et la nature chimique des échantillons d'eau prélevés qui contiennent des concentration élevée en ions magnésium. En fait, le milieu utilisé dans cette étude contient de l'extrait de levure comme source de carbone et d'énergie. Cependant, dans les études où ils ont rapporté l'abondance du genre *Halorubrum*, le milieu employé est le milieu MGM qui contient l'extrait de levure et le peptone comme source de carbone et d'énergie [193,194,197]. De plus, l'enrichissement qui précède l'étape d'isolement semble une étape cruciale pour augmenter le nombre des populations présentes en faible concentrations. Il faut noter également que la concentration élevée des ions magnésium dans un écosystème hypersalin favorise certains genres (*Haloferax* et *Haloarcula*) par rapport aux autres [198].

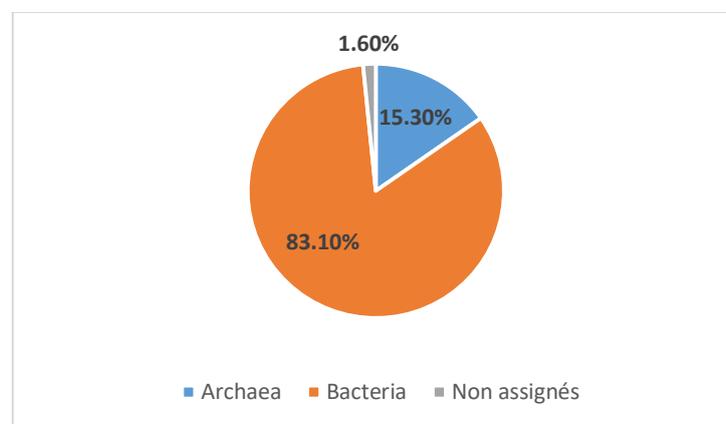
### 3.3 Analyse métagénomique de la diversité microbienne de l'eau hypersaline du rocher de sel

Dans ce présent travail, la métagénomique ciblée (métagénomique amplicon) de la technologie Illumina Hiseq 4000 a été utilisée pour le profilage du microbiote présent dans les échantillons d'eau hypersalée du rocher de sel. Cette technique indépendante des approches culturales permet de séquencer un locus génomique qui va servir de sorte de code barre pour identifier les microorganismes présents dans l'échantillon en question [199]. Le locus génomique de l'ADNe ciblé est la région V4-V5 de l'ADNr 16S. Le choix de cette région s'est basé sur le fait qu'elle est plus discriminative pour le phylum *Euryarchaeota* [200] auquel appartiennent les archées halophiles qui sont considérés comme habitants ordinaires de ce type d'écosystèmes extrêmes.

### 3.3.1 Structure de la communauté procaryote de l'eau du rocher de sel

A la suite d'une sélection stricte des séquences de qualité et leur regroupement (clustering), les différents OTUs (Operational Taxonomic Unit) identifiés dans les échantillons d'eau du rocher de sel ont été classés en différents phyla, classes, ordres, familles, genres et espèces.

Les séquences relatives aux bactéries se sont avérées plus abondantes que celles des archées (83,1% des séquences détectées appartiennent au domaine Bacteria, alors que 15,3% ont été attribuées au domaine Archaea) (Fig. 3.7). 1,6% des séquences n'ont pas été assignées.



**Figure 3.7.** Composition moyenne de la communauté procaryote de l'eau du rocher de sel

Dans une étude antérieure menée sur la diversité des microorganismes indigènes halophiles d'une mine de sel au Pakistan, le séquençage haut-débit basé sur l'amplification de la région V<sub>3</sub>-V<sub>4</sub> de l'ARNr 16S a révélé que les séquences affiliées aux bactéries représentent 66% de la totalité des séquences détectées dans les saumures, alors que 18% des séquences ont été assignées au domaine des archées [201]. Une autre étude réalisée sur les écosystèmes hypersalins algériens (métagénomique ciblée de la région V<sub>4</sub>) montrait que la fraction archéenne représentait en moyenne totale 20% de la communauté microbienne analysée, alors que 75% des séquences ont été assignées aux bactéries [7].

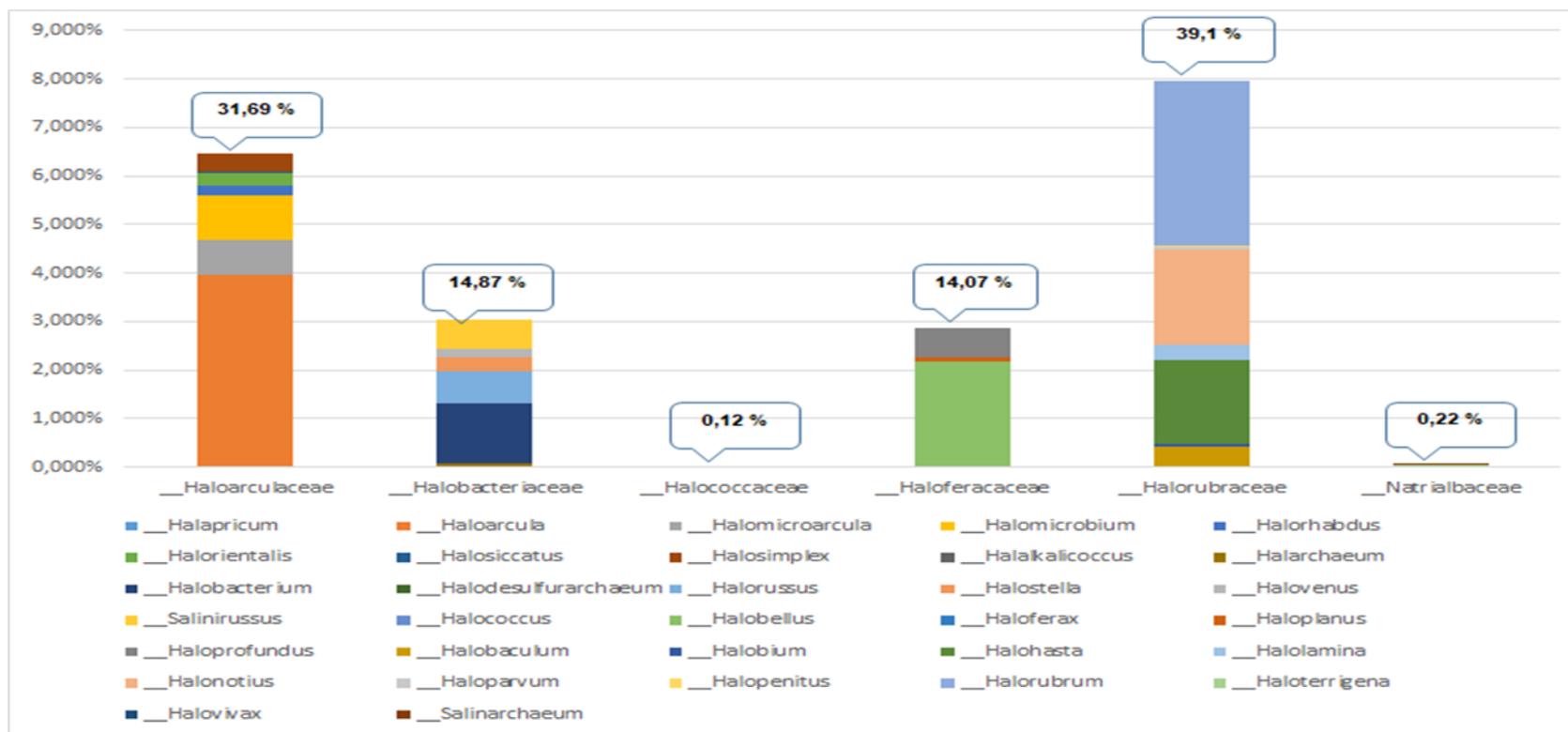
A la différence des résultats de ce présent travail, l'étude de la diversité de la communauté microbienne de l'eau hypersalée de la mer morte par la métagénomique ciblée montrait que les archées présentaient 52%, alors que les bactéries constituaient 45% des séquences totales [20].

Les cinq (5) phyla les plus abondants qui ont contribué jusqu'à 95,5% de la diversité microbienne procaryote moyenne des saumures du rocher de sel sont : *Proteobacteria* (46,2%), *Euryarchaeota* (15,3%), *Firmicutes* (11,9%), *Bacteroidetes* (11,5%) et *Actinobacteria* (10,6%). Les autres onze (11) phyla (*Balneolaeota*, *Rhodothermaeota*, *Cyanobacteria*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Lentisphaerae*, *Planctomycetes*, *Synergistetes*, *Tenericutes* et *Verrucomicrobia*) représentaient une fraction minoritaire de la diversité procaryote totale. Les résultats de notre étude sont en accord avec ceux de l'analyse métagénomique des saumures d'une mine de sel au Pakistan et ceux de la mer morte. Dans la première étude, ils ont rapporté que les phyla *Proteobacteria* (40,6%), *Euryarchaeota* (22,8%) et *Bacteroidetes* (17,8%) contribuaient jusqu'à 81,2% de la diversité procaryote [201], tandis que dans la deuxième, ils ont indiqué que les *Proteobacteria* et les *Firmicutes* étaient les deux principaux groupes majoritaires qui représentaient ensemble 98% du domaine *Bacteria* [20]. En revanche, les deux phyla *Firmicutes* et *Actinobacteria* étaient des groupes minoritaires dans cette mine de sel [201].

#### 3.3.1.1 Structure de la communauté archéenne globale

Après l'analyse des lectures, environ 100% des séquences appartenant au domaine des archées sont placées dans le phylum *Euryarchaeota* et la classe *Halobacteria*.

A l'échelle de la famille, *Halorubraceae* ( $\approx 39\%$ ) est la famille dominante dans la classe *Halobacteria* suivie de la famille *Haloarculaceae* ( $\approx 31\%$ ). D'autres familles ont également été détectées dans la classe *Halobacteria* comme la famille des *Halobacteriaceae* ( $\approx 15\%$ ) et des *Haloferacaceae* ( $\approx 14\%$ ). La comparaison entre les deux approches indiquait que les isolats obtenus par les approches culturelles appartenaient également aux familles détectées par l'approche métagénomique. Cependant, plusieurs genres de la classe *Halobacteria* détectés par l'approche métagénomique (Fig.3.8) n'ont pas été mis en évidence dans l'approche culturelle.



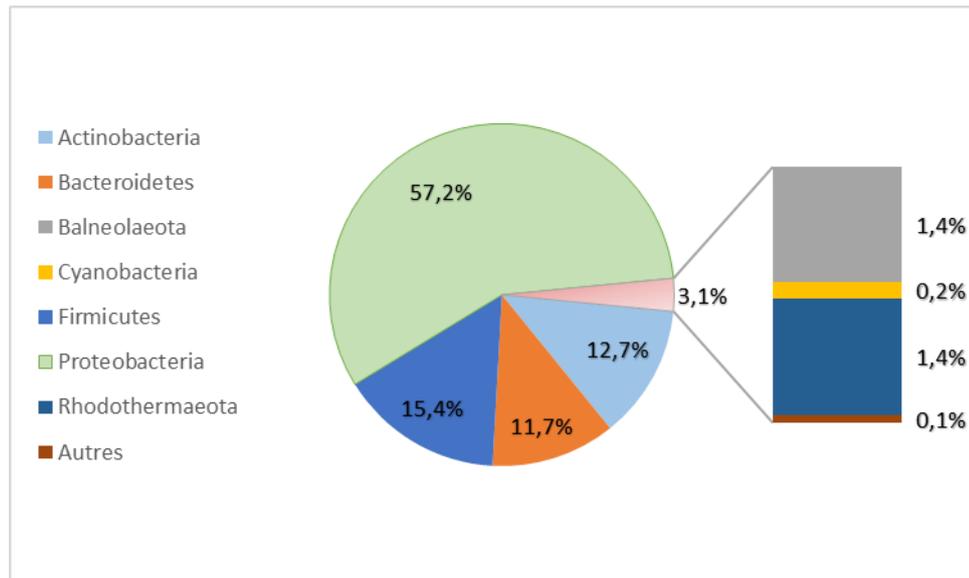
**Figure.3.8.** Abondance relative moyenne des différents genres de la classe Halobacteria dans l'eau hypersalée du rocher de sel (la communauté archéenne de l'échantillon S4 n'a pas été montrée sur cette figure).

Ces résultats indiquent que les membres des genres *Haloarcula*, *Halorubrum*, *Haloferax* et *Halobacterium* sont facile à les mettre en culture par rapport aux autres genres.

Les principaux genres de la classe Halobacteria qui prédominent dans les échantillons d'eau hypersalée du rocher de sel (Fig.3.8) sont : *Haloarcula* (≈ 20%), *Halorubrum* (≈ 17%), *Halonotius* et *Halobellus* (≈ 10% pour chacun) ; *Halohasta* (≈ 8%) ; *Halobacterium* (≈ 6%) ; *Halomicrobium* (≈ 5%) ; *Halomicroarcula*, *Halorussus*, *Haloprofundus* et *Salinirussus* (≈ 3% pour chacun) ; *Halorhabdus*, *Halobaculum* et *Halosimplex* (≈ 2% pour chacun) ; *Halorientalis*, *Halostella*, *Halovenus* et *Halolamina* (≈ 1% pour chacun). Ces résultats s'accordent avec ceux de l'approche culturale qui montraient également la prédominance des membres du genre *Haloarcula*. Inversement à nos résultats, l'analyse métagénomique menée sur la biodiversité microbienne de la mer morte en 2017 montrait la prédominance des genres *Halorhabdus* (52%) et *Natronomonas* (16%). De plus, le genre dominant (*Halorubrum*) dans les échantillons d'eau du rocher de sel ne représentait que 3% des haloarchées existant dans la mer morte [20].

### 3.3.1.2 Structure de la communauté bactérienne globale

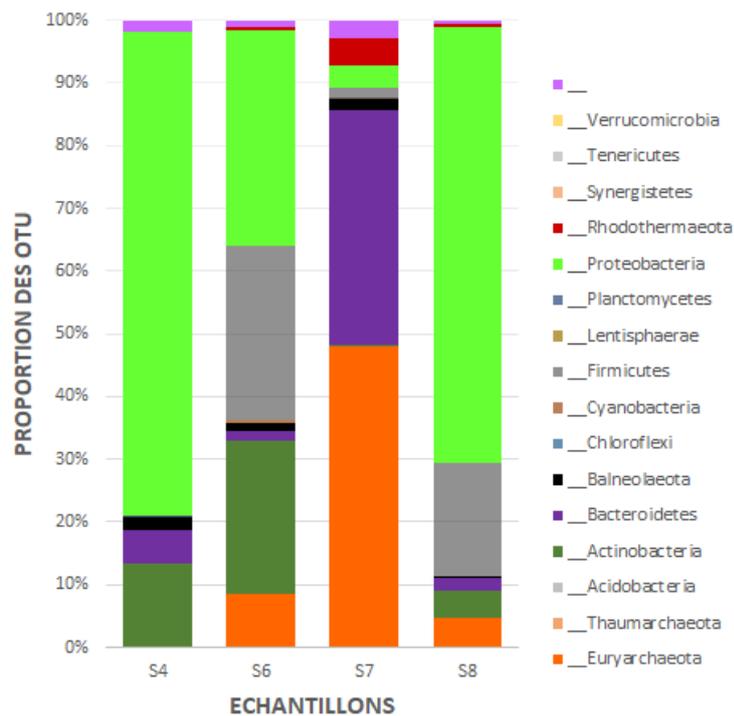
Dans cette étude, les séquences appartenant au domaine *Bacteria* ont été dominées par les séquences assignées aux phyla *Proteobacteria* (≈ 57,2%), *Firmicutes* (≈ 15,4%), *Bacteroidetes* (≈ 11,7%), et *Actinobacteria* (≈ 12,7%). D'autres phyla minoritaires ont également été détectés comme *Rhodothermaeota* (≈ 1,4%), *Balneolaeota* (≈ 1,4%), et *Cyanobacteria* (≈ 0,2%) (Fig. 3.9).



**Figure 3.9.** Composition de la communauté bactérienne dans l'ensemble des échantillons d'eau du rocher de sel

### 3.3.2 Structure de la communauté procaryote par échantillon

Les séquences assignées au domaine des archaea ont principalement été identifiées dans les échantillons S6, S7 et S8 qui montrent une salinité supérieure ou égale à 25%. L'abondance relative du phylum *Euryarchaeota* dans l'échantillon S7 est la plus importante (Fig.3.10). Elle est estimée à environ 48,1% de la diversité procaryote totale. Cette présence considérable pourrait être liée à la salinité élevée (44,7%) enregistrée dans cet échantillon. Le taux faible des haloarchées ( $\approx 0,007\%$ ) dans l'échantillon S4 pourrait être expliqué par la faible salinité (3,1%) qui entraîne la lyse cellulaire de la plupart des membres de la classe *Halobacteria*. En effet, les haloarchées sont considérés comme les procaryotes les mieux adaptés aux fortes concentrations de sel. Ils peuvent se développer facilement en aérobiose dans des milieux contenant 20 à 25% de NaCl [202].



**Figure 3.10.** Abondance relative des taxons phylogénétiques archéens et bactériens dans chaque échantillon à l'échelle du phylum.

Le phylum *Thaumarchaeota* n'a été détecté que dans l'échantillon S6 avec un taux très faible ( $\approx 0,009\%$ ) par rapport à la diversité procaryote totale. A l'échelle du genre, Vingt-trois (23) genres archéens de la classe *Halobacteria* (*Haloarcula*, *Halomicroarcula*, *Halomicrobium*, *Halorhabdus*, *Haloorientalis*, *Halosimplex*, *Haloarchaeum*, *Halobacterium*, *Halodesufuarchaeum*, *Halorussus*, *Halostella*, *Halovenus*, *Salinirussus*, *Halobellus*, *Haloplanus*, *Haloprofundus*, *Halobaculum*, *Halohasta*, *Halolamina*, *Halonotius*, *Haloparvum*, *Halopenitus* et *Halorubrum*) sont commun entre S6, S7 et S8. Toutefois, six (6) genres archéens (*Halapricum*, *Halosiccatus*, *Halobium*, *Haloterrigena*, *Halovivax* et *Salinarchaeum*) ont été détectés seulement dans S7. Les deux échantillons S6 et S7 partageaient les OTUs assignés aux genres *Halakalicoccus* et *Halococcus*. S7 et S8 se sont caractérisés par la présence du genre *Haloferax* mais à très faible concentration.

