



UNIVERSITÉ FRÈRES MENTOURI CONSTANTINE 1  
INSTITUT DE LA NUTRITION, DE L'ALIMENTATION  
ET DES TECHNOLOGIES AGRO-ALIMENTAIRES  
(I.N.A.T.A.A.)

Département : Biotechnologie



N° d'ordre : 01/D3C/2021

N° de série : 01/IN/2021

## Thèse de Doctorat 3<sup>ème</sup> cycle

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biotechnologie

### Thème

---

## Étude des *Archaea* halophiles extrêmes isolées d'environnements hypersalins algériens et caractérisation de leurs caroténoïdes

---

Présentée par :

**SAHLI Kaouther**

Soutenue le : 05/01/2021

Devant le Jury composé de :

Présidente :	<b>BARKAT Malika</b>	Pr.	<b>I.N.A.T.A.A., U.F.M.C. 1, Algérie</b>
Rapporteur :	<b>KHARROUB Karima</b>	Pr.	<b>I.N.A.T.A.A., U.F.M.C. 1, Algérie</b>
Co- rapporteur :	<b>GOMRI Mohamed Amine</b>	M.C.B	<b>I.N.A.T.A.A., U.F.M.C. 1, Algérie</b>
Examineurs :	<b>DJABRI Belgacem</b>	Pr.	<b>Univ. Larbi Tébessi, Tebessa, Algérie</b>
	<b>BENLOUNISSI Aicha</b>	M.C.A	<b>E.N.S.B., Constantine, Algérie</b>
	<b>GRAMA Borhane Samir</b>	M.C.A	<b>Univ. Larbi Ben M'hidi, O.E.B., Algérie</b>

## Remerciements

*Avant toutes choses, je remercie **Dieu**, le tout puissant, qui m'a donné la force, le courage et la patience d'accomplir ce travail.*

*Ce travail est l'aboutissement d'un long cheminement au cours duquel j'ai bénéficié de l'encadrement, des encouragements et du soutien de plusieurs personnes, à qui je tiens à dire profondément et sincèrement merci.*

*Je tiens, en tout premier lieu, à remercier vivement ma directrice de thèse, **Pr. Karima Kharroub** directrice du laboratoire de recherche Biotechnologie et Qualité des Aliments (BIOQUAL), Université Frères Mentouri Constantine 1, pour m'avoir fait l'honneur de proposer et de diriger ce travail, pour son appui scientifique si précieux, pour ses conseils avisés, ses encouragements dans les moments difficiles, sa compréhension et ses grandes qualités humaines.*

*Je tiens également à exprimer ma profonde gratitude à mon co-encadrant de thèse, **Dr. Mohamed Amine Gomri** pour sa grande disponibilité, son aide précieuse, ses multiples conseils, et ses encouragements constants.*

*Mes plus vifs remerciements s'adressent au **Pr. Malika Barkat**, INATAA, Université Frères Mentouri Constantine 1, qui a honoré ce travail en acceptant de présider le jury.*

*J'adresse également mes sincères remerciements au **Pr. Belgacem Djabri**, Université. Larbi Tébessi, Tebessa ; au **Dr. Aicha Benlounissi**, E.N.S.B., Constantine et au **Dr. Borhane Samir Grama**, Université Larbi Ben M'hidi, Oum El Bouaghi, pour avoir accepté d'évaluer ce travail.*

*J'exprime ma profonde reconnaissance au **Pr. María-José Bonete**, du département d'agrochimie et biochimie, Université d'Alicante, Espagne pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, pour l'intérêt manifesté pour mon travail, la confiance témoignée et le soutien accordé durant mon séjour. Un merci particulier au **Dr. Julia Esclapez** du même département. Il me tient à cœur d'insister sur ses qualités humaines, sa patience, son aide précieuse, son soutien moral, ses encouragements....Muchas gracias Julia!!*

*Mes vifs remerciements vont également au **Pr. Rosa León**, directrice du laboratoire de biochimie, Université de Huelva, Espagne, pour l'accueil chaleureux qu'elle m'a réservée au cours de mon stage, pour ses précieux conseils et pour les facilités accordées dans la réalisation des différentes analyses.*

*Que madame **Fouzia,Aouchiche** responsable du laboratoire de chimie à l'ENASEL, soit assurée de toute ma reconnaissance pour m'avoir aidé dans la collecte et l'analyse des échantillons.*

*Un merci très sincère et affectueux à mon amie **Oulaya Ghenay**, Ingénieur de laboratoire BIOQUAL, pour son aide, son soutien quotidien indéfectible, son humour et son enthousiasme contagieux.*

*J'adresse encore mes remerciements à mes collègues doctorantes : **Romeila, Rania, Fatima et Dalal**, pour leur soutien amical, leur sympathie, et la bonne ambiance qu'elles ont créée.*

*Merci aux membres du laboratoire **BIOQUAL** ainsi qu'à l'ensemble du personnel administratif et technique de l'**I.N.A.T.A.A.** qui ont directement ou indirectement concouru à la réalisation de ce travail.*

*Je ne saurais oublier de remercier les chercheurs que j'ai eu la chance de rencontrer durant mes stages : **Sandra, Veronica, Gloria, Patricia, Anna, Rocio, Marta, Antonio**, et qui m'ont particulièrement touchée par leur enthousiasme à faire partager leur passion, leur gentillesse, leur simplicité et leur grande humilité.*

*Enfin, je tiens à exprimer mes plus chaleureux remerciements et ma profonde reconnaissance et gratitude à ma famille qui n'a jamais cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes mes années d'étude. À mon cher **papa** et à ma chère **maman** à qui je dois la réussite, merci d'être toujours à mes côtés, merci pour votre éducation, confiance, support, encouragement et pour votre amour inconditionnel. Merci de me venir en aide à chaque instant de ma vie. Vous êtes les meilleurs parents au monde. Que Dieu vous préserve et vous accorde santé, longue vie et bonheur. Papa, cette thèse est tout simplement pour toi.*

*Un très grand merci à **mes frères et sœurs**, mes anges gardiens, l'inépuisable source d'affection, de soutien indéfectible, de tendresse, du courage et d'espoir. Que Dieu vous garde pour moi et vous procure bonheur, santé et réussite. Un merci particulier à mon cher frère **Issam**, mon complice de tous les jours, pour sa disponibilité, son support sans faille et son aide logistique (comme tu me l'a toujours dis !). Clin d'œil à mes nièces et mes neveux, particulièrement ma chère **Maroua**.*

*Je tiens également à remercier mon cher oncle **Salah Sahli**, professeur à l'université Frères Mentouri Constantine I pour ses conseils avisés, son support et ses encouragements*

*J'aurais eu du mal à surmonter les moments difficiles ainsi que le stress pendant ces dernières années sans le soutien moral de mes cousines, mes sœurs de cœur : **Zineb, Batoul et Djihed**. Merci d'être toujours là pour moi.*

**Merci à tous**

## Table des matières

	Page
<b>Avant-propos</b> .....	I
<b>Liste des abréviations</b> .....	II
<b>Liste des figures</b> .....	IV
<b>Liste des tableaux</b> .....	VI
<b>Introduction</b> .....	1
<b>Revue bibliographique</b>	
<b>Chapitre 1. <i>Archaea</i> halophiles extrêmes</b>	
1. Extrêmophiles.....	5
1.1. Notion d'extrêmophile.....	5
1.2. Intérêt biotechnologique des extrêmophiles.....	7
2. Organismes halophiles.....	7
3. Habitats des halophiles.....	8
3.1. Eaux salées.....	8
3.1.1. Environnements thalassohalins.....	8
3.1.1.1. Environnement thalassohalins d'origine anthropique : marais salants.....	9
3.1.1.2. Environnements thalassohalins d'origine naturelle : lacs salés, sebkhas et chotts.....	9
3.1.2. Environnements athalassohalins.....	10
3.2. Sols salins.....	11
4. Diversité phylogénétique des halophiles.....	11
5. Distribution des halophiles en fonction de la salinité.....	15
6. <i>Archaea</i> halophiles de la classe <i>Halobacteria</i> .....	15
6.1. Généralités.....	15
6.2. Taxonomie.....	16
6.3. Structures cellulaires.....	17
6.3.1. Morphologie.....	17
6.3.2. Paroi cellulaire.....	19
6.3.3. Lipides et membrane cytoplasmique.....	19
6.4. Métabolisme.....	20

6.5. Génétique.....	21
6.6. Stratégies d'adaptation à la salinité.....	23
7. Étude de la diversité des haloarchaea.....	26
7.1. Approche culturelle.....	26
7.2. Approche non-culturelle.....	26

## **Chapitre 2. Biotechnologie des *Archaea* halophiles extrêmes**

1. Potentiel biotechnologique des haloarchaea.....	28
1.1. Utilisation des cellules des haloarchaea.....	28
1.1.1. Bioremédiation.....	28
1.1.2. Fermentation des aliments.....	28
1.1.3. Utilisation en nanobiotechnologie.....	29
1.1.4. Augmentation de la production du sel.....	29
1.2. Utilisation des biomolécules des haloarchaea.....	29
1.2.1. Enzymes hydrolytiques.....	29
1.2.2. Bactériorhodopsine.....	31
1.2.3. Polyhydroxyalcanoates.....	31
1.2.4. Exopolysaccharides.....	31
1.2.5. Halocines.....	32
1.2.6. Caroténoïdes.....	32

## **Chapitre 3. Caroténoïdes**

1. Introduction aux caroténoïdes.....	33
2. Caroténoïdes produits par les <i>Archaea</i> halophiles extrêmes .....	35
2.1. Types et structures des caroténoïdes.....	35
2.2. Biosynthèse.....	37
2.3. Fonctions biologiques.....	40
3. Caractérisation et purification des caroténoïdes produits par les haloarchaea.....	41
3.1. Extraction.....	41
3.2. Techniques d'analyse et de purification.....	41
3.3. Identification des caroténoïdes.....	42
4. Production des caroténoïdes par les haloarchaea.....	43
5. Intérêt biotechnologique des caroténoïdes des haloarchaea .....	43

5.1. En industrie agroalimentaire.....	43
5.2. Autres applications.....	44

## **Matériel et Méthodes**

1. Déroulement de l'expérimentation.....	45
2. Échantillonnage.....	47
2.1. Présentation des sites d'études.....	47
2.2. Prélèvement des échantillons.....	49
3. Isolement, purification et conservation des isolats.....	51
4. Étude macroscopique et microscopique des isolats.....	52
5. Étude physiologique des isolats.....	52
6. Quantification des pigments caroténoïdes produits par les isolats.....	53
6.1. Culture des isolats.....	53
6.2. Extraction et quantification des caroténoïdes.....	53
7. Caractérisation phénotypique des isolats.....	55
7.1. Utilisation des substrats carbonés.....	55
7.2. Caractérisation biochimique.....	55
7.2.1. Recherche de la cytochrome-oxydase.....	55
7.2.2. Recherche de la catalase.....	55
7.2.3. Réduction des nitrates et production de gaz à partir de nitrate.....	56
7.2.4. Production de sulfure d'hydrogène (H <sub>2</sub> S).....	56
7.2.5. Production de l'indole.....	56
7.2.6. Croissance en anaérobiose sur L-arginine.....	56
7.2.7. Production d'acides à partir de substrats carbonés.....	56
7.3. Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires.....	57
7.3.1. Détermination de l'activité amylolytique.....	57
7.3.2. Détermination de l'activité lipolytique.....	57
7.3.3. Détermination de l'activité protéolytique.....	57
7.4. Sensibilité aux antibiotiques.....	58
7.5. Construction de phénogramme.....	58
8. Caractérisation moléculaire des isolats.....	58
8.1. Extraction de l'ADN génomique.....	58
8.2. Contrôle de la pureté et détermination de la concentration de l'ADN en solution....	59

8.3. Amplification des gènes de l'ARNr 16S par réaction de polymérisation en chaîne..	60
8.4. Électrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR.....	61
8.5. Séquençage des produits PCR.....	61
8.6. Analyses des séquences du gène de l'ARNr 16S.....	62
8.7. Analyse phylogénétique.....	62
8.8. Numéros d'accèsion des séquences nucléiques.....	63
9. Caractérisation des caroténoïdes.....	63
9.1. Production des caroténoïdes.....	63
9.2. Analyse des caroténoïdes extraits par chromatographie liquide haute performance avec détecteur à barrette de diodes (HPLC/DAD).....	64
9.3. Analyse des caroténoïdes par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS).....	64
9.4. Détermination du pouvoir antioxydant des caroténoïdes.....	65
9.4.1. Test DPPH.....	65
9.4.2. Test ABTS.....	66
9.5. Détermination du pouvoir antibactérien des caroténoïdes.....	67
9.5.1. Souches bactériennes testées.....	67
9.5.2. Préparation des suspensions bactériennes et ensemencement.....	67
10. Étude de l'effet de quelques paramètres physico-chimiques sur la croissance et la production de caroténoïdes par la souche la plus productrice.....	68
11. Analyse statistique.....	69

## **Résultats et Discussion**

1. Caractérisation physico-chimique des échantillons.....	70
2. Isolement, purification et sélection des isolats.....	74
2.1. Étude morphologique des isolats.....	76
2.1.1. Étude macroscopique.....	76
2.1.2. Étude microscopique.....	78
3. Étude physiologique des isolats.....	79
3.1. Salinité.....	79
3.2. Température.....	80
3.3. pH.....	81
4. Quantification des caroténoïdes produits par les isolats.....	84
5. Caractérisation phénotypique des isolats.....	85
5.1. Utilisation des substrats carbonés.....	85