En comparant les quatre d'échantillons d'eau du rocher de sel, la communauté bactérienne de l'échantillon S7 se distingue de celle des autres échantillons par l'abondance remarquable des séquences attribuées au phylum *Bacteroidetes* qui représente environ 76,3% de la diversité bactérienne et 37,4% de la diversité procaryote de cet échantillon. Ce groupe a également été identifié parmi les phyla bactériens abondants dans de nombreux environnements hypersalins. Il représentait 39,86% de la communauté bactérienne du sel commercial Afdera Ethiopien [203] et 60% de l'ensemble des clones identifiés dans dans la mine de sel de Qiaohou au sud-ouest de la Chine [204].

L'intérêt particulier porté à ce phylum est lié au genre *Salinibacter* qui est connu comme représentant des bactéries halophiles extrêmes dans le domaine *Bacteria*. Son abondance relative a été estimée à environ 48,45% du phylum *Bacteroidetes*. En effet, le genre *Salinibacter* est largement répandu dans les milieux hypersalins et constitue de 5% à 25% de la communauté procaryote qui existe dans les bassins de cristallisation [205]. Toutefois, ce phylum constituait une fraction minoritaire de la communauté bactérienne rencontrée dans les échantillons S4, S6 et S8 par une abondance relative égale à 5,3%, 1,7% et 2,1%, respectivement.

Comme le cas des *Euryarchaeota*, le phylum *Rhodothermaeota* n'a été détecté que dans les échantillons d'eau hypersalée des sites S6, S7 et S8 avec une abondance relative égale à environ 0,5%, 8,8% et 0,6% des séquences bactériennes détectées, respectivement. Le genre *Salinivenus* est le seul représentant de ce phylum dans les trois échantillons. Les membres de ce genre sont des halophiles extrêmes isolés du lac salé Bidgol situé dans la partie centrale de l'Iran. Ils forment des colonies rouge-orange et se développent à des concentrations de NaCl allant de 11,6% à 29,2% avec un optimum égal à 17,5% [206].

D'autre part, le phylum *Actinobacteria* constitue une fraction minoritaire dans l'échantillon S7 avec une abondance relative égale à environ 0,4% de la totalité des séquences affectées au domaine des bactéries. Dans les sites S4, S6 et S8, ce phylum constitue environ 13,7%, 27,1% et 4,6% de la diversité bactérienne, respectivement, avec dominance de la famille des *Microbacteriaceae*.

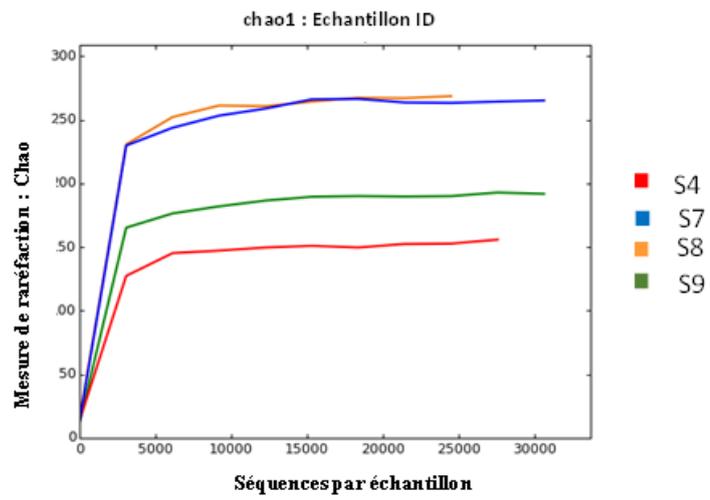
Dans la mine de sel de Karak au Pakistan, le phylum *Actinobacteria* est parmi les groupes bactériens minoritaires [201]. Par contre, il fait partie des phyla majoritaires identifiés dans le sel commercial Ethiopien et Koréen [203].

Quant au phylum *Proteobacteria*, il contribuait à lui seul à environ 78,7%, 38,1% et 73,3% des séquences bactériennes identifiées dans les échantillons S4, S6 et S8, respectivement. Par contre, ce phylum est moins important dans l'échantillon S7 avec une abondance relative égale à environ 7,2%. La proportion importante des protéobactéries n'est peut-être pas surprenante car ce phylum regroupe de nombreux genres connus pour leur diversité métabolique et leur omniprésence, ce qui leur permettent de survivre dans les environnements extrêmes en utilisant divers composés carbonés pour préserver le mode de vie aérobie et anaérobie [207]. En effet, l'abondance importante de ce phylum a également été observée dans d'autres rapports [20,201]. Parmi les *Proteobacteria*, Gamma *Proteobacteria* est la classe prédominante ( $\approx 29,4\%$ ) suivie par les classes Beta *Proteobacteria* ( $\approx 25,8\%$ ), Alpha *Proteobacteria* ( $\approx 17,2\%$ ) et Delta *Proteobacteria* ( $\approx 4,3\%$ ). L'abondance de la classe Gamma *Proteobacteria* a également été indiquée dans d'autres milieux hypersalins [201, 208] avec la classe Alpha *Proteobacteria* [209].

Contrairement aux résultats de ce présent travail qui ont montré que la famille des *Enterococcaceae* est majoritaire dans le phylum des *Firmicutes*, la famille des *Bacillaceae* (principalement le genre *Bacillus*) prédomine dans le groupe des *Firmicutes* dans la mer morte [20]

### 3.3.3 Diversité alpha

Pour la diversité alpha, la raréfaction diffère d'un échantillon à un autre (Fig. 3.11) ; l'échantillon S4 a été raréfié à environ 6000 séquences, S7 à 15000, S8 à 8000 et S9 à 2500. Le tracé de la courbe d'indice de Chao qui atteint un plateau aux points déjà cités pour les quatre échantillons et l'indice de couverture (Good's coverage  $\approx 0,99$ ) indiquent que la profondeur du séquençage était suffisante pour capturer toute l'étendue de la diversité microbienne.



**Figure 3. 11.** Courbe de raréfaction par calcul basé sur la similitude entre les séquences à 97%.

### 3.4 Criblage des souches productrices d'enzymes

Le screening d'activités enzymatiques hydrolytiques extracellulaires (amylase, cellulase, protéase, gélatinase, estérase, lipase et lécithinase) chez 30 isolats archéens est résumé dans le tableau.3.4.

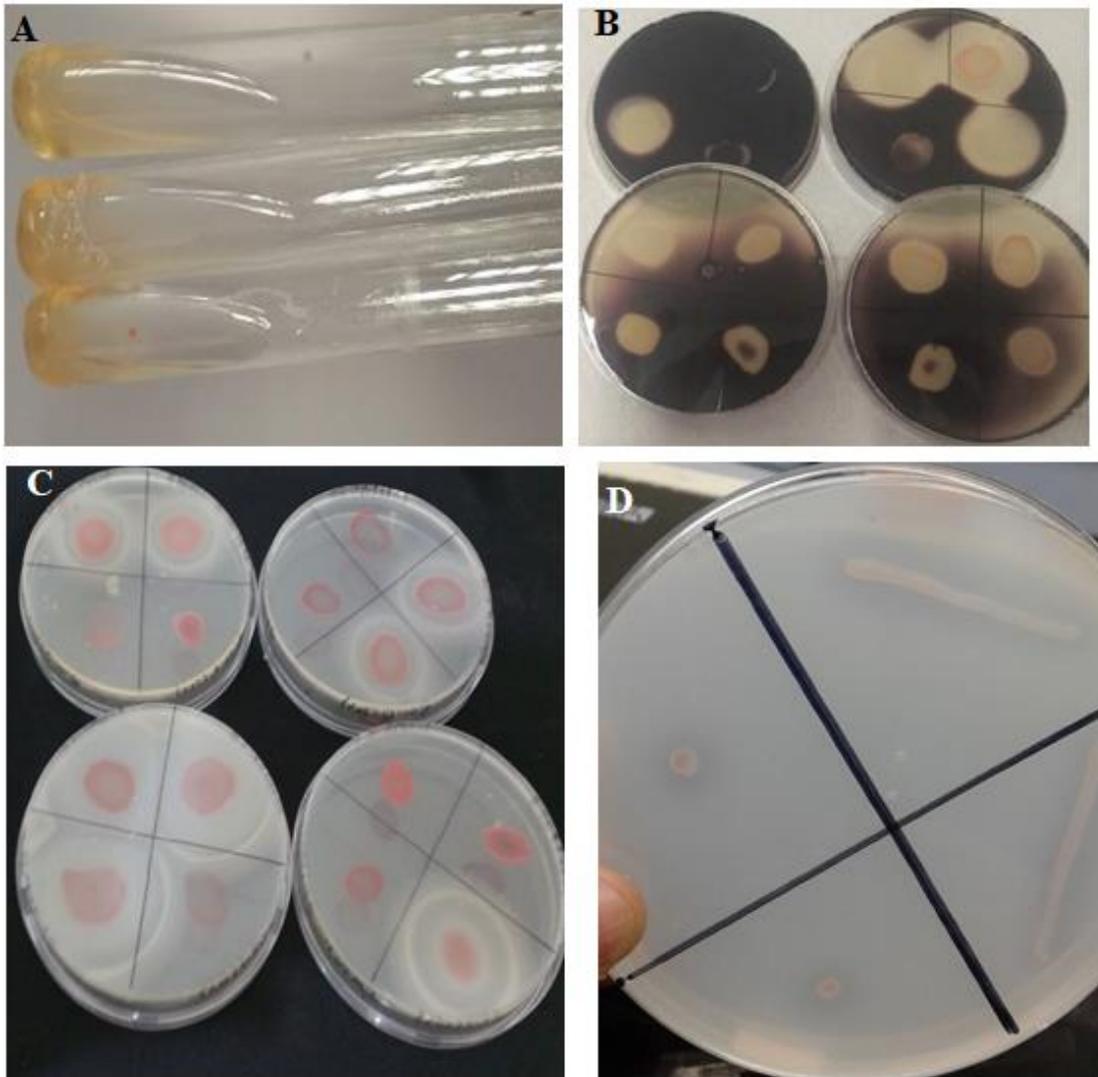
**Tableau 3.4** : Résultats de criblage des enzymes hydrolytiques

	Enzymes						
	Estérase	Lipase	Lécithinase	Gélatinase	Caséinase	Amylase	Cellulase
<b>S1-1</b>	-	-	-	+	-	-	-
<b>S1-3</b>	-	-	-	+	-	-	-
<b>1. OC.2</b>	-	-	-	+	-	-	-
<b>S2-2</b>	+	-	+	+	+	+	-
<b>2.1</b>	+	-	+	+	+	+	-
<b>S2-1</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>S2-3</b>	-	-	-	+	-	+	-
<b>S2-4</b>	+	-	+	+	+	+	-
<b>S2-5</b>	+	-	-	-	-	-	-
<b>S2-6</b>	-	-	-	-	-	+	-
<b>S2-7</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>S2-8</b>	+	-	+	+	+	+	-
<b>S2-9</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>5RS8</b>	-	-	-	+	-	-	-
<b>S5-1</b>	-	-	-	+	-	-	-
<b>S5-2</b>	-	-	-	-	+	-	-
<b>S5-3</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>6. OF.1</b>	-	-	-	+	-	-	-
<b>6. OF.3</b>	-	-	-	+	-	-	-
<b>6. OF.2</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>6. OF.4</b>	-	-	-	-	-	+	-
<b>6. OF.5</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>7. OC.1</b>	-	-	-	-	-	+	-
<b>7. OF.2</b>	+	-	-	+	-	+	-
<b>7. OC.3</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>8. OF.1</b>	-	-	-	+	-	-	-
<b>8.2</b>	-	-	+	-	-	-	-
<b>8.3</b>	-	-	-	-	-	+	-
<b>9. OF.1</b>	-	-	-	+	-	+	-
<b>9. OC.2</b>	-	-	-	+	-	+	-

Ce test qualitatif (Fig.3.12) a révélé que 40% des souches (12) sont pourvues d'une activité amylase, 13,33% (4) d'isolats produisent de la caséinase, 53,33% (16) de souches sont capables d'hydrolyser de la gélatine, 20% (6) des souches montrent une activité estérase et 16,66% (5) des souches produisent de la lécithinase. Les activités lipase et cellulase n'étaient pas observées chez les souches testées. La production combinée de plusieurs enzymes hydrolytiques a été observée chez certaines souches ; 4 souches (S2-2, 2.1, S2-4 et S2-8) présentent 5 activités hydrolytiques (estérase, caséinase, gélatinase, amylase et lécithinase), une souche (7.OF.2) montre 3 activités enzymatiques (amylase, gélatinase et estérase) et 3 souches (9.OC.2, 9.OF.1 et S2-3) produisent de l'amylase et de la gélatinase.

D'après ces résultats, la gélatinase et l'amylase sont les activités les plus abondantes chez les souches testées. L'activité estérase est classée en troisième position suivie par l'activité lécithinase.

Dans une étude précédente réalisée sur les archées des zones humides arides et semi-arides algériennes, les auteurs ont rapporté que l'activité gélatinase est parmi les activités les plus abondantes après l'activité estérase tandis que l'activité amylase est parmi les activités hydrolytiques les moins répandues [196]. Une autre étude menée sur les lacs saumâtres et hypersalés de la Roumanie a montré que l'activité hydrolytique des archées isolées est limitée à la production d'amylase et de cellulase [164]. Cependant, Quadri et al [6] ont indiqué que les enzymes hydrolytiques les plus courantes parmi 43 isolats haloarchéens testés étaient l'estérase, la protéase et l'amylase avec une abondance de 60%, 58% et 37%, respectivement. Concernant la production de lipase et de cellulase, plusieurs chercheurs ont indiqué que peu d'haloarchées produisent de la lipase [114] et de cellulase [210].



**Figure 3.12.** Résultats de la mise en évidence de certaines activités enzymatiques hydrolytiques chez quelques souches archéennes du rocher de sel. **A.** non gélification du milieu à 4°C à la suite de l'hydrolyse de la gélatine par les souches productrices de gélatinase. **B.** zone claire autour de la souche indique la présence de l'activité amylase. **C.** Estérase + se traduit par un halo opaque autour de la colonie. **D.** Caseinase + se traduit par un halo clair autour de la colonie.

# **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le but principal de cette étude était d'explorer la diversité microbienne procaryote des échantillons de saumures prélevés du rocher de sel de Djelfa, un environnement hypersalin situé dans la région steppique, semi-aride de l'Algérie. Pour atteindre ce but, une approche culturale a été adoptée pour pouvoir isoler et identifier la fraction cultivable des archées halophiles. Les souches ainsi identifiées par approche polyphasique ont été testées qualitativement pour la production d'enzymes hydrolytiques extracellulaires. Une approche indépendante des méthodes culturales « la métagénomique ciblée de la technologie NGS » a été réalisée pour une étude plus approfondie de la communauté microbienne procaryote halophiles et halotolérantes qui colonise ce type d'environnement extrême en termes de richesse et d'abondance relative. Les différentes techniques utilisées dans cette étude ont conduit aux résultats suivants :

La salinité élevée (258,68 g/l-493,91 g/l) et le pH légèrement acide à neutre (6,55-7,36) indiquaient que les saumures du rocher de sel analysées constituent un habitat adéquat pour le développement des communautés microbiennes halophiles neutrophiles extrêmes qui nécessitent au moins 1,5 M de NaCl pour leur croissance et un optimum de 3,5 M à 4,5 M en chlorure de sodium.

Sur la base des lipides polaires et le séquençage de l'ADNr 16S, l'analyse de la diversité culturale archéenne des échantillons de saumures du rocher de sel indiquait que les isolats archéens ont été affiliés à quatre genres de la classe *Halobacteria* à savoir *Haloarcula* (57%), *Halorubrum* (17%), *Halobacterium* (13%) et *Haloferax* (13%).

L'analyse de la diversité microbienne procaryote des échantillons de saumures du rocher de sel par séquençage haut-débit de la technologie NGS en ciblant la région hypervariable V<sub>4</sub>-V<sub>5</sub> a révélé que les séquences relatives au domaine *Bacteria* se sont avérées plus abondantes que celles des archées. En fait, 83,1% des séquences analysées appartiennent au domaine *Bacteria*, alors que 15,3% ont été attribuées au domaine *Archaea*.

L'analyse des séquences relatives aux archées montrait que ≈100% des séquences appartenaient au phylum *Euryarchaeota* et la classe *Halobacteria* avec

18 genres et 4 familles. *Halorubraceae* ( $\approx 39\%$ ) est la famille dominante dans la classe *Halobacteria* suivie de la famille *Haloarculaceae* ( $\approx 31\%$ ). D'autres familles ont également été détectées dans cette classe comme la famille des *Halobacteriaceae* (15%) et celle des *Haloferacaceae* ( $\approx 14\%$ ).

En ce qui concerne le domaine *Bacteria*, il a été dominé par les phyla *Proteobacteria* (57,2%), *Firmicutes* (15,4%), *Bacteroidetes* (11,7%) et *Actinobacteria* (12,7%). D'autres phyla minoritaires ont également été détectés comme *Balneolaeota*, *Rhodothermaeota* et *Cyanobacteria*.

Le screening d'activités enzymatiques hydrolytiques extracellulaires (amylase, cellulase, protéase, gélatinase, estérase, lipase et lécithinase) chez les isolats archéens a révélé que 40% des souches sont pourvues d'une activité amylase, 13,33% d'isolats produisent de la caséinase, 53,33% de souches sont capables d'hydrolyser de la gélatine, 20% des souches montrent une activité estérase et 16,66% des souches produisent de la lécithinase. Les activités lipase et cellulase n'étaient pas observées chez les souches testées. La production combinée de plusieurs enzymes hydrolytiques a été observée chez certaines souches ; 4 souches (S2-2, 2.1, S2-4 et S2-8) présentent 5 activités hydrolytiques (estérase, caséinase, gélatinase, amylase et lécithinase), une souche (7.OF.2) montre 3 activités enzymatiques (amylase, gélatinase et estérase) et 3 souches (9.OC.2, 9.OF.1 et S2-3) produisent de l'amylase et de la gélatinase.

A travers de cette étude, il apparait clairement que l'analyse métagénomique ciblée nous a fourni un inventaire des principaux genres procaryotes présents dans les échantillons de saumures, ce qui facilite l'étude de la biodiversité microbienne par les techniques conventionnelles en termes du choix du milieu culture approprié afin d'augmenter les chances d'isoler des espèces présentant des potentialités biologiques importantes.