5.2. Production d'acides à partir de substrats carbonés.....	89
5.3. Caractérisation biochimique .....	91
5.4. Mise en évidence des activités hydrolytiques extracellulaires.....	91
5.5. Sensibilité aux antibiotiques.....	97
5.6. Phénogramme.....	100
6. Caractérisation moléculaire des isolats.....	103
6.1. Amplification des gènes de l'ARNr 16S.....	103
6.2. Séquençage et analyse des séquences du gène de l'ARNr 16S.....	103
6.2.1. Alignement des séquences nucléotidiques des isolats avec celles des banques de données biologiques .....	105
6.2.2. Analyse phylogénétique.....	108
7. Caractérisation des caroténoïdes des souches sélectionnées.....	110
7.1. Analyse des caroténoïdes extraits par méthodes chromatographiques.....	110
7.1.1. Profil caroténoïdique de la souche <i>Halorubrum</i> sp. BS2.....	111
7.1.2. Profil caroténoïdique de la souche <i>Halogeometricum</i> sp. ME3.....	113
7.1.3. Profil caroténoïdique de la souche <i>Haloarcula</i> sp. BT9.....	114
7.1.4. Profil caroténoïdique de la souche <i>Haloferax</i> sp. ME16.....	116
7.2. Détermination du pouvoir antioxydant des caroténoïdes.....	119
7.2.1. Test DPPH.....	119
7.2.2. Test ABTS.....	121
7.3. Détermination du pouvoir antibactérien des caroténoïdes.....	125
8. Étude de l'effet de quelques paramètres physico-chimiques sur la croissance et la production de caroténoïdes par la souche <i>Halorubrum</i> sp. BS2.....	130
8.1. Effet de la salinité.....	130
8.2. Effet de l'agitation.....	131
8.3. Effet de la température.....	133
8.4. Effet de la lumière.....	134
<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>136</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>140</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>i-xxi</b>
<b>Résumés</b>	

## Avant-propos

Le présent travail a fait l'objet de la publication internationale et des communications internationales et nationales suivantes :

**Sahli, K.**, M. A. Gomri, J. Esclapez, P. Gómez-Villegas, O. Ghennai, M.-J. Bonete, R. León et K. Kharroub Bioprospecting and characterization of pigmented halophilic archaeal strains from Algerian hypersaline environments with analysis of carotenoids produced by *Halorubrum* sp. BS2. Journal of Basic Microbiology, 2020, 60(7), 624-638. [<https://doi.org/10.1002/jobm.202000083>] (**Impact Factor pour 2019 : 1,909**) ;

**Sahli. K.**, M.A. Gomri, K. Kharroub. Antibacterial activity of pigments extracted from *Halorubrum* sp. AW21 isolated from an Algerian solar saltern. Séminaire National sur les Biotechnologies en Algérie SNBA, Constantine, Novembre 2019;

**Sahli. K.**, Biodiversity of halophilic microorganisms producers of pigment isolated from Algerian environments. Journadas Técnicas : Potencial Biotecnológico de las salinas Del Litoral Algarve-Andaluz, Huelva, Espagne, Avril 2019 ;

**Sahli. K.**, M.A. Gomri, K. Kharroub. Mise en évidence de quelques activités enzymatiques chez une archaea halophile isolée du chott El Frain (Sétif). Séminaire International sur les Sciences alimentaires, Constantine, Octobre 2018;

**Sahli. K.**, J. Esclapez, M. J. Bonete, K. Kharroub. Isolement des archaea halophiles productrices de pigments à partir d'un environnement hypersalin algérien. Congrès international : Les Rencontres de l'Agriculture et de la Biologie, Constantine, Mai 2018;

**Sahli. K.**, J. Esclapez, M. J. Bonete, K. Kharroub. Diversité des microorganismes halophiles isolés de la sebkha Ezzemoul (Ain M'lila). 1er colloque international Bioressource et Economie Bleue et Verte, Hammamaet-Tunisie, Avril 2018.

## Liste des abréviations

<b>ABTS :</b>	2,2'-Azinobis-(3 ethylbenzothiazole-6-sulphonate)
<b>Ac asc :</b>	Acide ascorbique
<b>ADN :</b>	Acide DésoxyriboNucléique
<b>ANOVA :</b>	Analyse de la vaiance
<b>ARNr :</b>	Acide RiboNucléique ribosomal
<b>ARNt :</b>	Acide RiboNucléique de transfert
<b>ATCC :</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>ATP :</b>	Adénosine TriPhosphate
<b>Aw :</b>	Activité de l'eau
<b>BHT :</b>	Butyl Hydroxy Toluéne
<b>BLAST:</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<b>CaCl<sub>2</sub> :</b>	Chlorure de Calcium
<b>CECT:</b>	<i>Spanish Type Culture Collection</i>
<b>CGMCC:</b>	<i>China General Microbiological Culture Collection Center</i>
<b>Clustal :</b>	<i>Cluster analysis</i>
<b>Cot :</b>	Carbone organique total
<b>DAD :</b>	Détecteur à barrette de diodes
<b>DDBJ :</b>	<i>DNA DataBase of Japan</i>
<b>ddH<sub>2</sub>O :</b>	Eau ultra pure
<b>ddNTP :</b>	Didésoxyribonucléotide
<b>DGGE :</b>	Électrophorèse sur gel en gradient dénaturant
<b>DMSO:</b>	DiMéthylSulfOxyde
<b>DO:</b>	Densité Optique
<b>DPANN :</b>	<i>Diapherotrites, Parvarchaeota, Aenigmarchaeota, Nanoarchaeota, Nanohaloarchaeota</i>
<b>DPPH :</b>	2,2-diphényl-1-picryl hydrazyl
<b>DSM :</b>	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen</i>
<b>E:</b>	Essai
<b>EC :</b>	<i>Enzyme comission</i>
<b>EC50</b>	concentration efficace médiane
<b>ED :</b>	Entner-Doudoroff
<b>EDTA :</b>	Éthylène Diamine Tétra-Acétique
<b>EM :</b>	Embden-Meyerhof
<b>ENA:</b>	<i>European Nucleotide Archive</i>
<b>ENASEL:</b>	Entreprise National de SEL
<b>EPS :</b>	ExoPolySaccharides
<b>ET:</b>	Écart Type
<b>Ext :</b>	Extrait caroténoïdique
<b>FAME:</b>	Analyse des esters méthyliques d'acides gras
<b>FISH :</b>	Hybridation in situ en fluorescence
<b>Gy :</b>	Gray
<b>HEPES :</b>	N-[2-Hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]
<b>HPLC:</b>	Chromatographie en phase liquide à haute performance
<b>HTS :</b>	Criblage à haut débit
<b>ICSP :</b>	Comité international sur la systématique des procaryotes
<b>INSID :</b>	Institut National des Sols, de l'Irrigation et Drainage
<b>IU :</b>	Unité internationale
<b>JCM :</b>	<i>Japan Collection of Microorganisms</i>
<b>KCl :</b>	Chlorure de potassium
<b>KCTC :</b>	<i>Korean Collection for Type Cultures</i>
<b>kDa :</b>	kilo Dalton