Il faut souligner également que malgré la similitude superficielle des environnements hypersalins à travers le monde, surtout lorsque la concentration en sel est proche de la saturation, la composition des communautés microbiennes dans les environnements hypersalins peut être nettement différente à différents endroits géographiques.

D'une manière générale, le but de cette étude a été en grande partie atteint, bien que certaines étapes prévues à effectuer n'aient pas pu être réalisées en raison de la pandémie et des contraintes techniques et financières.

Ce rapport constitue une étude préliminaire décrivant d'une part la diversité microbienne procaryote du rocher de sel de la région de Djelfa avec des techniques dépendantes et indépendantes de la culture (métagénomique amplicon) et d'autre part les potentialités de production d'enzymes hydrolytiques extracellulaires par les souches archéennes isolées. Ainsi, ces résultats ouvrent la voie à plusieurs perspectives intéressantes en termes de valorisation des écosystèmes steppiques et particulièrement le rocher de sel de Djelfa :

- La mise en évidence de nouveaux taxons ou de nouvelles capacités enzymatiques applicables en biotechnologie par l'intensification de l'effort d'échantillonnage, la diversification des milieux de cultures et des techniques d'isolement (utilisation de l'enrichissement à la place de la technique de filtration sur membrane pour pouvoir accéder à la population minoritaire) et l'élargissement de la recherche vers d'autres matrices comme le sol, les sédiments et le sel de cet environnement.
- Corréler la diversité microbienne avec les paramètres environnementaux abiotiques pour comprendre les facteurs qui régissent la distribution des microorganismes dans cet environnement hypersalin.
- Etude quantitative de la production d'enzymes hydrolytiques extracellulaires chez les souches qui présentaient un potentiel multienzymatique pour évaluer leur potentiel d'application dans divers domaines de la biotechnologie qui requièrent une activité optimale dans une large fourchette de salinité en choisissant des conditions environnementales qui reflètent les conditions réelles dans lesquelles l'enzyme fonctionne.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. 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.
2. de Lourdes Moreno M, Pérez D, García MT, Mellado E. (2013). Halophilic bacteria as a source of novel hydrolytic enzymes. *Life*;3(1):38-51.
3. Hacène H, Rafa F, Chebhouni N, Boutaiba S, Bhatnagar T, Baratti JC, et al. Biodiversity of prokaryotic microflora in El Golea salt lake, Algerian Sahara. (2004). *Journal of arid environments*.;58(3):273-84.
4. Kharroub K. Identification et étude moléculaire des bactéries et des archéobactéries aérobies halophiles de la sebkha Ezzemoul (Ain M'Lila). (2007). PhD thesis, Mentouri University, Constantine, Algeria.
5. Boutaiba S, Hacene H, Bidle KA, Maupin-Furlow JA. Microbial diversity of the hypersaline Sidi Ameur and Himalatt salt lakes of the Algerian Sahara. (2011). *Journal of Arid Environments*.75(10):909-16.
6. Quadri I, Hassani II, 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*. 186:119-31.
7. Menasria T. (2020). Biodiversité microbienne dans les milieux extrêmes salés du Nord-Est Algérien. PhD thesis, Université de Batna 2. Algeria.
8. Ventosa A, Arahal D. (2009). Physico-chemical characteristics of hypersaline environments and their biodiversity. *Extremophiles*.2:247-62.
9. Lagerloef G, Delcroix T. (2001). Sea surface salinity: A regional case study for the tropical Pacific. *Observing the Ocean in the 21st Century*.137-48.
10. Santos F, Antón J.( 2019). Extremophiles: hypersaline environments. *In : Encyclopedia of Microbiology*.12: p. 270-275.
11. Rich VI, Maier RM. Aquatic environments. (2015). *Environmental microbiology*. (3<sup>rd</sup> Edition): Elsevier. p. 111-38.
12. Oren A. (2015). Halophilic microbial communities and their environments. *Current Opinion in Biotechnology*. 33:119-24.
13. Litchfield C, Gillevet P. (2002). Microbial diversity and complexity in: hypersaline environments: a preliminary assessment. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 28(1):48-55.

14. Grégoire P, Fardeau M, Guasco S, Bouanane A, Michotey V, Bonin P. Les micro-organismes de l'extrême. La Presse thermique et climatique. 2009;146:49-61.
15. Rodriguez-Valera F. (1992). Introduction to saline environments. In: The biology of halophilic bacteria. (Chap 1). CRC Press.
16. Oren A. (2006). Life at high salt concentrations. In: The prokaryotes.3: 263-282. Springer. New York.
17. Ollivier B, Caumette P, Garcia J-L, Mah RA. Anaerobic bacteria from hypersaline environments. (1994). *Microbiological reviews*. 58(1): 27-38.
18. Hem JD. Study and interpretation of the chemical characteristics of natural water: (1970). US Government Printing Office.
19. Post FJ. (1977). The microbial ecology of the Great Salt Lake. *Microbial ecology*. 3(2):143-65.
20. Jacob JH, Hussein EI, Shakhathreh MAK, Cornelison CT. (2017). Microbial community analysis of the hypersaline water of the Dead Sea using high-throughput amplicon sequencing. *MicrobiologyOpen*.;6(5):e00500.
21. Grant WD. (2004). Introductory chapter: half a lifetime in soda lakes. In: Halophilic microorganisms: Springer. p. 17-31.
22. Cayol J-L, Ollivier B, Alazard D, Amils R, Godfroy A, Marty D, et al. (2011). Les conditions de vie extrêmes sur la planète et exobiologie. In : Ecologie microbienne : microbiologie des milieux naturels et anthropisés.
23. Davis JS. (1978). Biological communities of a nutrient enriched salina. *Aquatic Botany*. 4: 23-42.
24. Rodriguez-Valera F, Ventosa A, Juez G, Imhoff JF. (1985). Variation of environmental features and microbial populations with salt concentrations in a multi-pond saltern. *Microbial Ecology*.11(2): 107-15.
25. Post F. (1981). Microbiology of the Great Salt Lake north arm. Salt Lakes: Springer.p. 59-69.
26. Franzmann P, Stackebrandt E, Sanderson K, Volkman J, Cameron D, Stevenson P, et al. (1988). Halobacterium lacusprofundi sp. nov., a halophilic bacterium isolated from Deep Lake, Antarctica. *Systematic and Applied Microbiology*. 11(1): 20-7.
27. Martínez GM, Pire C, Martínez-Espinosa RM. (2022). Hypersaline environments as natural sources of microbes with potential applications in biotechnology: the case of solar evaporation systems to produce salt in Alicante County (Spain). *Current Research in Microbial Sciences*.100136.

28. Oren A. (2011). Characterization of pigments of prokaryotes and their use in taxonomy and classification. In: *Methods in microbiology*. 38: Elsevier. p. 261-82.
29. Crowley DJ, Boubriak I, Berquist BR, Clark M, Richard E, Sullivan L, et al. (2006). The *uvrA*, *uvrB* and *uvrC* genes are required for repair of ultraviolet light induced DNA photoproducts in *Halobacterium* sp. NRC-1. *Saline systems*. 2(1): 1-13.
30. Oren A. (2019). Solar salterns as model systems for the study of halophilic microorganisms in their natural environments. *Model Ecosystems in Extreme Environments*: Elsevier. p. 41-56.
31. Oren A. (2009). Saltern evaporation ponds as model systems for the study of primary production processes under hypersaline conditions. *Aquatic Microbial Ecology*. 56(2-3):193-204.
32. Demnati F (2014). Biodiversité et Enjeux Socio-économiques des lacs salés (Chotts et Sebkhas) d'Algérie. Cas du Chott Merouane et Melghir. PhD thesis. Université de Biskra. Algérie.
33. Dubost D. (2002). Ecologie, aménagement et développement agricole des oasis algériennes. Centre de recherche et technique sur les régions arides.
34. Bryant RG, Rainey M. (2002). Investigation of flood inundation on playas within the Zone of Chotts, using a time-series of AVHRR. *Remote Sensing of Environment*. 82(2-3):360-75.
35. Williams W. (2001). Anthropogenic salinisation of inland waters. *Saline lakes*: Springer. p. 329-37.
36. Margesin R, Schinner F. (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*. 5(2):73-83.
37. Ventosa A, Nieto J. (1995). Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 11(1):85-94.
38. Rodriguez-Valera F. (1988). Characteristics and microbial ecology of hypersaline environments. In : *Halophilic bacteria*. CRC Press, Boca Raton. 1: 235-243.
39. Kushner DJ. (1985). The Halobacteriaceae. In: *The Bacteria*. Academic Press, New York. 8: 171-214.
40. Oren A. (2002). Diversity of halophilic microorganisms: Environment, phylogeny, physiology and applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 28(1): 56-63.
41. Cayol J-L, Ollivier B, Patel B, Prensier G., Guezennec J., Garcia, J-L. (1994). Isolation and characterization of *Halothermothrix orenii* gen. nov., sp. nov., a halophilic thermophilic, fermentative, strictly anaerobic bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44, 534-540.

42. Oren, A. (2006). The Order Halobacteriales. In: *The Prokaryotes*. Springer, New York. 3: 113-164.
43. Cayol J-L., Alazard D, Amils R, Godfroy A, Piette F, Prieur, D. (2012). Les conditions de vie extrêmes sur la planète et exobiologie. In : *Ecologie microbienne*. Presses Universitaires de Pau et des Pays de l'Adour. pp. 363-408.
44. Edbeib MF, Roswanira A, Huyop F. (2016). Halophiles: biology, adaptation, and their role in decontamination of hypersaline environments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32, 135.
45. Zajc J, Zalar P, Plemenitas A, Gunde-Cimerman N. (2012). The microbiota of the salterns. In: *Biology of marine fungi. Progress in molecular and subcellular biology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 53: 133-158.
46. Gunde-Cimerman N, Zalar P, de Hoog S, Plemenitas A. (2000). Hypersaline waters in salterns. Natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbial Ecology*, 32(3): 235-240.
47. DasSarma S, DasSarm P. (2017). Halophiles. eLS. *John Wiley & Sons, Ltd: Chichester*, 13.
48. Butinar L, Santos S, Spencer-Martins I, Oren, A, Gunde-Cimerman N. (2005). Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiology Letters*. 244(2): 229-234.
49. Butinar L, Frisvad JC, Gunde-Cimerman N. (2011). Hypersaline waters. *FEMS Microbiology Ecology*, 77, 186-199.
50. de la Haba RR, Sanchez-Porro C, Marquez MC., Ventosa A. (2011). In : *Extremophiles handbook*. (K. Horikoshi, Éd.) Springer Tokyo Dordrecht Heidelberg London New York .
51. Dohrmann A-B, Müller V. (1999). Chloride dependence of endospore germination in *Halobacillus halophilus*. *Archives of microbiology* 172(4): 264-267.
52. Roebler M, Wanner G, Müller V. (2000). Motility and flagellum synthesis in *Halobacillus halophilus* are chloride dependent. *Journal of Bacteriology*. 182:532-535.
53. Roebler M, Müller V. (1998). Quantitative and physiological analyses of chloride dependence of growth of *Halobacillus halophilus*. *Applied Environmental Microbiology*. 64:3813–3817
54. Roebler M, Müller V. (2001). Chloride dependence of glycine betaine transport in *Halobacillus halophilus*. *FEBS Lett* .489:125–128.
55. Roebler M, Müller V. (2002). Chloride, a new environmental signal molecule involved in gene regulation in a moderately halophilic bacterium, *Halobacillus halophilus*. *Journal of Bacteriology*. 184:6207–6215

56. Whitton B A, Potts M. (2000). *The ecology of Cyanobacteria: their diversity in time and space*. Kluwer, Dordrecht .
57. Fourçans A., De Oteyza TG, Wieland A, Solé A, Diestra E, et al (2004). Characterization of functional bacterial groups in a hypersaline microbial mat community (Salins-de-Giraud, Camargue, France). *FEMS Microbiology Ecology*. 51(1) : 55-70.
58. Mohamad O A, Li L, Ma J, Hatab S, Rasulov B A, et al. (2018). Halophilic Actinobacteria biological activity and potential applications. In: *Extremophiles in Eurasian Ecosystems: Ecology, Diversity, and Applications. Microorganisms for Sustainability* .Singapore: Springer, Singapore.8: 333-364.
59. Johnson K G, Lanthier PH, Gochbauer M B. (1986). Studies of two strains of *Actinopolyspora halophila*, an extremely halophilic actinomycete. *Archives of Microbiology*. (143): 370-378.
60. Zhilina TN, Zavarzin G A, Rainey F, Kevbrin V V, Kostrikina N A, Lysenko A M. (1996). *Spirochaeta alkalica* sp. nov., *Spirochaeta africana* sp. nov., and *Spirochaeta asiatica* sp. nov., alkaliphilic anaerobes from the Continental Soda Lakes in Central Asia and the East African Rift. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46(1), 305-12.
61. Hoover R B, Pikuta E V, Bej A K, Marsic D, Whitman W B, et al. (2003). *Spirochaeta americana* sp. nov., a new haloalkaliphilic, obligately anaerobic spirochaete isolated from soda Mono Lake in California. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.(53): 815-821.
62. Pikuta E V, Hoover R B, Bej A K, Marsic D, Whitman W B, Krader P K. (2009). *Spirochaeta dissipatitropha* sp. nov., an alkaliphilic, obligately anaerobic bacterium, and emended description of the genus *Spirochaeta* Ehrenberg 1835. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.(59):1798-804.
63. Greenberg, E. and Canale-Parola, E. (1976). *Spirochaeta halophila* sp. n., a facultative anaerobe from a high-salinity pond. *Archives of microbiology*. 110(2): 185-194.
64. Dubinina G, Grabovich M, Leshcheva N, Rainey FA, Gavrish E. (2011). *Spirochaeta perfilievii* sp. nov., an oxygen-tolerant, sulfide-oxidizing, sulfur- and thiosulfate-reducing spirochaete isolated from a saline spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. (61):110-117.
65. Leschine S, Paster B J, Canale-Parola E. (2006). Free-Living Saccharolytic Spirochetes: The Genus *Spirochaeta*. In: *The prokaryotes*. Springer. (7): 195-210.
66. Oren A. (2020). The microbiology of red brines. In: *Advances in applied microbiology*. Elsevier Inc. (113): 57-110.

67. Munoz R, Rossello-Mora R, Amann R. (2016). Revised phylogeny of Bacteroidetes and proposal of sixteen new taxa and two new combinations including Rhodothermaeota phyl. nov. *Systematic and Applied Microbiology*. (39): 281-296.
68. Antón J, Peña A Santos, Martínez-García F, Schmitt-Kopplin M P, Rosselló-Mora R. (2008). Distribution, abundance and diversity of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *Saline Systems*. 4(1): 15.
69. 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 Natribacteriales ord. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, (65): 1050-1069.
70. Gupta, R. S., Naushad, S., Fabros, R., & Adeolu, M. (2016). A phylogenomic reappraisal of family-level divisions within the class Halobacteria: Proposal to divide the order Halobacteriales into the families Halobacteriaceae, Haloarculaceae fam. nov., and Halococcaceae fam. nov., and the order Haloferacales into th. *Antonie van Leeuwenhoek*, 109, 565-587.
71. Andrei AS, Banciu H L, Oren A. (2012). Living with salt: Metabolic diversity in archaea inhabiting saline ecosystems. *FEMS Microbiology Letters*. (330): 1-9.
72. Mancinelli RL, Hochstein LI. (1986). The occurrence of denitrification in extremely halophilic bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. (35):55-58.
73. Oren A. (2014). Taxonomy of halophilic archaea: current status and future challenges. *Extremophiles*. (18): 491-498.
74. Zhilina T N, Svetlichnaya T P. (1989). The ultrafine structure of *Methanohalobium evestigatum* an extreme halophilic bacterium producing methane. *Mikrobiologiya*. (58): 312-318.
75. Sorokin D Y, Ben Abbas, Merkel A Y, Rijpstra W C, Sinninghe Damsté J S, et al. (2015). *Methanosalsum natronophilum* sp. nov., and *Methanocalculus alkaliphilus* sp. nov., haloalkaliphilic methanogens from hypersaline soda lakes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65 (10): 3739-3745.
76. Parte A. C, Sardà Carbasse J, Meier-Kolthoff J P, Reimer L C, Göker M. (2022). *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ*. Récupéré sur lpsn.dsmz.de: <https://lpsn.dsmz.de>
77. Robert M F. (2005). Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline systems*(1): 5.
78. Oren A. (2001). The bioenergetic basis for the decrease in metabolic diversity at increasing salt concentration: implication for the functioning of salt lake

- ecosystems. In: *Saline lakes*. Netherlands: Kluwer Academic Publisher. (466): 61-72.
79. Ng W V, Kennedy S, Mahairas G G, Berquist B, Pan M, Shukla H D, DasSarma S. (2000). Genome sequence of Halobacterium species NRC-1. *Proceeding of the National Academy of Sciences. USA*. (97): 12176-12181.
80. Tsujimoto K, Semadesi M, Huflejt M, Packer L. (1988). Intracellular pH of halobacteria can be determined by the fluorescent dye 2',7'-bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein. *Biochemistry. Biophysic. Res.* (155):123-129.
81. Murakami M, Konishi T. (1990). Cooperative regulation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in Halobacterium halobium by delta pH and delta phi. *Archive of Biochemistry and Biophysics*. (281): 13-20.
82. Juez G. (2004). Extremely halophilic archaea: Insight into their response to environmental conditions. In: *Halophilic microorganisms*. Springer- Verlag Berlin Heiderlberg New York (p. 342).
83. Christian J, Waltho J. (1962). Solute concentrations within cells of halophilic and non-halophilic bacteria. *Biochimica Biophysica Acta*, (65): 506-508.
84. Muller V, Oren A. (2003). Metabolism of chloride in halophilic prokaryotes. *Extremophiles*, (7): 261-266.
85. DasSarma S, DasSarma P. (2012). Halophiles. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
86. Chen H, Jiang, J. (2009). Osmotic responses of Dunaleilla to the change of salinity. *Journal of cellular physiology*, 219, 251-258.
87. Klähn S, Hagemann M. (2010). compatible solute biosynthesis in cyanobacteria. *environmental microbiology*. (13): 551-562.
88. Oren A. (2008). Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems*. (4): 2.
89. Ventosa A, Nieto J J, Oren A. (1998). Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews*. (62): 504.
90. Vandervennet M. (2020). Les halocine C8 et H4, composés antimicrobiens produits par des archées de milieux hypersalins. *Halocin C8: an antimicrobial peptide distributed among four halophilic archaeal genera: Natrinema, Haloterrigena, Haloferax, and Halobacterium*. Sciences du vivant, France: Etude pratique des hautes études.
91. Galinski E A. (1995). Osmoadaptation in bacteria. *Adv Microb Physiol*. (37): 272-328.
92. Poli A, Di Donato G, Abbamondi R, Nicolaus B. (2011). Synthesis, production, and biotechnological applications of exopolysaccharides and polyhydroxyalkanoates by archaea. *Archaea*. (13).