<b>KEGG :</b>	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:</b>	Potassium dihydrogénophosphate
<b>M:</b>	Molarité
<b>MALDI-TOF/MS:</b>	<i>Matrix Assisted Laser Desorption-Ionization Time Of Flight/ Mass Spectrometry</i>
<b>MGM :</b>	<i>Modified Growth Medium</i>
<b>MgCl<sub>2</sub> :</b>	Chlorure de magnésium
<b>MgSO<sub>4</sub> :</b>	Sulfate de magnésium
<b>MOPS:</b>	Acide 3-morpholino-1-propanesulfonique.
<b>Mpa:</b>	Méga Pascal
<b>MS :</b>	<i>Spectrométrie de masse</i>
<b>NA :</b>	Numéro d'Accession
<b>NaCl :</b>	Chlorure de sodium
<b>NaOH :</b>	Hydroxyle de sodium
<b>NCBI :</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>NH<sub>4</sub>Cl :</b>	Chlorure d'ammonium
<b>Opt :</b>	Optimal
<b>ORB :</b>	<i>Origin Recognition Boxes</i>
<b>oriC :</b>	<i>Origin of Replication Complex</i>
<b>pb:</b>	Paire de bases
<b>PCR :</b>	Réaction en chaîne par polymérase
<b>PGP-Me :</b>	PhosphatidylGlycérol Phosphate Méthyl ester
<b>PHA :</b>	PolyHydroxyAlcanoates
<b>Prod :</b>	Taux de production des caroténoïdes
<b>RISA :</b>	Analyse de l'espace intergénique de l'ADN ribo- somial
<b>SM :</b>	<i>Simple Matching</i>
<b>S-TeGD:</b>	TétraGlycosyl sulfaté
<b>S-TGD-1:</b>	TriGlycosyl sulfaté
<b>TAE:</b>	Tris, Acétate, EDTA
<b>TGD-1:</b>	Triglycosyl archeaol Galactosyl-mannosyl-glucosyl
<b>TH :</b>	Thomson
<b>TMAO :</b>	Oxyde de triméthylamine
<b>Tpm :</b>	Tour par minute
<b>T-RFLP :</b>	Polymorphisme de longueur des fragments de restriction terminaux
<b>UPGMA :</b>	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean</i>
<b>UV :</b>	UltraViolets
<b>v/p :</b>	Volume par poids
<b>v/v :</b>	Volume par volume
<b><math>\bar{X}</math> :</b>	Moyenne

## Liste des figures

Page

### Revue bibliographique

<b>Figure 1.</b>	Arbre phylogénétique rapportant les organismes extrêmophiles et les caractéristiques de résistance qui apparaissent chez au moins une espèce de chaque genre identifié par un code couleur.....	4
<b>Figure 2.</b>	Situation géographique des chotts et sebkhas en Algérie.....	10
<b>Figure 3.</b>	Distribution des halophiles dans les trois domaines du vivant.....	13
<b>Figure 4.</b>	Distribution des microorganismes halophiles en fonction de la salinité.....	14
<b>Figure 5.</b>	Classification phylogénétique des haloarchaea.....	17
<b>Figure 6.</b>	Aspects microscopiques des haloarchaea.....	18
<b>Figure 7.</b>	Différents systèmes de transport des ions chez les haloarchaea selon la stratégie «salt-in».....	24
<b>Figure 8.</b>	Structure chimique générale des caroténoïdes.....	35
<b>Figure 9.</b>	Carte métabolique de référence de la biosynthèse des caroténoïdes sur la base KEGG pathway.....	36
<b>Figure 10.</b>	Premières étapes de la biosynthèse des caroténoïdes C <sub>50</sub> chez les haloarchaea....	38
<b>Figure 11.</b>	Étapes de la conversion du lycopène en bactériorubérine chez <i>Haloarcula japonica</i> .....	40

### Matériel et Méthodes

<b>Figure 12.</b>	Schéma récapitulatif de la démarche expérimentale.....	46
<b>Figure 13.</b>	Répartition géographique des sites étudiés.....	48
<b>Figure 14.</b>	Photographies des sites étudiés.....	50
<b>Figure 15.</b>	Protocole d'extraction et de quantification des caroténoïdes.....	54

### Résultats et Discussion

<b>Figure 16.</b>	Aspects macroscopiques de quelques souches de l'étude sur milieu MGM solide.....	78
<b>Figure 17.</b>	Aspects microscopiques de quelques souches de l'étude sous agrandissement 1000 x après coloration de Gram.....	79
<b>Figure 18.</b>	Représentation de la croissance des souches à différentes salinités.....	80
<b>Figure 19.</b>	Représentation de la croissance des souches à différentes températures.....	81
<b>Figure 20.</b>	Représentation de la croissance des souches à différents pH.....	82
<b>Figure 21.</b>	Spectre d'absorption des caroténoïdes produits par la souche BT4.....	85
<b>Figure 22.</b>	Exemples d'activités hydrolytiques détectées.....	93
<b>Figure 23.</b>	Effectifs des souches ayant pu hydrolyser les substrats testés.....	93
<b>Figure 24.</b>	Phénogramme basé sur la similarité de 97 caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques des 43 souches étudiées.....	101
<b>Figure 25.</b>	Produits d'amplification PCR du gène d'ARNr 16S de quelques souches sur gel d'agarose à 1 % (p/v).....	103
<b>Figure 26.</b>	Distribution des souches étudiées parmi les différents genres identifiés.....	106
<b>Figure 27.</b>	Arbre phylogénétique construit avec la méthode du <i>Neighbor Joining</i> et basé sur les séquences du gène de l'ARNr 16S des 43 souches étudiées (marquées par des cercles noirs) et de 16 souches types proches.....	107