93. Paul S, Bag S, Das S, Harvill E, Dutta C. (2008). Molecular signature of hypersaline adaptation: insights from genome and proteome composition of halophilic prokaryotes. *Genome Biology*. (9): R70.
94. Ortega G, Diercks T, Millet O. (2015). Halophilic protein adaptation results from synergistic residue-ion interactions in the folded and unfolded states. *Chem Biol*. (22): 1597-1607.
95. Pancsa R, Kovacs D, Tompa P. (2019). Misprediction of structural disorder in halophiles. *Molecules*. (24): 479.
96. Marty V. (2011). Adaptation de l'archaea halophiles *Halobacterium salinarum* aux stress environnementaux: mécanisme de survie et rôle de la protéolyse intracellulaire. Grenoble, Biologie structurale, université de Grenoble, France: HAL.
97. Jadhav K, Kushwah B, Jadhav I. (2018). Insight into compatible solutes from halophiles: Exploring significant applications in biotechnology. In: *JMicrobial Bioprospecting for Sustainable Development*. Springer. (pp. 271-307).
98. Dym O, Mevarech M, Sussman J L. (1995). Structural features that stabilize halophilic malate dehydrogenase from an archaebacterium. *Science*. (267): 1344-1346.
99. Sleator, R.D., Gahan, C.G. and Hill, C. (2001). Identification and disruption of the proBA locus in *Listeria monocytogenes*: role of proline biosynthesis in salt tolerance and murine infection. *Applied and environmental microbiology* 67(6): 2571-2577.
100. Audic EL, Loulergue P, Paugam L. (2017). Un point sur le PHA, un bioplastique bactérien. *L'actualité chimique* (420) : 63-64.
101. Quillagaman J, Guzmán H, Van-Thuoc D, Hatti-Kaul R. (2010). Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects. *Applied Microbiology*. 85(6): 1687-1696.
102. Martínez-Gutiérrez CA, 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*, e4780.
103. Mitra, R, Xu T, Hua X, Han J. (2020). Current developments on polyhydroxyalkanoates synthesis by using halophiles as a promising cell factory. *Microbiol Cellsl Factories*, (19): 86.
104. Joulak I, Finore I, Poli A, Abid Y, Bkhairia I, Nicolaus B, Azabou S. (2020). Hetero-exopolysaccharide from the extremely halophilic *Halomonas smyrnensis* K2: production, characterization and functional properties in vitro. *3 Biotech*. 10(9): 395.
105. Quesada E, Béjar V, Ferrer M, Calvo C, Llamas I, Martínez-Checa F, del Moral A. (2004). Moderately Halophilic, Exopolysaccharide-Producing Bacteria. In: *Halophilic microorganisms*. Springer. (pp. 297-314).

106. Wang J, Salem D, Sani R K. (2019). Extremophilic exopolysaccharides: A review and new perspectives on engineering strategies and applications. *Carbohydrate Polymers*. (205): 8-26.
107. Li P, Liu Z, Xu R. (2001). Chemical characterisation of the released polysaccharide from the cyanobacterium *Aphanothece halophytica* GR02. *Journal of Applied Phycology*. 13(1): 71-77.
108. Arias S, del Moral A, Ferrer M, Tallon R, Quesada E, Bejar V M. (2003). An exopolysaccharide produced by the halophilic bacterium *Halomonas maura*, with a novel composition and interesting properties for biotechnology. *Extremophiles*. 7(4): 319-326.
109. Radchenkova N, Boyadzhieva I, Atanasova N, Poli A, Finore I, Di Donato P, Kambourova M. (2018). Extracellular polymer substance synthesized by a halophilic bacterium *Chromohalobacter canadensis* 28. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(11): 4937-4949.
110. Ruiz-Ruiz C, Srivastava G, Carranza D, Mata J, Llamas I, Santamaría M, Molina I. (2011). An exopolysaccharide produced by the novel halophilic bacterium *Halomonas stenophila* strain B100 selectively induces apoptosis in human T leukaemia cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 89(2): 345-355.
111. Sarilmiser H, Öner E. (2014). Investigation of anti-cancer activity of linear and aldehyde activated levan from *Halomonas smyrnensis* AAD6T. *Biochemical Engineering Journal*. (92): 28-34.
112. Arun J, Selvakumar S, Sathishkumar R, Moovendhan M, Ananthan G, Maruthiah T, Palavesam A. (2017). In vitro antioxidant activities of an exopolysaccharide from a salt pan bacterium *Halolactibacillus miurensis*. *Carbohydrate Polymers*. (155) : 400-406.
113. Jones B E. (2004). Industrial enzymes: Do halophiles and alkaliphiles have a role to play. In: *Halophilic microorganisms*. Springer. (pp. 274-284).
114. Ozcan B, Ozyilmaz G., Cokmus C, Caliskan M. (2009). Characterization of extracellular esterase and lipase activities from five halophilic archaeal strains. *Journal Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36 (1), 105-110.
115. Moreno M L, Piubeli F, Bonfa M, Garcia M, Durrant L, et al. (2012). Analysis and characterization of cultivable extremophilic hydrolytic bacterial community in heavy-metal contaminated from the Atacama Desert and their biotechnological potentials. *Journal of Applied Microbiology*. 113. 550-559.
116. Gomes J, Steiner W. (2004). The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. *Food Technology and Biotechnology*. 42: 223-235.
117. Setati M. (2010). Diversity and industrial potential of hydrolase producing halophilic/halotolerant eubacteria. *African Journal of Biotechnology*. 9: 1555-1560.

118. Yin J, Chen J C, Wu Q, Chen G Q. (2015). Halophiles, coming stars for industrial biotechnology. *Biotechnology Advances*. 33: 1433-1442.
119. Sanjay A, Meghna J V, Riddha M, Chirag B, Purvi N P (2014). Halophilic microbes for bio-remediation of salt affected soils. *Asian Journal of Medical Research*. 8(33):3070-3078.
120. Oren A. (2010). Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environmental Technology*. 31 : 825-834.
121. Besse A, Peduzzi J, Rebuffat S. (2015). Antimicrobial peptides and proteins in the face of extremes: Lessons from archaeocins. *Biochimie*. 118:344-355.
122. 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.
123. 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.
124. Hill, A., Weightman, A. J., Fry, J. C. (2000). Antimicrobial peptides and proteins in the face of extremes: Lessons from archaeocins. *Science Report*, 9(1), 1-11.
125. 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.
126. Chaudhary DK, A. Khulan, Kim J. (2019). Development of a novel cultivation technique for uncultured soil bacteria. *Science Report*. 9(1):1-11.
127. Alain K, Querellou J. (2009). Cultivating the uncultured : limits, advances and future challenges. *Extremophiles*. 13 :583-594.
128. Dorigo U, Volatier L, Humbert J-F. (2005). Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. *Water Research*. (39) : 2207-2218.
129. Muyzer, G. and Smalla, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73(1) : 127-141.
130. Huybens N, Mainil J, Marlier D. (2009). Les techniques de biologie moléculaire d'analyse des populations bactériennes complexes, Université de Liège, Liège, Belgium.
131. Oren A. (2002). Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*. 39 :1-7.
132. Ovreås L, Daae F, Torsvik V, Rodriguez-Valera F. (2003). Characterization of microbial diversity in hypersaline environments by melting profiles and re-association kinetics in combination with terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP). *Microbial ecology*. 46(3): 291-301.

133. Schloss P D, Handelsman J. (2003). Biotechnological prospects from metagenomics. *Current Opinion in Biotechnology*. 14(3): 303-310.
134. Riesenfeld C S, Schloss P D, Handelsman J. (2003). Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annual Review Genetics*. 38: 525-552.
135. 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.
136. 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.
137. Metzker M L. (2010). Sequencing technologies—the next generation. *Nature Reviews Genetics*, 11(1): 31.
138. 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.
139. Dumont, M. G., Murrell, J. C. (2005). Stable isotope probing—linking microbial identity to function. *Nature Reviews Microbiology*. 3(6): 499-504.
140. Gentry TJ, Wickham G S, Schadt C W, He Z, Zhou J. (2006). Microarray applications in microbial ecology research. *Microbial Ecology*. 52(2): 159-175.
141. 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.
142. Azandegde A. (2010). Etude de la structure des communautés bactériennes du sédiment et de l'écologie de *Vibrio aestuarianus* pathogène de l'huître creuse *Crassostrea gigas* dans les deux sites ostréicoles. Thèse de Doctorat en Microbiologie. Université de Brest, France.
143. Gautier E F. (1914). Le rocher de sel de Djelfa. *Annal de Geographie*. 23: 245-260.
144. Rodier J, Bazin C, Broutin J P, Chambon P, Rodi L. (2009). *L'analyse de l'eau*. DUNOD.
145. Montalvo-Rodriguez R, Vreeland R H, Oren A, Kessel M, Betancourt C, Lopez-Garcia J. (1998). Halogeometricum boringense gen. nov., sp. nov., a novel halophilic archaeon from Puerto Rico. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 48, 1305-1312.

146. Schneegurt M A. (2012). Media and conditions for the growth of halophilic and halotolerant Bacteria and Archaea. In : Advances in understanding the biology of halophilic microorganisms. Springer.
147. Oren A, Ventosa A, Grant W. (1997). Proposed Minimal Standards for Description of New Taxa in the Order Halobacteriales. *International Journal of Systematic and Bacteriology*. 47(1) : 233-238.
148. Dussault H P. (1955). An improved technique for staining red halophilic bacteria. *Journal of Bacteriology*. 70(4) : 484-485.
149. DasSarma S, Fleischmann E M, Robb F T. (1995). Archaea: a laboratory manual: Halophiles. New York : Cold spring harbor laboratory Press.
150. Marchal N, Bourdon J L, Richard C. (1982). Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. France : Doin Editeurs.
151. Rodriguez-Valera R, Ruiz-Berraquero F, Ramos-Cormenzana A. (1980). Behaviour of mixed populations of halophilic bacteria in continuous cultures. *Canadian Journal of Microbiology*. 26 : 1259-1263.
152. Oren A, Litchfield C D. (1999). A procedure for the enrichment and isolation of Halobacterium. *FEMS Microbiology Letters*. 173 : 353-358.
153. Clinical and Laboratory of Standards Institute. (2012). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Fourth International Supplement. CLSI document M27-4.
154. Montalvo-Rodriguez R, Lopez-Garriga J, Vreeland R H, Oren A, Ventosa A, Kamekura M. (2000). Haloterrigena thermotolerans sp. nov., a halophilic archaeon from Puerto Rico. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50: 1065-1071.
155. Neagu S, Enache M, Cojoc R. (2014). Extracellular hydrolytic activities of halophilic microorganisms isolated from Balta Alba salt lake. *Romanian Biotechnology Letters*. 19(1): 8951-8958.
156. Oren A, Duker S, Ritter S. (1996). The polar lipid composition of Walsby's square bacterium. *FEMS Microbiology Letters*. 138: 135-140.
157. Kate M. (1972). Isolation, analysis and identification of lipids. In: Techniques of Lipidology. New York: North-Holland/American Elsevier. (pp. 269-610)
158. Enache M, Itoh T, Kamekura M, Popescu G. (2007). Halophilic archaea isolated from man-made young (200 years) salt lakes in Slănic, Prahova, Romania. *Central European Journal of Biology*. 3: 388-395.

159. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*.35: 1547-1549.
160. Saito N, Nei M. (1987). The neighbor joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology*. 4:406-425.
161. Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*.39: 783-791.
162. Li W, Fu L, Niu B, Wu S, Wooley J. (2012). Ultrafast clustering algorithms for metagenomics sequence analysis. *Briefings in bioinformatics*.13 (6): 656-668.
163. Maidak B L, Larsen N, McCaughey M J, Overbeek R, et al. (1994). The ribosomal database project. *Nucleic acid research*. 22 (17): 3485-3487.
164. Ruginescu R, Gomoiu I, Popescu O, Cojoc R, Neagu S, Lucaci I, Enache E. (2020). Bioprospecting for Novel Halophilic and Halotolerant Sources of Hydrolytic Enzymes in Brackish, Saline and Hypersaline Lakes of Romania. *microorganisms*.8: 1903.
165. Delarras C. (2014). Pratique en microbiologie de laboratoire : Recherche de bactéries et de levures-moisissures. Paris : TEC & DOC. Lavoisier.
166. Baxter K B, Litchfield C D, Sowers K, Griffith J D, DasSarma P A, et al. (2005). Microbial diversity of Great Salt Lake. In: *Adaptation to life at high salt concentrations in Archaea, Bacteria and Eukarya* (pp. 9-25). Springer Science Business Media B.V.
167. Adjeroud M. (2013). Etude de la biodiversité microbienne d'un lac salé "Chott El Beidha" Wilaya de Setif: Ecologie et production d'enzymes. Mémoire de magistère. Université Ziane Achour, Djelfa.
168. Bodaker I, Beja O, Sharon I, Feingersh R, Rosenberg M. (2009). Archaeal diversity in the Dead Sea: Microbial survival under increasingly harsh conditions. In: *Saline Lakes around the World: Unique Systems with Unique Values*.15:137-143.
169. Nissenbaum A, Kaplan I R. (1976). Sulfur and carbon isotopic evidence for biogeochemical processes in the Dead Sea ecosystem. In: *Environmental biogeochemistry*.1:309-325.
170. Oren A, Rodrigues-Valera F. (2001). The contribution of halophilic Bacteria to the red coloration of saltern crystallizer ponds. *FEMS Microbiology Ecology*.36: 123-130.

171. Ionescu D, Siebert C, Polerecky L, Munwes Y Y, et al. (2012). Microbial and chemical characterization of underwater fresh water springs in the Dead Sea. *PLoS One*. 7(6): e38319.
172. Bhaskar P, Bhosle N B. (2006). Bacterial extracellular polymeric substance (EPS): a carrier of heavy metals in the marine food-chain. *Environment international*. 32(2): 191-198.
173. Hinsä S M, O'Toole G A (2006). Biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365: a role for LapD. *Microbiology*. 152(5): 1375-1383.
174. Grant W D, Kamekura M, McGenity T J, Ventosa A. (2001). The order Halobacteriales. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2<sup>nd</sup>.éd. Springer. New York. 1: 294-334.
175. Javor B, Requadt C, Stoeckenius W. (1982). Box-Shaped Halophilic Bacteria. *Journal of Bacteriology*. 151(3): 1532-1542.
176. Hochstein L I, Tomlinson G A. (1985). Denitrification by extremely halophilic bacteria. *FEMS microbiology letters*. 27(3): 329-331.
177. DasSarm S, DasSarma P. (2009). Archaea (Overview). In: *Encyclopedia of Microbiology*. 3<sup>rd</sup> edition. 1-23.
178. Ventosa A. (2006). Unusual microorganisms from unusual habitats: hypersaline environments. In: *Prokaryotic Diversity: Mechanisms and Significance (Society for General Microbiology Symposia)*. Cambridge University Press. 223-254.
179. Oren A. (2013). Life at high salt concentrations. In: *Prokaryotes*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
180. Mullakhanbhai M F, Larsen H (1975). *Halobacterium volcanii* sp. nov., a Dead Sea Halobacterium with a moderate salt requirement. *Archives of Microbiology*. 104(1) : 207-214.
181. Bonelo G, Ventosa A, Megias M, Ruiz-Berraquero F. (1984). The sensitivity of halobacteria to antibiotics. *FEMS Microbiology Letters*. 21: 341-345.
182. Pecher T, Böck A. (1981). *In vivo* susceptibility of halophilic and methanogenic organisms to protein synthesis inhibitors. *FEMS Microbiology Letters*. 10(3) : 295-297.
183. Sioud M, Possot O, Sibold L, Forterre P. (1988). Coumarin and quinolone action in archaeobacteria: evidence for the presence of a DNA gyrase-like enzyme. *Journal of Bacteriology*. 170(2): 946-953.

184. Tomlinson G A, Jahnke L L, Hochstein L I. (1986). *Halobacterium denitrificans* sp nov, an extremely halophilic denitrifying bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 36 : 66-70.
185. Basinger G W, Oliver J D. (1979). Inhibition of *Halobacterium cutirubrum* lipid biosynthesis by bacitracin. *Journal of General Microbiology*. 111 : 223-227.
186. Wieland F, Lechner J, Sumper M. (1982). The cell wall glycoprotein of *Halobacterium*: structural, functional and biosynthetic aspects. *Zbl Bakt Hyg J Abt Orig*. C3. 161-170.
187. Lobasso S, Lopalco P, Mascolo G, Corcelli A. (2008). Lipids of the ultra-thin square halophilic archaeon *Halo- quadratum walsbyi*. *Archaea*. 2 : 177-183.
188. Kates M, Moldoveanu N, Stewart L C (1993). On the revised structure of the major phospholipid of *Halobacterium salinarum*. *Biochemistry Biophysic. Acta*. 1169 : 46-53.
189. Kushwaha S C, Kates M, Juez G, Rodriguez-Valera F, et al. (1982). Polar lipids of an extremely halophilic bacterial strain (R-4) isolated from salt ponds in Spain. *Biochemistry Biophysic. Acta*. 711 : 31-34.
190. Tindal B J. (1990). Lipid composition of *Halobacterium lacusprofundi*. *FEMS Microbiology Letters*. 66 : 199-202.
191. Trincone A, Trivellone E, Nicolaus B, Lama L, Pagnotta E, et al. (1993). The glycolipid of *Halobacterium trapanicum*. *Biochemistry Biophysic. Acta*, 1210 : 35-40.
192. Mani K, Salgaonkar B.B, Braganca J.M. (2012). Culturable halophilic archaea at the initial and crystallization stages of salt production in a natural solar saltern of Goa, India. *Aquatic Biosystems*. 8 :15.
193. Sahli K, Gomri M A, Esclapez J, Gomez-Villegas, et al. (2020). Bioprospecting and characterization of pigmented halophilic archaeal strains from Algerian hypersaline environments with analysis of carotenoids produced by *Halorubrum* sp. BS<sub>2</sub>. *Journal of Basic Microbiolgy*. 60(7) :624-638.
194. Kharroub K, Gomri A M, Monteoliva-Sanchez M. (2015). Diversity of Halophilic Archaea from Ezzemoul Sabkha in Algeria. *Óbuda University e-Bulletin*. 5(1) : 121-126.
195. Pasié L, Bartual S G, Ulrich N P, Grabnar M, et al. (2005). Diversity of halophilic archaea in the crystallizers of an Adriatic solar saltern. *FEMS Microbiology Ecology*. 54 : 491-198.
196. Menasria T, Aguilera M, Hacene H, Benammar L, 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*. 289-298

197. Rasooli, M., Amoozegar, M., Sepahy, A. A., Babavalian, H., & Tebyanian, H. (2016). Isolation, Identification and Extracellular Enzymatic Activity of Culturable Extremely Halophilic Archaea and Bacteria of IncheBoroun Wetland. *Int. Lett. Nat. Sci.*, 40-51.
198. Oren A. (1983). A thermophilic amyloglucosidase from *Halobacterium sodomense*, a halophilic bacterium from the Dead Sea. *Current Microbiology*. 8 : 225-230.
199. Falentin H, Auer L, Mariadassou M, Pascal G, et al. (2019). Guide pratique à destination des biologistes, bioinformaticiens et statisticiens qui souhaitent s'initier aux analyses métabarcoding : Partage de pratique et retour d'expérience des membres du pôle métagénomique du PEPI IBIS. Cahiers techniques de l'INRA, INRA. hal-02311421.pp :1-23.
200. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, et al. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*. 41 :e1.
201. Cycil LM, DasSarma S, Pecher W, McDonald R, et al. (2020). Metagenomic insights into the diversity of halophilic microorganisms indigenous to the Karak Salt Mine, Pakistan. *Frontiers in Microbiology* 11 : 1567.
202. Ventosa A, Marquez M C, Sanchez-Porro C, de la Haba R R. (2012). Taxonomy of halophilic Archaea and Bacteria. In : *Advances in Understanding the Biology of Halophilic Microorganisms*. Chap 3. Springer. pp : 59-80.
203. Gibtan A, Park K, Woo M, Shin J-K, et al. (2017). Diversity of extremely halophilic archaeal and bacterial communities from commercial salts. *Frontiers in Microbiology*. 8. 799.
204. Xiao W, Wang Z-G, Wang Y-X, Schneegurt M A, et al. (2013). Comparative molecular analysis of the prokaryotic diversity of two salt mine soils in Southwest China. *Journal of Basic Microbiology*. 53 : 942-952.
205. Antón, J., Rossello´-Mora, R., Rodriguez Valera, F., & Amann, R. (2000). Extremely halophilic bacteria in crystallizer ponds from solar salterns. *App. Environ. Microbiol*(66), 3052-3057.
206. Makhdoumi-Kakhki A, Amoozegar MA, Ventosa A. (2012). *Salinibacter iranicus* sp. nov. and *Salinibacter luteus* sp. nov., isolated from a salt lake, and emended descriptions of the genus *Salinibacter* and of *Salinibacter ruber*. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology*. 62: 1521–1527.

207. Bomberg M, Liljedahl L C, Lamminmäki T, Kontula A. (2019). Highly Diverse Aquatic Microbial Communities Separated by Permafrost in Greenland Show Distinct Features According to Environmental Niches. *Frontiers in Microbiology*. 1583.
208. Fernandez A B, Vera-Gargallo B, Sanchez-Porro C, Ghai R, et al. (2014). Comparison of prokaryotic community structure from Mediterranean and Atlantic saltern concentrator ponds by a metagenomic approach. *Frontiers of Microbiology*. 5 : 196.
209. Cınar S, Mutlu M B. (2016). Comparative analysis of prokaryotic diversity in solar salterns in eastern Anatolia (Turkey). *Extremophiles*. 20 : 589–601.
210. Ito, T., Minegishi, H., & Shimane, Y. (2019). Characterization of halophilic cellulase-producing novel haloarchaea. *Studia Universitatis Babeş-Bolyai, Biologia*, 64(1), pp. 125-125.

# **ANNEXE**

## ANNEXE

### Séquences du gène codant l'ARNr 16S

>8.OF.1

TCCGATTTAGCCATGCTAGTCGCACGAGTTCATACTCGTGGCATATAGCTCAGTAA  
CACGTGGCCAAACTACCCTACAGACCGCGATAACCTCGGGAAACTGAGGCCAAT  
AGCGGATATAACTCTCATGCTGGAGTGCAGAGAGTTAGAAACGTTCCGGCGCTG  
TAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGATGGTGGGGTAACGGCCCACCATGCC  
GATAATCGGTACAGGTTGTGAGAGCAAGAGCCTGGAGACGGTATCTGAGACAAG  
ATACCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACTGACGACAG  
TGCGATAGGGGGACTCCGAGTGTGAGGGCATATAGCCCTCGCTTTTCTGTACCG  
TAAGGTGGTACAGGAACAAGGACTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGGTA  
ATACCGGCAGTCCAAGTGATGGCCGATATTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTT  
GCTGTGTAAGTCCATTGGGAAATCGACCAGCTCAACTGGTCGGCGTCCGGTGG  
AACTACACAGCTTGGGGCCGAGAGACTCAACGGGTACGTCCGGGGTAGGAGT  
GAAATCCTGTAATCCTGGACGGACCACCAATGGGGAAACCACGTTGAGAGACCG  
GACCCGACAGTGAGGGACGAAAGCCAGGGTCTCGAACCGGATTAGATACCCGG  
GTAGTCCTGGCTGTAAACAATGCTCGCTAGGTATGTCACGCGCCATGAGCACGT  
GATGTGCCGTAGTGAAGACGATAAGCGAGCCGCCTGGGAAGTACGTCCGCAAG  
GATGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCACCACAACCGGAGGAGCCTGCGG  
TTTAATTGGACTCAACGCCGGACATCTCACCGGTCCCGACAGTAGTAATGACAGT  
CAGGTTGACGACTTTACTCGACGCTACTGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTCA  
GCTCGTACCGTGAGGGCGTCTGTAAAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCACACTT  
CTAGTTGCCAGCAACACCCCTGCGGTGGTTGGGTACACTAGGAGGACTGCCATT  
GCTAAAATGGAGGAAGGAATGGGCAACGGTAGGTCAGTATGCCCCGAATGGACC  
GGGCAACACGCGGGCTACAATGGCTATGACAGTGGGATGCAACGCCGAGAGGC  
GAAGCTAATCTCAAACGTAGTCGTAGTTCGGATTGCGGGCTGAAACCCGCCCG  
CATGAAGCTGGATTCCGTAGTAATCGCGTGTGAGAAGCGCGCGGTGAATACGTC  
CCTGCTCCTTGCACACACCGCCCGTCAAAGCACCCGAGT

>1.OC.2

GGTTGATCCTGCCGGAGGCCATTGCTATCGGAGTCCGATTTAGCCATGCTAGTC  
GCACGAGTTTAGACTCGTGGCATATAGCTCAGTAACACGTGGCCAAACTACCCTA  
CAGACCGCGATAACCTCGGGAAACTGAGGCCAATAGCGGATATAACTCTCATGCT  
GGAGTGCCGAGAGTTAGAAACGTTCCGGCGCTGTAGGATGTGGCTGCGGCCGA  
TTAGGTAGATGGTGGGGTAACGGCCC-  
ACCATGCCGATAATCGGTACAGGTTGTGAGAGCAAGAGCCTGGAGACGGTATCT  
GAGACAAGATACCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACTG  
CACGACAGTGCGATAGGGGGACTCCGAGTGTGAGGGCATATAGCCCTCGCTTTT  
CTGTACCGTAAGGTGGTACAGGAACAAGGACTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCG  
CCGCGTAATACCGGCAGTCCAAGTGATGGCCGATATTATTGGGCCTAAAGCGT  
CCGTAGCTTGCTGTGTAAGTCCATTGGGAAATCGACCAGCTCAACTGGTCGGCG  
TCCGGTGGAAACTACACAGCTTGGGGCCGAGAGACTCAACGGGTACGTCCGGG  
GTAGGAGTGAAATCC-TGTAATCCTGGACGGACCACC-AATGGGG-

AAACCACGTTGAGAGACCGGACCCGACAGTGAGGGACGAAAGCCAGGGTCTC  
GAACCGGATTAGATACCCGGG-  
TAGTCCTGGCTGTAAACAATGCTCGCTAGGTATGTCACGCGCCATGAGCACGTG  
ATGTGCCGTAGTGAAGACGATAAGCGAGCCGCTGGGAAGTACGTCCGCAAGG  
ATGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCACCACAACCGGAGGAGCCTGCGGT  
TTAATTGGACTIONAACGCCGACATCTCACCGGTCCCGACAGTAGTAATGACAGTC  
AGGTTGACGACTTTACTCGACGCTACTGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTCAG  
CTCGTACCGTGAGGCGTCTGTAAAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCGCACTTC  
TAGTTGCCAGCAATACCCTTGAGGTAGTTGGGTACACTAGGAGGACTGCCGCTG  
CTAAAGCGGAGGAAGGAACGGGCAACGGTAGGTGAGTATGCCCCGAATGGACC  
GGGCAACACGCGGGCTACAATGGCTATGACAGTGGGATGCAACGCCGAGAGGC  
GACGCTAATCTCCAAACGGAGTCGTAGTTCGGATTGCGGGCTGAAACCCGCC  
GCATGAAGCTGGATTCCGGTAGTAATCGCGTGTGAGAAGCGCGCGGTGAATACGT  
CCCTGCTCCTTGACACACCCGCCGTCAAAGCACCCGAGTGGGG-  
TCCGGATGAGGCCATCATGCGACTGGTCAATCTGGGCTCCGCAAGGGGGCTT  
AAGTCGTAACAAGGTA

>S1-3

GGTTGATCCTGCCGGAGGCCATTGCTATCGGAGTCCGATTTAGCCATGCTAGTTG  
CACGAGTTCAGACTCGTAGCATATAGCTCAGTAACACGTGGCCAAACTACCCTAC  
AGACCGCAATAACCTCGGGAAACTGAGGCCAATAGCGGATATAACTCTCATGCTG  
GAGTGCCGAGAGTTAGAAACGTTCCGGCGCTGTAGGATGTGGCTGCGGCCGAT  
TAGGTAGATGGTGGGGTAACGGCCCACCATGCCGATAATCGGTACAGGTTGTGA  
GAGCAAGAGCCTGGAGACGGTATCTGAGACAAGATAACGGGCCCTACGGGGCG  
CAGCAGGCGCGAAACCTTTACTGACGACAGTGCATAGGGGGACTCCGAG  
TGTGAGGGCATATAGCCCTCGCTTTTCTGTACCGTAAGGTGGTACAGGAACAAG  
GACTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGGTAATACCGGCAGTCCAAGTGAT  
GGCCGATATTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTTGCTGTGTAAGTCCATTGGGA  
AATCGACCAGCTCAACTGGTCCGGCGTCCGGTGGAAACTACACAGCTTGGGGCC  
GAGAGACTCAACGGGTACGTCCGGGGTAGGAGTGAAATCCTGTAATCCTGGACG  
GACCACCAATGGGGAAACCACGTTGAGAGATCGGACCCGACAGTGAGGGACGA  
AAGCCAGGGTCTCGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCTGGCTGTAAACAAT  
GCTCGCTAGGTATGTCACGCGCCATGAGCACGTGATGTGCCGTAGTGAAGACGA  
TAAGCGAGCCGCTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAAACTTAAAGGAATTGGC  
GGGGGAGCACCACAACCGGAGGAGCCTGCGGTTTAATTGGACTIONAACGCCGGA  
AATCTCACCGGTCCCGACAGTAGTAATGACGGTCAGGTTGACGACTTTACCCGA  
CGTACTGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCTCT  
GTTAAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCACACTTCTAGTTGCCAGCAACACCCTTG  
TGGTGGTTGGGTGCACTAGGAGGACTGCCATTGCTAAATTGGAGGAGAGGATGG  
GCAACGGTGGGTCTAGTTTGCCCTGAATGGCCGGGGGCAACACCCGGCTAACA  
GGCTCTGACAGTGGGATGCAACGCCGAGAGGCGAAGCTAATCTCCAAACGTAG  
TCGTAGTTCGGATTGCGGGCTGAAACCCGCCCGCATGAAGCTGGATTCCGGTAGT  
AATCGCGTGTGAGAAGCGCGCGGTGAATACGTCCCTGCTCCTTGACACACCCG  
CCCGTCAAAGCACCCGAGTGGGGTCCGGATGAGGCCGTCATGCGACGGTCGAA  
TCTGGGCTCCGCAAGGGGGCTTAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGAGGAATCTG  
CGGCTGGATCACCTCCT

>S2-2

GGTTGATCCTGCCGGAGGCCATTGCTATCGGAGTCCGATTTAGCCATGCTAGTC  
GCACGAGTTCAGACTCGTGGCATATAGCTCAGTAACACGTGGCCAACTACCCTA  
CAGACCGCGATAACCTCGGGAACTGAGGCCAATAGCGGATATAACTCTCAGGC  
TGGAGTGCCGAGAGTTAGAAACGTTCCGGCGCTGTAGGATGTGGCTGCGGCCG  
ATTAGGTAGATGGTGGGGTAACGGCCCACCATGCCGATAATCGGTACAGGTTGT  
GAGAGCAAGAGCCTGGAGACGGTATCTGAGACAAGATACCGGGCCCTACGGGG  
CGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACACTGCACGACAGTGCGATAGGGGGACTCCG  
AGTGTGAGGGCATATAGCCCTCGCTTTTCTGTACCGTAAGGTGGTACAGGAACAA  
GGACTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGGCAGTCCAAGTGA  
TGGCCGATATTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTTGCTGTGTAAGTCCATTGGG  
AAATCGACCAGCTCAACTGGTCCGGCGTCCGGTGGAACTACACAGCTTGGGGC  
CGAGAGACTCAACGGGTACGTCCGGGGTAGGAGTGAAATCCTGTAATCCTGGAC  
GGACCACCAATGGGGAAACCACGTTGAGAGGCCGGACCCGACAGTGAGGGAC  
GAAAGCCAGGGTCTCGAACC GGATTAGATACCCGGGTAGTCCTGGCTGTAAACA  
ATGCTCGCTAGGTATGTCACGCGCCATGAGCACGTGATGTGCCGTAGTGAAGAC  
GATAAGCGAGCCGCCTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAACTTAAAGGAATTG  
GCGGGGGAGCACCACAACCGGAGGAGCCTGCGGTTTAATTGGACTCAACGCCG  
GACATCTCACCGGTCCCGACAGTAGTAATGACAGTCAGGTTGACGACTTTACTC  
GACGCTACTGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGT

>9.OF.1

TGCTAGTTGCACGAGTTCAGACTCGTAGCATATAGCTCAGTAACACGTGGCCAAA  
CTACCCTACAGACCGCGATAACCTCGGGAACTGAGGCCAATAGCGGATATAACT  
CTCATGCTGGAG-  
TGCCGAGAGTTAGAAACGTTCCGGCGCTGTAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAG  
GTAGATGGTGGGGTAACGGCCC-  
ACCATGCCGATAATCGGTACAGGTTGTGAGAGCAAGAGCCTGGAGACGGTATCT  
GAGACAAGATACCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACACTG  
CACGACAGTGCGATAGGGGGACTCCGAGTGTGAGGGCATATAGCCCTCGCTTTT  
CTGTACCGTAAGGTGGTACAGGAACAAGGACTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCG  
CCGCGGTAATACCGGCAGTCCAAGTGATGGCCGATATTATTGGGCCTAAAGCGT  
CCGTAGCTTGCTGTGTAAGTCCATTGGGAAATCGACCAGCTCAACTGGTCCGGCG  
TCCGGTGGAACTACACAGCTTGGGGCCGAGAGACTCAACGGGTACGTCCGGG  
GTAGGAGTGAAATCC-TGTAATCCTGGACGGACCACC-AATGGGG-  
AAACCACGTTGAGAGACCGGACCCGACAGTGAGGGACGAAAGCCAGGGTCTC  
GAACCGGATTAGATACCCGGG-  
TAGTCCTGGCTGTAAACAATGCTCGCTAGGTATGTCACGCGCCATGAGCACGTG  
ATGTGCCGTAGTGAAGACGATAAGCGAGCCGCCTGGGAAGTACGTCCGCAAGG  
ATGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCACCACAACCGGAGGAGCCTGCGGT  
TTAATTGGACTCAACGCCGGAATCTCACCGGTCCCGACAGTA-  
GTAATGACAGTCAGGTTGACGACTTTACTCGACGCTACTGAGAGGAGGTGCATG  
GCCGCCGTGAGCTCGTACCGTGAGGCGTCCTGTAAAGTCGGGCAACGAGCCAG  
ACCCACACTCCTAGTTGCCAGCAACACCCTGTGGTGGTTGGGTACACTAGGAG  
GATTGCCATTGCTAAAATGGAGGAAGGAATGGGGAAAATAGGTGAG