<b>Figure 29.</b>	Chromatogramme obtenu après séparation, par HPLC, de l'extrait caroténoïdique de la souche <i>Halorubrum</i> sp. BS2.....	112
<b>Figure 31.</b>	Chromatogramme obtenu après séparation, par HPLC, de l'extrait caroténoïdique de la souche <i>Halogeometricum</i> sp. ME3.....	113
<b>Figure 33.</b>	Chromatogramme obtenu après séparation, par HPLC, de l'extrait caroténoïdique de la souche <i>Haloarcula</i> sp. BT9.....	115
<b>Figure 35.</b>	Chromatogramme obtenu après séparation, par HPLC, de l'extrait caroténoïdique de la souche <i>Haloferax</i> sp. ME16.....	117
<b>Figure 37.</b>	Pourcentage d'inhibition du radical DPPH• en fonction des concentrations des extraits caroténoïdiques.....	120
<b>Figure 38.</b>	Pourcentage d'inhibition du radical ABTS•+ en fonction des concentrations des extraits caroténoïdiques.....	122
<b>Figure 39.</b>	Exemples d'activité antibactérienne des extraits caroténoïdiques.....	129
<b>Figure 40.</b>	Suivi de la croissance et la teneur en caroténoïdes de la souche <i>Halorubrum</i> sp. BS2 sous différentes salinités.....	131
<b>Figure 41.</b>	Suivi de la croissance et la teneur en caroténoïdes de la souche <i>Halorubrum</i> sp. BS2 sous différentes vitesses d'agitation.....	132
<b>Figure 42.</b>	Suivi de la croissance et la teneur en caroténoïdes de la souche <i>Halorubrum</i> sp. BS2 sous différentes températures.....	133
<b>Figure 43.</b>	Suivi de la croissance et la teneur en caroténoïdes de la souche <i>Halorubrum</i> sp. BS2 sous différentes intensités lumineuses.....	135

### Annexes

<b>Figure 28.</b>	Arbre phylogénétique construit avec la méthode du maximum de vraisemblance et basé sur les séquences du gène de l'ARNr 16S des souches de l'étude (marquées par des losanges noirs) et des souches types proches.....	xii
<b>Figure 30.</b>	Spectres d'absorption visibles et de masse correspondant aux composants de l'extrait caroténoïdique de la souche <i>Halorubrum</i> sp. BS2.....	xiii
<b>Figure 32.</b>	Spectres d'absorption visibles et de masse correspondant aux composants de l'extrait caroténoïdique de la souche <i>Halogeometricum</i> sp. ME3.....	xiv
<b>Figure 34.</b>	Spectres d'absorption visibles et de masse correspondant aux composants de l'extrait caroténoïdique de la souche <i>Haloarcula</i> sp. BT9.....	xvi
<b>Figure 36.</b>	Spectres d'absorption visibles et de masse correspondant aux composants de l'extrait caroténoïdique de la souche <i>Haloferax</i> sp. ME16.....	xviii

## Liste des tableaux

Page

### Revue bibliographique

<b>Tableau 1.</b>	Classification des organismes extrémophiles en fonction de leurs paramètres physico-chimiques de croissance et exemples de leurs applications biotechnologiques .....	6
<b>Tableau 2.</b>	Classification des organismes en fonction de leur réponse au sel.....	8
<b>Tableau 3.</b>	Critères exigés et recommandés pour l'identification d'un taxon au sein des <i>Halobacteria</i> .....	26
<b>Tableau 4.</b>	Exemples d'haloenzymes et leurs propriétés physico-chimiques.....	30
<b>Tableau 5.</b>	Structures chimiques de la bactériorubérine et de ses dérivés.....	34

### Matériel et Méthodes

<b>Tableau 6.</b>	Distribution des échantillons par site et par point de prélèvement.....	50
<b>Tableau 7.</b>	Composition du mélange réactionnel pour la PCR.....	60
<b>Tableau 8.</b>	Gradient d'éluion utilisé pour la séparation chromatographie liquide haute performance/spectrométrie de masse.....	65
<b>Tableau 9.</b>	Valeurs de salinité, d'agitation, de température, et d'intensité lumineuse utilisées pour la détermination des taux de croissance et de production des caroténoïdes.....	69

### Résultats et Discussion

<b>Tableau 10.</b>	Résultats de l'analyse physico-chimique des échantillons.....	71
<b>Tableau 11.</b>	Répartition des isolats selon leur provenance (site et échantillon).....	73
<b>Tableau 12.</b>	Caractères macroscopiques et microscopiques des isolats.....	75-77
<b>Tableau 14.</b>	Taux de production des caroténoïdes par les isolats (mg/L).....	89
<b>Tableau 15.</b>	Caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques des souches sélectionnées.....	86-88;90-92;94-96;98-99
<b>Tableau 17.</b>	Résultats des alignements des séquences des gènes de l'ARNr 16S des souches étudiées avec les banques ENA/Genbank/DDBJ (version 09-2020) et EzBioCloud (version 05-2020).....	104
<b>Tableau 18.</b>	Caractéristiques des caroténoïdes produits par <i>Halorubrum</i> sp.BS2 d'après les résultats d'analyse par HPLC/DAD et LC/MS.....	112
<b>Tableau 19.</b>	Caractéristiques des caroténoïdes produits par la souche <i>Halo geometricum</i> sp.ME3 d'après les résultats de HPLC/DAD et LC/MS.....	114
<b>Tableau 20.</b>	Caractéristiques des caroténoïdes produits par la souche <i>Haloarcula</i> sp.BT9 d'après les résultats de HPLC/DAD et LC/MS.....	116
<b>Tableau 21.</b>	Caractéristiques des caroténoïdes produits par la souche <i>Haloferax</i> sp.ME16 d'après les résultats de HPLC/DAD et LC/MS.....	117
<b>Tableau 23.</b>	Valeurs d'EC50 d'activité antioxydante des extraits caroténoïdiques vis-à-vis du radical DPPH.....	121
<b>Tableau 25.</b>	Valeurs d'EC50 d'activité antioxydante des extraits caroténoïdiques vis-à-vis du radical ABTS•+.....	123
<b>Tableau 26.</b>	Diamètres d'inhibition des extraits caroténoïdiques vis-à-vis des souches bactériennes testées.....	126

## Annexes

<b>Tableau 13.</b>	Caractérisation physiologique des souches de l'étude.....	iv-v
<b>Tableau 16.</b>	Codification des caractères phénotypiques des souches utilisés pour la construction du phénogramme.....	vi-vii-viii;xi-x-ix
<b>Tableau 22.</b>	Valeurs des pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• par les extraits caroténoïdiques testés.....	xix
<b>Tableau 24.</b>	Valeurs du pourcentage d'inhibition du radical libre ABTS•+ par les extraits caroténoïdiques testés.....	xx
<b>Tableau 27.</b>	Valeurs de densité optique à 600 nm et du taux de production des caroténoïdes de la souche <i>Halorubrum</i> sp. BS2 sous différentes salinités, températures, vitesses d'agitation et intensités lumineuses.....	xxi

# **INTRODUCTION**

Depuis de nombreuses années, la prise de conscience des impératifs de la sécurité alimentaire et de la protection de l'environnement a éveillé l'enthousiasme de l'industrie agroalimentaire pour remplacer tout ce qui est chimique et artificiel par des composés naturels. Ce constat est fortement corrélé à deux raisons principales : les effets potentiellement toxiques des substances chimiques et la tendance actuelle où les consommateurs se tournent vers l'utilisation de produits éco-compatibles et biodégradables (Kumar *et al.*, 2019).