>9.OC.2

GCTAGTTGCACGAGTTTACTCGTGGCATATAGCTCAGTAACACGTGGCCAAAC  
TACCCTACAGACCGCGATAACCTCGGGAAACTGAGGCCAATAGCGGATATAACTC  
TCATGCTGGAGTGCCGAGAGTTAGAAACGTTCCGGCGCTGTAGGATGTGGCTG  
CGGCCGATTAGGTAGATGGTGGGGTAACGGCCCACCATGCCGATAATCGGTACA  
GGTTGTGAGAGCAAGAGCCTGGAGACGGTATCTGAGACAAGATAACCGGGCCCT  
ACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACTGACGACAGTGCATAGGGGG  
ACTCCGAGTGTGAGGGCATATAGCCCTCGCTTTTCTGTACCGTAAGGTGGTACA  
GGAACAAGGACTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGGTAATACCGGCAGT  
CCAAGTGATGGCCGATATTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTTGCTGTGTAAGT  
CCATTGGGAAATCGACCAGCTCAACTGGTCCGCGTCCGGTGGAAACTACACAG  
CTTGGGGCCGAGAGACTCAACGGGTACGTCCGGGGTAGGAGTGAAATCCTGTA  
ATCCTGGACGGACCACCAATGGGGAAACCACGTTGAGAGACCGGACCCGACAG  
TGAGGGACGAAAGCCAGGGTCTCGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCTGG  
CTGTAACAATGCTCGCTAGGTATGTCACGCGCCATGAGCACGTGATGTGCCGTA  
GTGAAGACGATAAGCGAGCCGCCTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAACTTAA  
AGGAATTGGCGGGGGAGCACCACAACCGGAGGAGCCTGCGGTTTAATTGGACT  
CAACGCCGAAATCTCACCGGTCCCGACAGTAGTAATGACAGTCAGTTGACGAC  
TTTACTCGACGCTACTGAGAGGAGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAG  
CGTCCTGTTAAGTCAGCAACGAGCGAGACCCACACTTCTAGTTGCAGCAC

>6.OF.3

TGCTAGTTGTGCGGGTTTACTACCCGCGAGCGGAAAGCTCAGTAACACGTGGCCAA  
GCTACCCTGTGGACGGGAATACTCTCGGGAAACTGAGGCTAATCCCCGATAACG  
CTTTGCTCCTGGAAGGGGGCAAAGCCGGAAACGCTCCGGCGCCACAGGATGCG  
GCTGCGGTGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACGGCCCACCGTGCCATAATCG  
GTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGACGGAATCTGAGACAAGATTCGG  
GCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACTGTACGAAAGTGCGATAA  
GGGGACTCCGAGTGTGAAGGCATAGAGCCTTCACTTTTGTACACCGTAAGGTGG  
TGCACGAATAAGGACTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGGTAATACCGGC  
AGTCCGAGTGATGGCCGATCTTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCTGAAC  
AAGTCCGTTGGGAAATCTGTCCGCTTAACGGGCAGGCGTCCAGCGGAAACTGTT  
CAGCTTGGGACCGGAAGACCTGAGGGGTACGTCTGGGGTAGGAGTGAAATCCT  
GTAATCATGGACGGACCGCCGGTGGCGCAAGCGCATCAGGAGAGCGGATCCGA  
CGAGGGGGACAACACCTAGGGACTCCAGCCGTATTAATACGGGTGTGCGCCTAG  
CTGTCGATGTGTCCCCGAGGTGTGGCCCCCTGTGCCAACCTTTCCA

>6.OF.1

TGCTAGTTGCACGAGTTCATACTCGTGGCGAAAAGCTCAGTAACACGTGGCCAA  
ACTACCCTACAGAGAACGATAACCTCGGGAAACTGAGGCTAATAGTTCATACGGG  
AGTCATGCTGGAATGCCGACTCCCCGAAACGCTCAGGCGCTGTAGGATGTGGC  
TGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACGGCCCACCGTGCCGATAATCGGTA  
CGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGACGGAATCTGAGACAAGATTCGGGGCC  
CTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACTGACGCAAGTGCGATAAGG  
GGACCCCAAGTGCGAGGGCATATAGTCTCGCTTTTACGACTGTAAGGCGGTC  
GTGGAATAAGAGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGGTAATACCGGCAG

CTCAAGTGATGACCGATATTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCCGGCCACGAAG  
GTTTCATCGGGAAATCCGCCAGCTCAACTGGCGGGCGTCCGGTGAAAACCACGT  
GGCTTGGGACCGGAAGGCTCGAGGGGTACGTCCGGGGTAGGAGTGAAATCCC  
GTAATCCTGGACGGACCACCGATGGCGAAAGCACCTCGAGAAGACGGATCCGA  
CGGTGAGGGACGAAAGCTAGGGTCTCGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCT  
AGCTGTAAACGATGCTCGCTAGGTGTGACACAGGCTACGAGCCTGTGTTGTGCC  
GTAGGGAAGCCGAGAAGCGAGCCGCCTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAAAC  
TTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCACTACAACCGGAGGAGCCTGCGGTTTAATTGG  
ACTCAACGCCGGACATCTCACCAGCTCCGACTACAGTGATGACGATCAGTTGAT  
GACCTTATCACGACGCTGTAGAGAGGAGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACC  
GTGAGCGTCCTGTAAAGTCAGCACGAGCGAGACCCGCACTTCTAATTGCCA

>S1-1

GGTTGATCCTGCCGGAGGCCATTGCTATCGGAGTCCGATTTAGCCATGCTAGTTG  
CACGAGTTTAGACTCGTAGCATATAGCTCAGTAACACGTGGCCAAACTACCCTAC  
AGACCGCAATAACCTCGGGAAACTGAGGCCAATAGCGGATACAACCTCTCATGCT  
GGAGTGCCGAGAGTTAGAAACGTTCCGGCGCTGTAGGATGTGGCTGCGGCCGA  
TTAGGTAGATGGTGGGGTAACGGCCCACCATGCCGATAATCGGTACAGGTTGTG  
AGAGCAAGAGCCTGGAGACGGTATCTGAGACAAGATACCGGGCCCTACGGGGC  
GCAGCAGGCGCGAAACCTTTACACTGCACGACAGTGCGATAGGGGGACTCCGA  
GTGGGAGGGCATATAGGCCTCGCTTTTCTGTACCGTAGGGTGGTACGGGAACAA  
GGACTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGGCAGTCCAGGTG  
ATGGCCGATATTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTTGCTGTGTAAGTCCATTGG  
GAAATCGACCAGCTCAACTGGTCCGCGTCCGGTGGAAACTACACAGCTTGGGG  
CCGAGAGACTCAACGGGTACGTCCGGGGTAGGAGTGAAATCCTGTAATCCTGGA  
CGGACCACCAATGGGGAAACCACGTTGAGAGACCGGACCCGACAGTGAGGGA  
CGAAAGCCAGGGTCTCGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCTGGCTGTAAAC  
AATGCTCGCTAGGTATGTCACGCGCCATGAGCACGTGATGTGCCGTAGTGAAGA  
CGATAAGCGAGCCGCCTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAAACTTAAAGGAATT  
GGCGGGGGAGCACCACAACCGGAGGAGCCTGCGGTTTAATTGGACTCAACGCC  
GGAAATCTCACCAGTCCCGACAGTAGTAATGACGGTCAGGTTGACGACTTTACT  
CGACGCTACTGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGT  
CCTGTAAAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCACACTTCTAGTTGCCAGCAACACCC  
TTGTGGTGGTTGGGTACACTAGGAGGACTGCCATTGCTAAAATGGAGGAAGGAA  
TGGGCAACGGTAGGTCAAGTATGCCCGAATCCACCGGGCAACACGCGGGCTAC  
AATGGCTCTGACAGTGGGATGCGACGCCGAGAGGCGAAGCTAATCTCCAAACG  
TAGTCGTAGTTCCGATTGCGGGCTGAAACCCGCCCGCATGAAGCTGGATTCGGT  
AGTAATCGCGTGTGAGAAGCGCGCGGTGAATACGTCCCTGCTCCTTGACACAC  
CGCCCGTCAAAGCACCCGAGTGGGGTCCGGATGAGGCCGTCATGCGACGGTC  
GAATCTGGGCTCCGCAAGGGGGCTTAAAGTCGTAACAAGGTA

>5RS8

TGATCCTGCCGGAGGCCATTGCTATCGGAGTCCGATTTAGCCATGCTAGTTGTGC  
GGGTTTAGACCCGCAGCGGAAAGCTCAGTAACACGTGGCCAAGCTACCCTGTG  
GACGGGAATACTCTCGGGAAACTGAGGCTAATCCCCGATAACGCTTTGCTCCTG  
GAAGGGGCAAAGCCGGAAACGCTCCGGCGCCACAGGATGCGGCTGCGGTCGA

TTAGGTAGACGGTGGGGTAACGGCCCACCGTGCCCATAAATCGGTACGGGTTGTG  
AGAGCAAGAGCCCGGAGACGGAATCTGAGACAAGATTCCGGGCCCTACGGGGC  
GCAGCAGGCGCGAAACCTTTACACTGTACGAAAGTGCGATAAGGGGACTCCGA  
GTGTGAAGGCATAGAGCCTTCACTTTTGTACACCGTAAGGTGGTGCACGAATAAG  
GACTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGGTAATACCGGCAGTCCGAGTGAT  
GGCCGATCTTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCTGAACAAGTCCGTTGGG  
AAATCTGTCCGCTTAACGGGCAGGCGTCCAGCGGAAACTGTTTCAGCTTGGGAC  
CGGAAGACCTGAGGGGTACGTCTGGGGTAGGAGTGAAATCCTGTAATCCTGGAC  
GGACCGCCGGTGGCGAAAGCGCCTCAGGAGAACGGATCCGACAGTGAGGGAC  
GAAAGCTAGGGTCTCGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCTAGCTGTAAACG  
ATGTCCGCTAGGTGTGGCGCAGGCTACGAGCCTGCGCTGTGCCGTAGGGAAGC  
CGAGAAGCGGACCGCCTGGGAAGTACGTCTGCAAGGATGAAACTTAAAGGAATT  
GGCGGGGGAGCACTACAACCGGAGGAGCCTGCGGTTTAATTGGACTCAACGCC  
GGACATCTCACCAGCCCCGACAGTAGTAATGACGGTCAGGTTGATGACCTTACC  
CGAGGCTACTGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGT  
CCTGTTAAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCGCACTCCTAATTGCCAGCAGTACCT  
TTTTGGGTAGCTGGGTACATTAGGGGGACTGCCGCTGCCAAAGCGGAGGAAGG  
AACGGGCAACGGTAGGTCAGTATGCCCCGAATGGGCTGGGCAACACGCGGGCT  
ACAATGGTCGAGACAATGGGAAGCCACTCCGAGAGGAGGCGCTAATCTCCTAAA  
CTCGATCGTAGTTCGGATTGAGGGCTGAAACTCGCCCTCATGAAGCTGGATTCCG  
GTAGTAATCGCGTGTGTCAGCAGCGCGCGGTGAATACGTCCCTGCTCCTTGACAC  
ACCGCCCGTCAAATCACCCGAGTGGGGTTCGGATGAGGCCGGCATGCGCTGGT  
CAAATCTGGGCTCCGCAAGGGGGATT

## Characterization by polyphasic approach of some indigenous halophilic archaea of Djelfa's rock salt "Hadjr el Meelh", Algeria

Amira Beddal<sup>1,2,3\*</sup>, Saad Boutaiba<sup>3</sup>, Affaf Laassami<sup>4</sup>, Fella Hamaidi<sup>2</sup>, Madalin Enache<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Department of Natural and Life Science, Faculty of Science and Technology, University of Tissemsilt, Bougara, Algeria

<sup>2</sup>Department of Biology, Faculty of Natural and Life Science, University of Blida 1, Ouled Yaïch, Algeria

<sup>3</sup>Department of Biology, Faculty of Natural and Life Science, University of Djelfa, Djelfa, Algeria

<sup>4</sup>Department of Natural and Life Science, Ecole Normale Supérieure, Kouba, Algiers

<sup>5</sup>Department of Microbiology, Institute of Biology-Bucharest, Romanian Academy, Bucharest, Romania

Received: January 2022, Accepted: June 2022

### ABSTRACT

**Background and Objectives:** Hadjr El Melh of Djelfa is an example of hypersaline ecosystems, which can harbor a wide variety of microorganisms under hostile physicochemical conditions. Given the importance of the study of halophilic microorganisms present there in terms of fundamental and applied microbiology, the purpose of this study was to characterize some halophilic archaea isolated from the brines of this environment.

**Materials and Methods:** Eight water samples were chosen randomly and collected for physicochemical and microbiological analyses. Isolation of halophilic archaea was carried out by membrane filter technique. Ten strains were identified by polyphasic approach and tested for enzymes production.

**Results:** Water samples of Djelfa's rock salt were slightly acidic to neutral in pH (6.55-7.36) with salinity ranging from 258.68 g/l to 493.91 g/l. Phenotypic, biochemical, taxonomic and phylogenetic characteristics indicated that all strains were classified within the family of *Halobacteriaceae*. Based on the comparison of DNA sequences encoded 16S rRNA, it was determined that seven strains were affiliated to the genus *Haloarcula*, two strains were related to the genus *Halobacterium* and one strain within the genus *Haloferax*. Production of different enzymes such as protease, amylase, esterase, lipase, lecithinase, gelatinase and cellulase on solid medium indicated that one strain (S2-2) produced amylase, esterase, lecithinase and protease. However, no strains showed cellulolytic or lipolytic activity. Gelatinase was found in all tested strains.

**Conclusion:** This report constitutes the first preliminary study of culturable halophilic archaea recovered from the brines of Djelfa's rock salt with a promising enzymatic potential in various fields of biotechnology.

**Keywords:** *Halobacteriaceae*; Isolation and purification; Salinity; Enzyme; Archaea; Phylogeny; Algeria

### INTRODUCTION

Hypersaline ecosystems are widespread through Algeria. They can be found at sea level, in arid and semiarid regions. Among the natural ones, sebkhas

and chotts are a good example, but are only occasionally studied. Their microbial diversity was poorly investigated and limited to some works carried out by Hacene et al., Boutaiba et al., and Khellaf et al. (1-3).

\*Corresponding author: Amira Beddal, Ph.D, Department of Natural and Life Science, Faculty of Science and Technology, University of Tissemsilt, Bougara, Algeria; Department of Biology, Faculty of Natural and Life Science, University of Blida 1, Ouled Yaïch, Algeria; Department of Biology, Faculty of Natural and Life Science, University of Djelfa, Djelfa, Algeria. Tel: +213553712526 Fax: +21346574511 Email: beddal.amira@cuniv-tissemsilt.dz

Hadjr El Melh of Djelfa, the second rock salt in Algeria is an example of original extreme environments which is exposed like other hypersaline ecosystems to extreme physicochemical conditions including high radiation (UV), significant temperature and dryness changes that render it an important target of study for microbiologists (4). The brines of permanent and temporary streams of this site that are also rich in divalent ions such as Calcium and Magnesium result from evaporite concentration and crystallization of leaching water from rock by evaporation (5). This type of environment is colonized by halotolerants and halophilic microorganisms belonging to the three domains of life: Archaea, Bacteria and Eukarya (6). Species of the order *Halobacteriales* within the family of *Halobacteriaceae*, that are the best known extreme halophiles, require at least 1.5 M NaCl for growth (7). According to their salt requirement, Kushner differentiated between extreme halophiles that grow well at 2.5-5.2 M NaCl, borderline extreme halophiles with optimum growth at 1.5-2.5 M NaCl and moderate halophiles who prefer NaCl concentration ranging from 0.5 to 2.5 M (8). Colonization of such environments by these heterotrophic microorganisms was achieved by diverse adaptation mechanisms tolerating periodic desiccation and rewetting (4). Since there were not any reported studies on the biodiversity of Hadjr El Melh, a preliminary study was undertaken to get an overview on the culturable halophilic archaea species that exist in hypersaline waters of the rock salt by using both biochemical tests and molecular methods. This study was also performed to test the ability of isolated strains to produce enzymes of industrial interests. A physicochemical analysis was also conducted to determine the major ions in the brines and mimic the environment conditions in the isolation culture medium.

## MATERIALS AND METHODS

**Sampling.** The salt water samples were taken from the surface of eight streams of the salt rock chosen randomly and collected in sterile 500 ml bottles and sent to the laboratory in coolers. Each sample was taken in duplicate; one for physicochemical analyses, the other for the isolation of the halophilic strains.

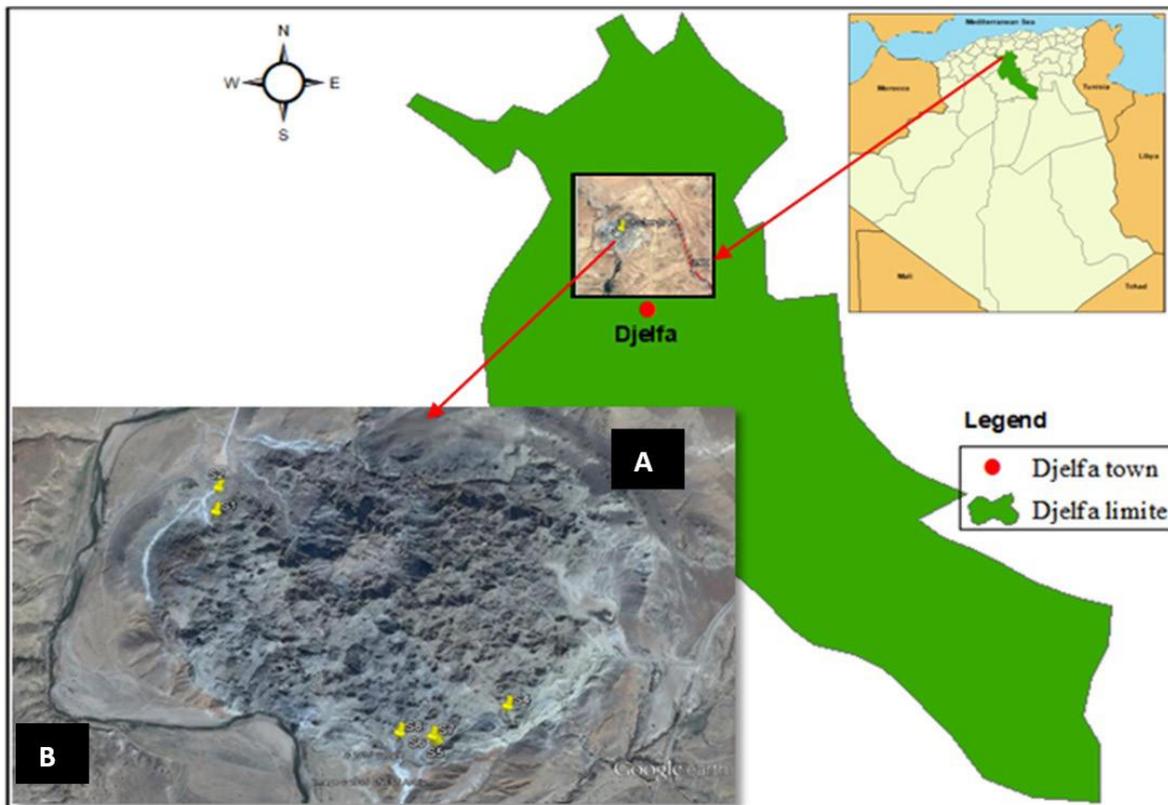
### Description of the sampling site (Hadjr El Melh).