Les additifs alimentaires occupent une place importante dans le secteur des industries agroalimentaires. En effet, ils servent à améliorer la saveur, la texture, l'apparence et la conservation des aliments. Actuellement, plus de 300 additifs classés en environ 25 catégories fonctionnelles sont utilisés, avec une valeur nette du marché estimée à 37,91 milliards de dollars en 2020 (Market Data Forecast, 2020). Toutefois, les chercheurs recommandent de ramener ce nombre à 48, étant donné que la plupart d'entre eux sont issus de la synthèse chimique et leur utilisation est remise en cause. Certains sont dits allergisants, alors que d'autres peuvent provoquer de l'hyperactivité chez les enfants, ou encore soupçonnés d'être cancérigènes (Gallen et Pla, 2013 ; Kumar *et al.*, 2019 ; Martins *et al.*, 2019). Désormais, de nouvelles sources naturelles en biomolécules actives remplaçant les additifs chimiques sont recherchées pour répondre aux besoins de l'industrie.

L'une des stratégies prometteuses pour la recherche de substances bioactives consiste en la bioprospection de microorganismes proliférant dans les environnements extrêmes. Ces microorganismes qualifiés d'extrémophiles ont, au cours de l'évolution, développé des stratégies adaptatives très variées. Ils présentent de ce fait un répertoire de voies métaboliques et de biomolécules originales leur permettant non seulement de survivre dans des conditions extrêmes, mais aussi de se développer souvent de manière optimale (Rampelotto, 2013 ; Giddings et Newman, 2015 ; Schröder *et al.*, 2020).

En fonction de leurs paramètres physico-chimiques de croissance et des conditions dans lesquelles ils existent, les microorganismes extrémophiles peuvent être divisés en plusieurs catégories. Les *Archaea* halophiles extrêmes ou haloarchaea figurent parmi les extrémophiles les plus étudiées. Elles colonisent les écosystèmes hypersalins (lacs salés, marais salants, sebkhas, mer Morte) et parviennent à s'adapter aux fortes salinités, et parfois même à d'autres facteurs de stress tels que les températures relativement élevées, les pH alcalins, les faibles concentrations en oxygène, le rayonnement solaire, etc. (De la Haba *et al.*, 2011 ; Andrei *et al.*, 2012 ; Stan-Lotter et Fendrihan, 2015). De récents développements prouvent clairement que les composants cellulaires de ces microorganismes sont uniques et fournissent une source

valable d'une grande variété de biomolécules aux propriétés, aux structures et aux fonctions aussi variées qu'originales (Amoozegar *et al.*, 2017 ; Singh et Singh, 2017 ; Torregrosa-Crespo *et al.*, 2017 ; Kumar et Tiwari, 2019).

Les pigments figurent parmi les composés d'intérêt que peuvent synthétiser les haloarchaea. Ces molécules, principalement de type C<sub>50</sub> caroténoïdes, jouent un rôle important dans les processus physiologiques et moléculaires de ces microorganismes tels que la protection vis-à-vis du rayonnement solaire et l'adaptation aux environnements extrêmes (Torregrosa-Crespo *et al.*, 2018). Ces substances sont d'un grand intérêt biotechnologique et représentent de meilleures alternatives à certains additifs chimiques. Ainsi, le marché mondial des caroténoïdes produits par différents organismes a été valorisé à 1,5 milliard de dollars en 2017 et pourrait atteindre 2,0 milliards de dollars d'ici 2022 (Farkas *et al.*, 2020).

En effet, les caroténoïdes peuvent être utilisés comme colorants naturels dans les denrées alimentaires, aussi bien pour les êtres humains que pour les animaux. Également, grâce à leur fort potentiel antioxydant, ces composés serviraient d'agents de conservation des aliments en les protégeant des altérations provoquées par l'oxydation, ou encore d'ingrédients fonctionnels améliorant la qualité nutritionnelle des produits (Rodrigo-Baños *et al.*, 2015 ; Torregrosa-Crespo *et al.*, 2018 ; Giani *et al.*, 2019). En outre, la production des caroténoïdes par les halorchaea offre des avantages uniques étant donné que la tolérance de ces microorganismes aux fortes salinités empêche la contamination, ce qui permet de travailler dans des conditions non stériles, facilitant ainsi leur culture à grande échelle et réduisant les coûts de production. Aussi, le processus d'extraction est facile, rapide et pas cher, la lyse cellulaire étant simplement provoquée par la diminution de la concentration en sel (Rodrigo-Baños *et al.*, 2015 ; Torregrosa-Crespo *et al.*, 2018 ). Cependant, en dépit de ces avantages, peu d'attention a été portée aux caroténoïdes haloarchéens, et leurs applications biotechnologiques restent encore peu explorées. Ceci est dû, d'une part au manque d'informations sur leur métabolisme et les voies de leur biosynthèse, et d'autre part à la rareté des travaux sur ces caroténoïdes, leur production et leurs propriétés biologiques (Giani *et al.*, 2019).

L'Algérie est un pays écologiquement très diversifié qui recèle de nombreux environnements hypersalins représentés, principalement par les chotts et les sebkhas, et dont un certain nombre est classé sur la liste Ramsar des zones humides d'importance internationale. Ces écosystèmes constituent des milieux originaux par leur emplacement géographique, les conditions environnementales qui s'y trouvent et les communautés biologiques qui s'y développent (Demnati, 2013 ; Demnati *et al.*, 2017).