The rock salt named Hadjr El Melh is located on the road to Algiers 25 Km North of the city of Djelfa, county of Ain Maâbed (latitude: 34° 77 '39.04" North and longitude: 3° 17 '37.89 "East, altitude of 1083 m) in the basin Zahrez El Gharbi (Fig. 1) (Google earth.com). It is a triassic outcrop which culminate 110m in height. It is composed mainly of rock salt, salt mud and gypsum. The salt rock is devoid of vegetation, except for a few tufts of Alfa, some shrubs of Tamarisk. In the whole salt rock, and especially in the region of the big steep cliffs, there are several valleys containing permanent or temporary streams which reappear after a long circulation of rainwater (Fig. 2). There are also elongated potholes at the bottoms of which are sections of the Oued El Malah River, which runs along this site from east to west.

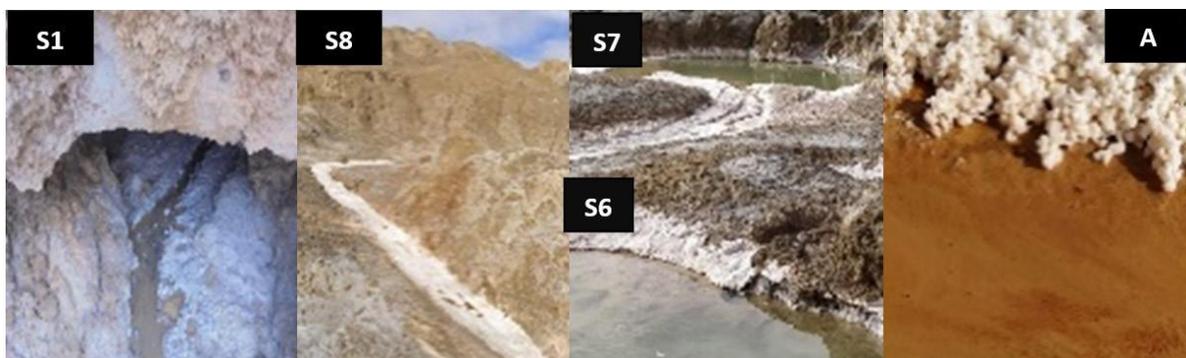
**Physico-chemical analysis of the water.** The pH and conductivity of water samples were determined using a Hach pH meter and conductivity meter successively and values were recorded. The Chlorinity was measured by titration with  $\text{AgNO}_3$  (9). Salinity was calculated by the following formula:  $S\text{‰} = 1.80655 \cdot \text{Cl}\text{‰}$  (9).  $\text{Na}^+$  concentration was determined with PFP7 flame Photometer.  $\text{Ca}^{+2}$  and  $\text{Mg}^{+2}$  were also measured by a titrimetric method using ethylene-diaminetetraacetic acid (EDTA) (9).

**Isolation of halophilic strains.** Due to the low microbial concentration in the hypersaline water, halophiles were isolated by membrane filter technique (0.2  $\mu\text{m}$ ) (10). Membranes of each sample were deposited on the modified medium "MSH" of the following composition NaCl 150.0/200.0/250.0 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  50.0 g;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  32.0 g; KCl 5.0 g;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.8 g; NaBr 0.6 g;  $\text{NaHCO}_3$  0.16 g; Yeast extract 5.0 g; Agarose 15.0 g; water 1000ml, pH 7.2 (6). Petri dishes were incubated at a temperature of 40°C for an incubation period of 5 to 15 days in hermetically sealed plastic bags (10). The pure culture collection strains were maintained on slopes of the same medium at 4°C.

**Screening of obligate halophilic strains.** In order to select the obligate halophilic strains of the other halotolerant strains, a Na-free-MSH liquid culture at 40°C with shaking (130 rpm) was prepared for each strain. Growth monitoring was done by measuring the optical density at 600 nm after six incubation days.



**Fig. 1.** Location of the study area in Algeria. A) Satellite image of the study area “Hadjr El Melh” located in the north of Djelfa City. B) Satellite image of the sampling sites of the rock salt “Hadjr El Melh” (Source: Google Earth.com).



**Fig. 2.** An overview of some sampling sites in the rock salt “Hadjr El Melh” Djelfa. S1 (34, 83571° N, 3, 08809°E). S6, S7 and S8 (34, 83038°N, 3, 09513°E); A) Sampling sites are saturated with salt which forms white crust and the availability of water is reduced under solar evaporation and dryness conditions.

**Preliminary characterization of obligate halophilic isolates.** Phenotypic characterization of isolates was carried out by following the description of the *Halobacteriaceae* family (11). The isolates were Gram stained using sample fixed with acetic acid and examined by a light microscope (3). Cell morphology and motility were determined on fresh liquid culture by phase contrast microscope (Zeiss). Scanning elec-

tron microscope was used to visualize the external appearance of isolated strains which pre-fixed by 3% glutaraldehyde for 1.5 h, washed with 0.1 M cacodylate buffer, post-fixed by 1%  $\text{OsO}_4$  for 2 h at 4°C and dehydrated by a series of increasing gradient (50%, 70%, 80%, 90%, 95%, and 99.8%) of acetone for 10 minutes each and then in 100% acetone for 30 minutes twice. After air-drying, samples were mounted

on a stub of metal with adhesive, coated with 40-60 nm of Gold and then examining with JEOL JSM-6610 scanning electron microscope (12). Oxidase reaction was carried out following the Kovacs technique (13), Catalase was determined by crushing a small inoculum of each strain in a drop of 10 volumes of  $H_2O_2$ . The affiliation of the isolated strains to the domain archaea was ascertained as shown in the protocol of Kamekura et al. (14), by their sensitivity to the bile acid Na-deoxycholate (0.04%) or their resistance to chloramphenicol (30  $\mu$ g). In order to confirm whether the isolated strains belong to extreme non-cocoid haloarchaea, cell lysis in distilled water was tested for each strain by transferring thick inoculums in 100  $\mu$ l distilled water. A very viscous suspension indicates cell lysis. Furthermore, examining cell lysis was done by re-streaking of the viscous suspension on solid MSH medium. The salt tolerance of the isolates was studied by growing in MSH liquid medium with different NaCl concentrations ranging from 0.3 M to 4.28 M. Anaerobic growth of the isolates by fermentation of L-Arginine was tested. For the nitrate reduction test, the MSH liquid medium supplemented with 1 g/l of  $KNO_3$  instead 0.5% of  $NaNO_3$  was used (10). The ability to use a single source of carbon and energy was tested according to the protocol of Montalvo-Rodriguez and his collaborators with slight modifications; a liquid yeast extract-free MSH medium (pH 7.2) supplemented with 10 g/l of tested sugar (Glucose, arabinose, starch, mannose, lactose, fructose, galactose, maltose, saccharose) or 1 g/l of tested alcohol (mannitol, glycerol), 0.005 g/l of  $KH_2PO_4$  and 0.5 g/l  $NH_4Cl$  was used (10). The growth was estimated by measuring of the  $A_{600nm}$  after 6 days of incubation at 40°C with orbital agitation (130 rpm). The sensitivity to different antibiotics (ampicillin, chloramphenicol, novobiocin, tetracycline, bacitracin, trimethoprim, ceftazidime, nalidixic acid, neomycin and gentamycin) was assessed by agar disk diffusing method (10) with slight modifications regarding the test medium. The solid MSH medium was used instead of the Sehgal-Gibbons (SG) medium.

Polar lipids analysis was performed by thin layer chromatography on silica gel G plate after their extraction following the technique describing by Litchfield and Oren (15).

**Genomic DNA extraction amplification of 16S rDNA and phylogenetic analysis.** According to the manufacturer's instructions, genomic DNA was ex-

tracted from the cultured cells using the DNeasy® blood & tissue kit (Qiagen). The 16S rRNA genes were amplified by PCR, using the archaeal specific forward and reverse primers (5'-TCCGGTTGATCCTGCCG-3') and (5'-GGAGGTGATCCAGCCG-3'), respectively (16). All reactions were carried out in 50  $\mu$ l reaction mixture containing 25  $\mu$ l of GoTaq® Hot Start Green Master Mix (2 $\times$ ), 10  $\mu$ M of each primer, 1  $\mu$ l of DNA template (<250ng) and Nuclease free water with the following thermocycling program: 2 minutes denaturation at 95°C, followed by 35 cycles of 30 seconds denaturation at 95°C, 30 seconds annealing at 55°C, 1 minute 30 seconds extension at 72°C, and a final extension step of 5 minutes at 72°C. In the presence of a molecular weight-size marker (1Kb DNA leader, New England Biolabs), RedSafe™ stained amplicons were electrophoresed on 1% (w/v) agarose gel, viewed and recorded under UV- trans illumination, The 1.5Kb PCR products obtained were purified using a PureLink® PCR purification Kit (invitrogen) and sent for sequencing to CeMIA SA (Cellular and Molecular Immunological applications, Larissa Greece) by using an ABI 3730 XL sequencer. The nucleotide sequences received were compared using the EzBioCloud database server (<http://Eztaxon-e.ezbiocloud.net>). MEGA X software was used to construct the phylogenetic tree, which was inferred using the Neighbor-joining method (17, 18).

**Qualitative detection of extracellular hydrolytic enzymes.** Extracellular hydrolytic enzyme production was tested on modified solid MSH medium by the reduction of the amount of yeast extract to 0.3 g/l instead of 5 g/l, at the optimum NaCl concentration supplemented with the suitable substrate for each enzyme. Hydrolysis of starch (amylase activity), tween 80 (esterase activity), olive oil (lipase activity), skim milk (protease activity), gelatin (gelatinase activity), lecithin (lecithinase) and carboxymethyl cellulose (cellulase activity) was tested by adding to the modified solid MSH medium the following substrates (1% soluble starch, 1% tween 80; 2.5% olive oil; 10% skim milk; 15% gelatin; 2 ml of egg yolk solution and 0.5% carboxymethyl cellulose, respectively) (19).

## RESULTS

**Physicochemical analyses.** The physicochemical characteristics of the water rock salt samples were

reported in Table 1. Hypersaline ecosystems differ greatly in ionic composition, total salt concentration, and pH. Rock salt water with salinity varying from 258.68 g/l to 493.91 g/l was slightly acidic to neutral with pH values of 6.55 to 7.36.

The values of conductivity, ranging from 194.03 ms/cm to 562.5 ms/cm, showed an average mineralization. To determine the nature of elements contributing to the salinity, chemical analysis of the rock salt water indicated that Cl<sup>-</sup> concentrations ranged from 181.08 g/l to 273.4 g/l, where equivalent concentrations of Mg<sup>2+</sup> (0.4147 g/l to 0.5597 g/l) and Ca<sup>2+</sup> (1.4188 g/l to 1.7034 g/l) were recorded. Sulphate and bicarbonate ions concentration was ranging from 1.79525 g/l to 3.551175 g/l and 0.061 g/l to 0.1403 g/l, respectively.

**Isolation of halophilic strains.** As a first step, Sehgal and Gibbon's medium with the following composition in g/l (Yeast extract: 10 g; Casamino acid: 7.5 g; Trisodic Citrate: 3 g; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O: 20 g; KCl: 2 g; FeCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O: 36 mg; MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O: 0.36 mg; Agar: 20 g) containing different NaCl concentrations (15%, 20% and 25%) (w/v) was used to isolate halophilic microorganisms by membrane filtration technique (0.2 µm). In spite of its high contents in proteins, vitamin B and amino acids, no colony was obtained on this culture medium. Furthermore, comparing with magnesium content of water samples, Sehgal and Gibbon's medium exhibits a low magnesium concentration, which could make it unsuitable isolation medium in our case. Another culture medium (MSH) with elevated level of magnesium was used later. After 7 to 18 days of incubation at 40°C, large number of white, pink, orange-red colonies was obtained. Only, pink

and orange-red colonies were picked and streaked for purification. However, many colonies failed to grow during repeated purification streaking steps. This growth failure may be due to the fact that the isolates were not sufficiently provided with culture conditions mimicking the in situ environmental conditions. In addition, accidental loss of some pure isolated strains after a number of streaking may be due the cell damage. This characteristic was actually assigned to the members of the Archaeal domain. It was noted that the growth rate on solid MSH medium was much slower than the growth on liquid MSH medium. The dry environmental conditions of the agar plates and the high salt concentration actually constitute a limitation factor of the microbial growth.

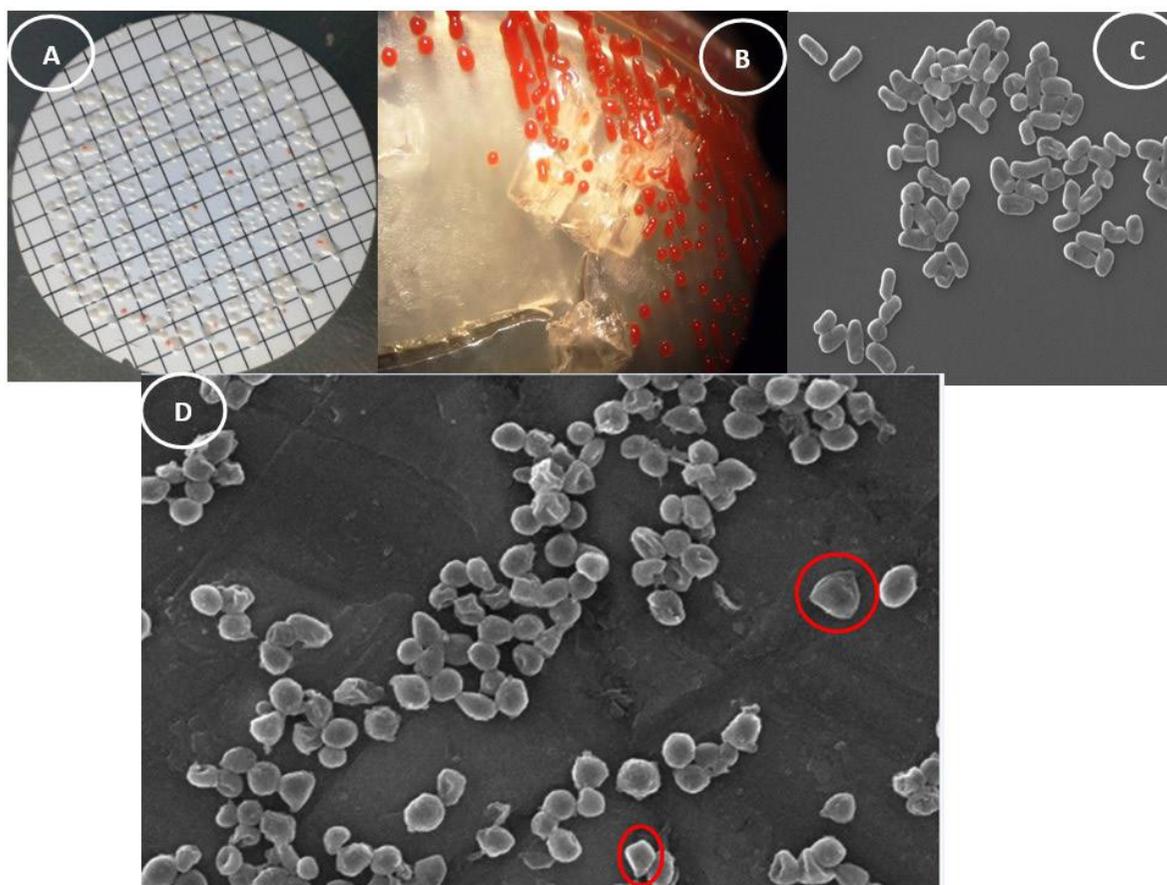
**Phenotypic characterization of the isolates.** Ten strains were chosen randomly to polyphasic identification. All isolates formed tiny, pink or red-orange-pigmented, round, smooth, opaque and convex colonies (Fig. 3).

Homogeneous cells suspensions in MSH liquid medium were difficult to prepare and require vigorous shaking. The red pigmentation characterized the most members of the family *Halobacteriaceae* was due to the richness of their membrane with C-50 carotenoid pigments (K-bacterioruberin and derivatives) associated in some cases by the bacteriorhodopsin (20). At 30°C, no pigmentation was observed for all strains. Cells of all strains were Gram negative and motile. Only the two strains 6.OF.3 and 5RS8 were rod-shaped while the rest were pleomorphics with unusual shapes (triangle and trapezoid cell shapes) which is widely distributed among haloarchaea, and especially the genus *Haloarcula* (Fig. 3) (21).

**Table 1.** Physicochemical characteristics of the water Rock Salt samples

Samples	pH	Conductivity ms/cm	Cl (g/l)	S (g/l)	Na <sup>+</sup> (g/l)	Ca <sup>2+</sup> (g/l)	Mg <sup>2+</sup> (g/l)	HCO <sup>-3</sup> (g/l)	SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> (g/l)
S1	7.07	233.33	202.36	356.57	n.d	1.524	0.4382	0.0732	3.5511
S2	6.87	233.67	231.97	409.06	n.d	1.554	0.4147	0.061	2.8312
S3	6.77	235	273.4	493.91	n.d	n.d	n.d	n.d	00
S5	6.55	n.d	194.11	350.67	n.d	1.733	0.4519	n.d	2.7163
S6	6.59	194.03	143.19	258.68	110	1.703	0.4483	0.1098	1.7952
S7	7.05	557.5	247.37	446.88	112.5	1.621	0.4851	0.1403	3.1796
S8	7.36	234.67	181.08	327.13	107.5	1.418	0.5151	0.0915	3.3915
S9	6.75	562.5	190.55	344.24	n.d	1.425	0.5597	n.d	3.525

n.d: not determined.



**Fig. 3.** Isolated colonies on 15% MSH and colony morphology. A. Isolated colonies obtained from S6 by membrane filter technique; white and red pigmented colonies are observed on membrane filter. B. Colonies of S2-2 on 20% MSH. C. Rode shaped cells of the isolated strain 5RS8. D. Pleomorphic cells (S1-1) with triangle and trapezoid shape.