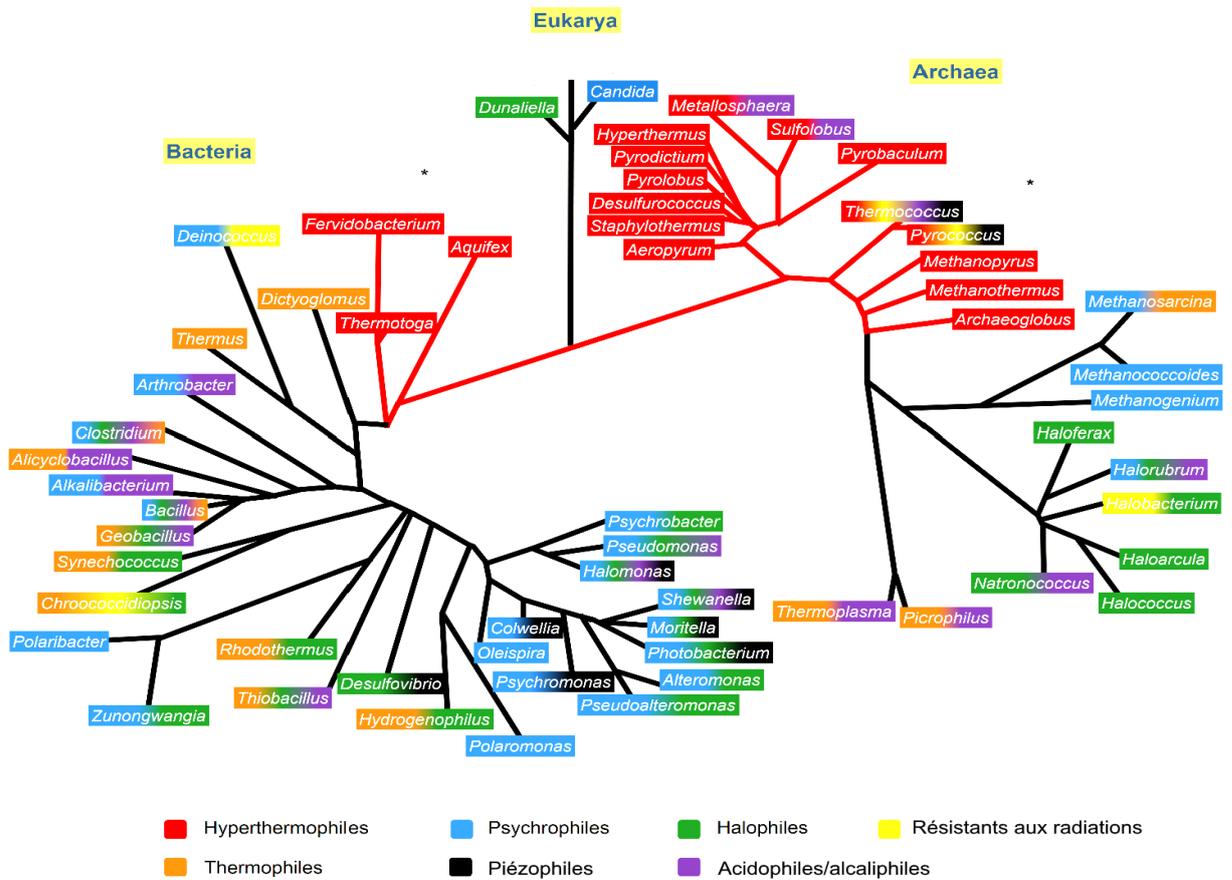
Des travaux académiques se sont déjà intéressés aux environnements hypersalins algériens mettant en avant leur diversité microbienne (Hacène *et al.*, 2004 ; Kharroub, 2007 ; Boutaiba *et al.*, 2011 ; Imadalou Idress *et al.*, 2013 ; Khellaf, 2019 ; Menasria *et al.*, 2018 ; Akmoussi-Toumi *et al.*, 2020). Toutefois, très peu d'études existent sur les molécules bioactives des *Archaea* halophiles extrêmes (Kebbouche-Gana *et al.*, 2009 ; Kharroub *et al.*, 2014 ; Quadri *et al.*, 2016 ; Menasria *et al.*, 2018), et aucune d'entre elles n'a porté sur les caroténoïdes produits par ces microorganismes, leurs propriétés biologiques et leurs éventuelles potentialités biotechnologiques. C'est donc dans le but de contribuer aux études portant sur les haloarchaea isolées des écosystèmes salins algériens et d'explorer leur potentiel à produire des caroténoïdes que nous avons entrepris cette étude. Les principaux objectifs de ce travail sont les suivants :

- Isoler des *Archaea* halophiles extrêmes à partir d'échantillons de saumures et de sels collectés à partir de divers environnements hypersalins algériens et évaluer leur potentiel de production de caroténoïdes ;
- Caractériser sur le plan morphologique, physiologique, biochimique et moléculaire les souches les plus intéressantes ;
- Caractériser les caroténoïdes produits par une sélection de ces souches et estimer leur pouvoir antioxydant et antibactérien.

Ce manuscrit est structuré en quatre parties. La première est consacrée à une revue bibliographique concernant les *Archaea* halophiles extrêmes, leur écologie, leur taxonomie, leur adaptation aux conditions extrêmes, ainsi que leurs propriétés biotechnologiques. Cette partie traitera également des caroténoïdes haloarchéens, leurs propriétés et leurs différentes applications. La deuxième partie portera sur la démarche expérimentale adoptée et les différentes techniques employées pour la réalisation de ce travail. La troisième partie exposera les résultats obtenus et leur discussion. Enfin, la dernière partie rassemblera la conclusion finale et mettra en évidence les perspectives possibles de ce travail.

**REVUE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

**Chapitre 1. *Archaea***  
**halophiles extrêmes**  
**(Haloarchaea)**



**Figure 1.** Arbre phylogénétique rapportant les organismes extrêmophiles et les caractéristiques de résistance qui apparaissent chez au moins une espèce de chaque genre identifié par un code couleur (Dalmaso *et al.*, 2015).

## 1. Extrêmophiles

### 1.1. Notion d'extrêmophile

Le terme extrêmophile a été inventé pour la première fois, en 1974, par MacElory, et désigne tout organisme adapté pour croître de façon optimale dans des conditions extrêmes, c'est-à-dire hostiles pour la plupart des autres organismes vivants, tels que de fortes concentrations en sel, des pH acides ou alcalins, des températures élevées ou basses, une pression élevée, une faible activité d'eau, une faible concentration en nutriments, des radiations ionisantes élevées ou de hautes concentrations en métaux lourds (Chakravorty et Patra, 2012 ; Singh *et al.*, 2019). Beaucoup de ces organismes sont qualifiés de polyextrêmophiles, ayant la capacité de s'adapter à deux ou plusieurs formes de stress environnemental en même temps (Seckbach et Rampelotto, 2015). Par exemple *Natrialba hulunbeirensis* est une archée polyextrêmophile présentant une croissance optimale à pH 9,0 et à une salinité de 20 % (p/v) (Bowers et Wiegel, 2011).

Les extrêmophiles appartiennent aux trois domaines du vivant (*Bacteria*, *Archaea*, *Eucarya*). Cependant, la majorité est constituée des procaryotes dont la plus grande partie est représentée par des archées (Horikoshi et Bull, 2011 ; Chakravorty *et al.*, 2012) (Figure 1).

La notion d'extrêmophile est différente de celle d'extrêmotolérant. En effet, les extrêmophiles exigent des conditions extrêmes pour proliférer, tandis que les extrêmotolérants se contentent de les supporter, mais vivent en général dans des conditions «normales» d'un point de vue anthropocentrique (Rampelotto, 2013). À noter également que certaines espèces peuvent survivre dans des environnements extrêmes dans un état de dormance sans être capables de croître ou de se multiplier dans ces conditions (Horikoshi et Bull, 2011).

Physiologiquement, les extrêmophiles forment un groupe assez vaste et hétérogène incluant des espèces aérobies, anaérobies, chimioorganotrophes, chimiolithotrophes et photohétérotrophes (Durvasula et Rao, 2018).

En fonction de leurs paramètres de croissance et des conditions dans lesquelles ils existent, les extrêmophiles peuvent être divisés en plusieurs catégories (Tableau 1).

**Tableau 1.** Classification des organismes extrémophiles en fonction de leurs paramètres physico-chimiques de croissance et exemples de leurs applications biotechnologiques. Tableau adapté de Horikoshi *et al.* (2011) ; Giddings et Newman, 2015 ; Rampelotto (2016) ; Dumorne *et al.* (2017) et Kour *et al.* (2019).