All strains which were catalase and oxydase positive required high concentration of magnesium in the MSH culture medium (0.34 M). No growth occurred in the absence of one of the two magnesium salts sources. All isolates were found to be resistant to ampicillin, gentamycin, chloramphenicol, nalidixic acid and ceftazidin and sensitive to bacitracin and novobiocin. Sensitivity to tetracyclin, trimethoprim and neomycin was different among strains. Cell lysis of the isolated strains by Na-deoxycholate proved to be of a non-cocoid haloarcheal origin. All archaeal strains grew on MSH culture medium with NaCl concentration higher than 10% (w/v) with optimum of growth ranging from 15%-25% (w/v). However, Non-growth was observed in MSH culture medium with NaCl concentration lower than 10% (w/v). In addition, all strains lysed in distilled water. Eight isolates (8.OF.1, 1.OC.2, S2-2, S1-3, 6.OF.3, 9.OF.1, 9.OC.2 and S1-1) did not grow anaerobically on L-Arginine. Whereas, among ten surveyed strains, seven (8.OF.1,

S2-2, S1-3, 9.OF.1, 9.OC.2, S1-1 and 6.OF.1) were able to grow anaerobically with either nitrate or nitrite. Out of these seven strains, four (S1-3, 9.OF.1, 9.OC.2 and S1-1) carried out a complete denitrification with reduction of nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) to dinitrogen ( $\text{N}_2$ ) via ( $\text{NO}_2^-$ ). The ability to use a single source of carbon test revealed that the lactose was not utilized by any of the strains.

Only two strains (S2-2 and 6.OF.3) were able to use arabinose as a single source of carbon. Saccharose and glucose were the most utilized sugars by most of the strains. However, glucose did not have a significant effect on growth compared with saccharose. While the strain S2-2 used most of the tested sugars, 5RS8 was the strain that uses less sugar. The restricted use of sugars as a single carbon source by 5RS8 revealed its belonging to the genus *Halobacterium*. 8.OF.1, 1.OC.2 and S2-2 were able to use starch, mannose, maltose, galactose, mannose and glycerol as sole carbon source.

**Taxonomic characterization of the isolates.** The polar lipids of halophilic archaea which represent the acetone insoluble fraction of the total extracted lipids are important taxonomic markers to determine the genus level of the isolates (22). The lipid extract was separated by TLC, and the principal polar lipids were determined by comparing the  $R_f$  values of isolated strains with  $R_f$  from the literature review. According to the results, the presence of the methylated phosphatidylglycerophosphate (Me-PGP) in all strains proved their belonging to the family *Halobacteriaceae* (15). The phospholipid (PGS) found in all strains indicated their placement among members of one of the two genera *Halobacterium* or *Haloarcula* (21). Both strains 6.OF.3 and 5RS8 had the same lipid profile that characterized the genus *Halobacterium*; they were both characterized by the presence of tetraglycosylarchaeosulphate (S-TeGD) and sulfated triglycosyldiphytanylglycerol (S-TDG-1) (23). S2-2, 1.OC.2, S1-3 and 8.OF.1 showed the presence of TGD-2. This glycolipid characterized the genus *Haloarcula* (21).

**Phylogenetic analysis.** Genomic DNA of each isolated strain was extracted and purified. 16S rRNA genes were amplified by using archeal forward and reverse primer (20F and 1540R). All strains showed an amplicon of 1500 bp. The Genbank accession numbers of the resulting 16S rRNA gene sequences were from OM089650 to OM089659.

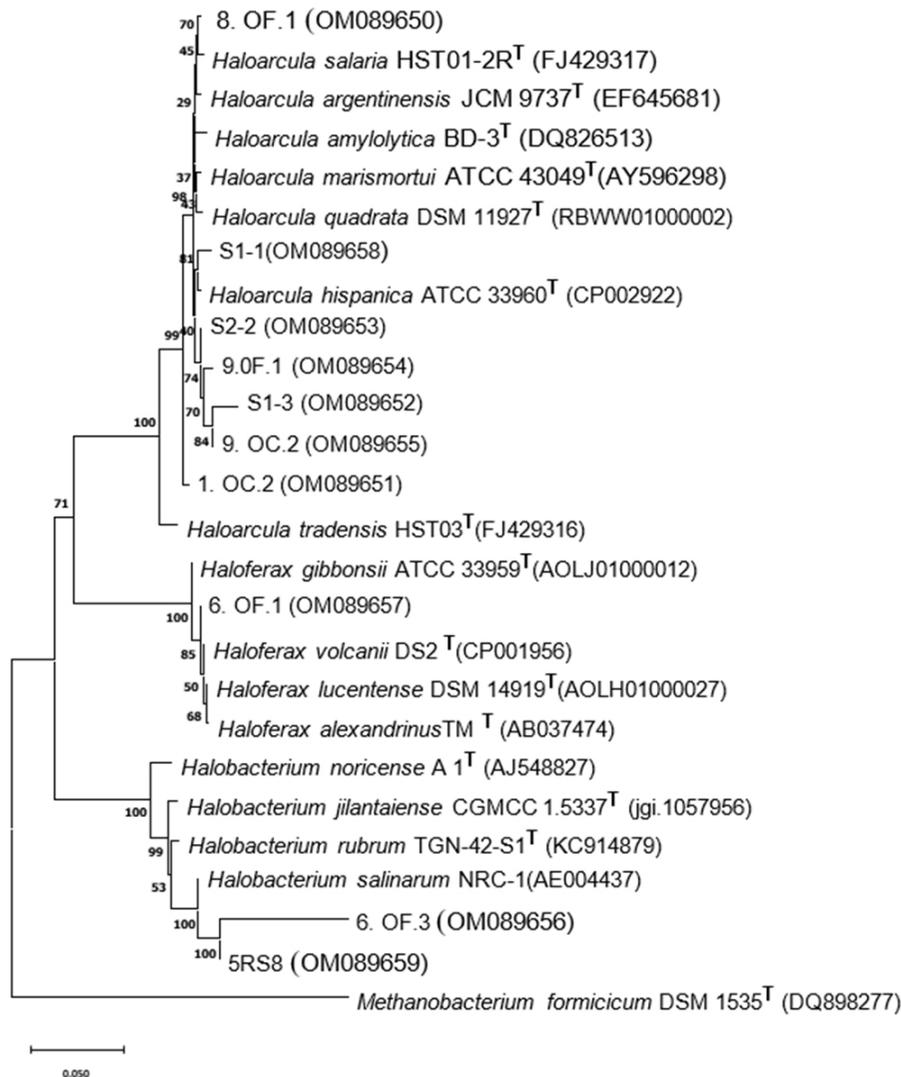
Comparison of 16S rRNA gene sequences with reference sequences of 16S rRNA gene of representative members of the *Halobacteriaceae* family available in EzBioCloud server database showed that all strains belong to the family *Halobacteriaceae*. Seven isolated strains (S2-2, S1-3, 8.OF.1, 1.OC.2, 9.OF.1, 9.OC.2 and S1-1) were placed in the genus *Haloarcula*, two strains (5RS8 and 6.OF.3) belonged to the genus *Halobacterium* and one isolate (6.OF.1) was related to the genus *Haloferax*. Thus, the Eztaxon result of the 16S rDNA sequences extracted from different tested strains indicated that S2-2 and 8.OF.1 exhibited 99.90% and 99.47% similarity with *Haloarcula argentinensis* JCM 9737 strain, respectively. However, 9.OC.2, S1-1 and 9.OF.1 were close to *Haloarcula hispanica* ATCC 33960 strain with similarity of about 99%. S1-3 was also affiliated to *Haloarcula hispanica* ATCC 33960 with 98.53% of similarity. 1.OC.2 was highly related to *Haloarcula salaria* HST01-2R with 99.30% of sequence similarity. 6.OF.1 showed high

similarity (99.90%) with *Haloferax lucentense* DSM 14919. Two strains (5RS8 and 6.OF.3) were homologous to *Halobacterium salinarum* NRC-1 strain with 99.86% and 98.84% similarity, respectively (Fig. 4). The same Neighbor-joining tree (Fig. 4) obtained by using different substitution models showed that 8.OF.1 and *Haloarcula salaria* HST01-2R were closely related (99.47% sequence similarity). Furthermore, the isolated strains S2-2 shared with *Haloarcula hispanica* ATCC 33960 99.50% sequence similarity. As for the sequence of the 16S rRNA gene corresponding to 6.OF.1, it was clustered within the clade that included *Haloferax lucentense* DSM 14919 and *Haloferax alexandrinus* TM (99.80% sequence similarity). However, the isolated strain 1.OC.2 which was not strongly related to other members of the genus *Haloarcula* may belong to a novel species which requires another molecular markers such as DNA-dependent RNA polymerase subunit B' gene (*rpoB'*), DNA-DNA hybridization and DNA G+C content.

**Extracellular hydrolytic enzymes.** All tested strains were able to degrade gelatine. Only one strain (S2-2) revealed a positive esterase, lecithinase and protease activity. No strain was able to produce lipase or cellulase enzyme. Three strains (S2-2, 9.OF.1 and 9.OC.2) were characterized as amylase-producing archaea.

## DISCUSSION

This study was based on the isolation and polyphasic characterization of ten different archaeal strains from the rock salt brines of Djelfa located in semi-arid regions of Algeria. The high salinity, the richness in  $\text{Cl}^-$  and the pH which was slightly acidic to neutral indicated that the brines of the rock salt were convenient habitats for halophilic archaea which require at least 1.5 M NaCl for growth with optimal growth at 3.5 M to 4.5 M NaCl and pH 7.0 to 7.5 (23). However, because of the high concentrations of  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$ , which were ten times and fifty times higher than the Dead Sea water (0.0461 g/l; 0.0237 g/l), respectively (24), the brines of Djelfa's rock salt were even more hostile thalassohalin environment for microbial life.  $\text{Mg}^{2+}$  has a chaotropic influence on proteins and other cellular components. Lunescu et al indicated that the Dead Sea is an extreme environment where most species cannot tolerate the increased salinity and the



**Fig. 4.** Molecular phylogenetic analysis of the haloarchaeal isolated strains based on the 16S rRNA gene sequences. The Neighbor-joining tree was inferred using the Kimura 2-parameter method and expressed in terms of the number of base per site. All ambiguous positions were deleted (pairwise deletion option). The final dataset contained 1495 positions in total. MEGA X was used to perform the evolutionary analysis.

high concentration of  $Mg^{2+}$  ions. This reflects the low abundance of microorganisms in the Dead Sea (25). In spite of the extreme physicochemical conditions, Hadjr El melh of Djelfa hosts a variety of extremely halophilic archaea represented mainly by the genus *Haloarcula*, *Haloferax* and *Halobacterium*. These results were confirmed by the sequential analysis of the 16S rRNA gene. *Haloarcula*, *Halorubrum* and *Natrinema* are the main genera isolated from Meyghan Lake in Iran (26). However, the phylogenetic analysis carried out by Menasria et al. on 68 halophilic archaeal strains isolated from saline sediments

in Algeria showed that among seven identified genera (*Haloferax*, *Haloarcula*, *Halococcus*, *Halogeometricum*, *Haloterrigena*, *Natrialba* and *Natrinema*) within the class *Halobacteria*, *Haloferax* is the dominated genus followed by *Halococcus* (27). In another Algerian study, Boutaiba et al reported six different haloarchaeal genera, including *Haloferax*, *Halobacterium*, *Haladaptatus*, *Halalkalicoccus*, *Halorubrum* and *Halosarcina* (2). Phylogenetic analysis of 16S rRNA genes indicated that each hypersaline ecosystem has its own species richness where its members distribution depend mainly on total salt concentra-

tion, ionic composition, nutrient availability and some physical conditions. The qualitative test of extracellular hydrolytic enzymes production (amylase, protease, gelatinase, esterase, lipase, lecithinase and cellulase) by the isolated archaeal strains revealed that amylase and gelatinase was the most frequently encountered hydrolytic activities. Only one strains (S2-2) related to *Haloarcula hispanica* ATCC 33960 exhibited five hydrolytic activities (gelatinae, protease, esterase, licithinase and amylase). This strain could be useful in biotechnological applications. Two strains (9.OF.1 and 9.OC.2) demonstrated two hydrolytic activities (amylase and gelatinase). Nevertheless, cellulase and lipase activities were absent within all isolated strains. Finding in this study agree with a previous study carried out on Algerian arid and semi-arid wetland ecosystems where halophilic archaea display a large spectrum of hydrolytic enzyme ability (27). In contrast to the current study, Robert et al. established that the hydrolytic activity of the acrchaeal strains is limited in the production of amylase and cellulase (19).

## CONCLUSION

In conclusion, the obtained results that showed the presence of members of the *Halobacteriaceae* family could help with archaeal taxonomy, in particular the halophilic archaeal species from the rock salt brines of Djelfa. Furthermore, the attempt to assess their ability of enzyme production by qualitative test could make the rock salt of Djelfa a good source for isolating halophilic archaea and bacteria that produce industrial enzymes.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was carried out in the Institute of Biology, Bucharest of the Romanian Academy (IBB). I thank Dr Madalin Enache and his team for all the help throughout the internship.

## REFERENCES

- Hacene H, Rafa F, Chebhouni N, Boutaiba S, Bhatnagar T, Baratti JC, et al. Biodiversity of prokaryotic microflora in El Golea salt lake, Algerian Sahara. *J Arid Environ* 2004; 58: 273-284.
- Boutaiba S, Hacene H, Bidle KA, Maupin-Furlow JA. Microbial diversity of the hypersaline Sidi Ameur and Himalatt salt lakes of the Algerian Sahara. *J Arid Environ* 2011; 75: 909-916.
- Khallef S, Lestini R, Myllykallio H, Houali K. Isolation and identification of two extremely halophilic archaea from sebkhas in the Algerian Sahara. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2018; 64: 83-91.
- Mckew BA, Taylor JD, Mcgenity TJ, Underwood GJC. Resistance and resilience of benthic biofilm communities from a temperate saltmarsh to desiccation and rewetting. *ISME J* 2011; 5: 30-41.
- Oren A. The microbiology of red brines. *Adv Appl Microbiol* 2020; 113: 57-110.
- Schneegurt MA (2012). Media and conditions for the growth of halophilic and halotolerant Bacteria and Archaea. In: *Advances in Understanding the Biology of Halophilic Microorganisms*. Ed, Russell H. Vreeland. Springer, pp. 35-58.
- Yildiz E, Ozcan B, Caliskan M. Isolation, characterization and phylogenetic analysis of halophilic Archaea from a salt mine in central Anatolia (Turkey). *Pol J Microbiol* 2012; 61: 111-117.
- Ventosa A, Marquez C, Sanchez-Porro C, de la Haba R R (2012). Taxonomy of Halophilic Archaea and Bacteria. In: *Advances in Understanding the Biology of Halophilic Microorganisms*. Ed, Russell H. Vreeland. Springer, pp. 59-80.
- Grasshoff K, Kremling K, Ehrhardt M (2007). *Methods of Seawater analysis*. 3<sup>rd</sup>, completely revised and extended ed. Wiley.
- Montalvo-Rodriguez R, Lopez-Garriga J, Vreeland RH, Oren A, Ventosa A, Kamekura M. *Haloterrigena thermotolerans* sp. nov., a halophilic archaeon from Puerto Rico. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000; 50: 1065-1071.
- Oren A (2014). The family *Halobacteriaceae*. In: *The prokaryotes*. Ed, Rosenberg E., deLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 41-121.
- Fischer ER, Hansen BT, Nair V, Hoyt FH, Dorward DW. Scanning electron microscopy. *Curr Protoc Microbiol* 2012; 25:2B.2.1-2B.2.47.
- Ruginescu R, Purcăria C, Dorador C, Lavin P, Cojoc R, Neagu S, et al. Exploring the hydrolytic potential of cultured halophilic bacteria isolated from the Atacama Desert. *FEMS Microbiol Lett* 2019; 366: fnz224.
- Kamekura M, Oesterhelt D, Wallace R, Anderson P, Kushner DJ. Lysis of halobacteria in bacto-peptone by bile acids. *Appl Environ Microbiol* 1988; 54: 990-995.
- Litchfield CD, Oren A (2001). Polar lipids and pigments

- as biomarkers for the study of the microbial community structure of solar salterns. In: *Saline Lakes*. Ed, J.M. Melack, R. Jellison & D.B. Herbst. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 81-89.
16. Enache M, Itoh T, Kamekura M, Teodosiu G, Dumitru L. *Haloferax prahovense* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a Romanian salt lake. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007; 57: 393-397.
  17. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 2018; 35: 1547-1549.
  18. Gascuel O, Steel M. Neighbor-joining revealed. *Mol Biol Evol* 2006; 23: 1997-2000.
  19. Ruginescu R, Gomoiu I, Popescu O, Cojoc R, Neagu S, Lucaci I, et al. Bioprospecting for novel halophilic and halotolerant sources of hydrolytic enzymes in brackish, saline and hypersaline lakes of Romania. *Microorganisms* 2020; 8: 1903.
  20. Oren A. Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* 2002; 39: 1-7.
  21. Oren A, Arahal DR, Ventosa A. Emended descriptions of genera of the family *Halobacteriaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009; 59: 637-642.
  22. Lobasso S, Lopalco P, Mascolo G, Corcelli A. Lipids of the ultra-thin square halophilic archaeon *Haloquadratum walsbyi*. *Archaea* 2008; 2: 177-183.
  23. Oren A, Rodrigues-Valera F. The contribution of halophilic Bacteria to the red coloration of saltern crystallizer ponds. *FEMS Microbiol Ecol* 2001; 36: 123-130.
  24. Jacob HJ, Hussein EI, Shakhathreh MAK, Cornelison CT. Microbial community analysis of the hypersaline water of the Dead Sea using high-throughput amplicon sequencing. *Microbiologyopen* 2017; 6(5): e00500.
  25. Ionescu D, Siebert C, Polerecky L, Munwes YY, Lott C, Häusler S, et al. Microbial and chemical characterization of underwater fresh water springs in the Dead Sea. *PLoS One* 2012; 7(6): e38319.
  26. Naghoni A, Emtiazi G, Amoozegar MA, Cretoiu MA, Stal LJ, Etimadifar Z, et al. Microbial diversity in the hypersaline Lake Meyghan, Iran. *Sci Rep* 2017; 7: 11522.
  27. Menasria T, Aguilera M, Hocine H, Benammar L, Ayachi Ammar, Si Bachir A, et al. Diversity and bioprospecting of extremely halophilic archaea isolated from Algerian arid and semi-arid wetland ecosystems for halophilic-active hydrolytic enzymes. *Microbiol Res* 2018; 207: 289-298.