Facteur environnemental	Classe	Paramètres de croissance	Exemples	Environnement/source	Applications	
					Cellules	Biomolécules
Haute température	Thermophile	60-80 °C	<i>Synechococcus lividus</i>	-Sources chaudes -Gisements pétroliers -Monts hydrothermaux -Zones volcaniques et sols chauffés	-Bioremédiation -Nanotechnologie -Cellules hôtes	-Thermozymes -Biopolymères -Substances antimicrobiennes
	Hyperthermophile	> 80 °C	<i>Pyrolobus fumarii</i>			
Basse température	Psychrophile	< 15 °C	<i>Psychrobacter immobilis</i> <i>Chlamydomonas nivalis</i>	-Régions arctiques -Glaces polaires -Océans profonds	-Bioremédiation	-Enzymes -Protéines -Acides gras insaturés -Substances antimicrobiennes
Forte salinité	Halophile	1-5 M NaCl	<i>Halobacteriales</i> <i>Dunaliella salina</i>	-Lacs salés -Marais salants -Produits salés	-Bioremédiation -Nanotechnologie -Production des sels	-Enzymes -Solutés compatibles -Glycérol -β-carotène
pH acide	Acidophile	pH < 3	<i>Picrophilus oshimae</i> <i>Stygiolobus azoricus</i>	-Geysers -Lacs sulfuriques	-Bioremédiation -Bioconservation -Production d'énergie	-Enzymes stables à pH acide -Molécules anticancéreuses
pH alcalin	Alcalophile	pH > 9	<i>Bacillus firmus</i> <i>Haloanaerobium</i> <i>alcaliphilum</i>	Lacs et déserts de soude	-Bioremédiation -Biolithiviation	-Enzymes stables à pH alcalin -Substances antimicrobiennes
Haute pression	Piézophile	≥ 40 MPa	<i>Colwellia piezophila</i> <i>Photobacterium</i> <i>frigidiphilum</i>	-Océan profond -Monts hydrothermaux	/	-Enzymes stables à haute pression
Radiations ionisantes	Radiorésistant	> 1 kGy	<i>Deinococcus radiodurans</i> , <i>Thermococcus</i> <i>gammatolerans</i>	-Sable du désert -Matériel médical -Sites radioactifs	-Bioremédiation des déchets radioactifs -Médecine régénérative -Production de bioéthanol	-Substances antimicrobiennes
Fortes concentrations de métaux lourds	Metallotolérant	>1 mM Métaux lourds	<i>Halomonas sp.</i> GFAJ-1	-Mines -Eaux polluées par des métaux lourds	-Bioremédiation	/
Faible concentration en nutriments	Oligotrophe	1-15 mg cot/litre	<i>Sphingopyxis alaskensis</i> <i>Pelagibacter ubique</i>	-Gyres océaniques	/	/
Dessiccation	Xérophile	Aw ≤ 0,85	<i>Artemia salina</i> <i>Methanosarcina barkeri</i>	-Déserts -Sols volcaniques	/	/

M MPa : mégapascal ; Gy : Gray ; cot : carbone organique total ; Aw : activité d'eau ; / : pas de données.

## 1.2. Intérêt biotechnologique des extrémophiles

Les extrémophiles représentent une nouvelle frontière pour la biotechnologie. Ils ont suscité un intérêt particulier en raison de leurs multiples applications (Enache *et al.*, 2017) (Tableau 1). On peut distinguer deux types d'applications différentes. Le premier repose sur l'utilisation directe des organismes. C'est le cas en particulier pour les applications liées à la bioremédiation et à la biolixiviation (Giovanella *et al.*, 2020). Le second type d'applications repose sur l'utilisation des biomolécules issues des extrémophiles. Ces biomolécules sont adaptées pour fonctionner de manière optimale dans les conditions de croissance habituelles de ces organismes. Elles sont donc hautement stables aux conditions physico-chimiques extrêmes et offrent un large choix d'utilisations. Parmi ces biomolécules figurent les protéines, les enzymes, les lipides, les polymères, les extrémolytes, les pigments, les biocarburants, etc. (Raddadi *et al.*, 2015 ; Dumorne *et al.*, 2017 ; Schröder *et al.*, 2020).

## 2. Organismes halophiles

Les halophiles (du grec *halos*, sel et *philein*, aimer) sont des organismes qui requièrent des salinités élevées pour leur croissance et leur survie (Schiraldi et De Rosa, 2016). Ils peuvent être classés en fonction de la concentration en sels requise pour une croissance optimale en plusieurs catégories. La classification la plus adoptée est celle proposée par Kushner en 1978 et qui a été légèrement modifiée par Oren en 2013a. Elle divise les halophiles en quatre catégories : halophiles faibles, halophiles modérés, halophiles extrêmes limites et les halophiles extrêmes. S'ajoute à ces catégories les halotolérants qui ne présentent pas un besoin absolu de sel pour leur croissance, mais peuvent se développer à des salinités élevées (Tableau 2). À noter que de nombreux facteurs environnementaux et/ou nutritionnels peuvent modifier la résistance et le besoin en sels de ces organismes (DasSarma et DasSarma, 2017).

En plus d'un milieu riche en sel, les halophiles sont soumis à d'autres types de stress, comme les faibles concentrations en oxygène, les températures extrêmes, le pH alcalin, un fort rayonnement solaire, et de ce fait, ils sont qualifiés de polyextrémophiles (De La Haba *et al.*, 2011).

**Tableau 2.** Classification des organismes en fonction de leur réponse au sel (Oren, 2013a).

Catégorie	Propriétés	Exemples
<b>Non-halophile</b>	Croissance optimale à moins de 0,2 M de sel	La plupart des bactéries d'eau douce
<b>Halotolérant</b>	Non halophile tolérant la présence de sel, appelé halotolérant extrême si la concentration en sel dépasse 2,5 M	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b>Halophile faible</b>	Croissance optimale à 0,2-0,5 M de sel	La plupart des bactéries marines
<b>Halophile modéré</b>	Croissance optimale à 0,5-2,5 M de sel	<i>Salinivibrio costicola</i> <i>Halomonas elongata</i>
<b>Halophile extrême limite</b>	Croissance optimale à 1,5-4,0 M de sel	<i>Halorhodospira halophila</i>
<b>Halophile extrême</b>	Croissance optimale à 2,5-5,2 M de sel	<i>Halobacterium salinarum</i> <i>Salinibacter ruber</i>

### 3. Habitats des halophiles

Les halophiles colonisent les environnements hypersalins largement répandus sur notre planète, représentés principalement par les eaux et les sols salés. Ils sont également retrouvés dans les produits salés, les aliments fermentés, les sels marins ou de roches ainsi que sur les peaux d'animaux traités par le sel pour leur conservation (Ventosa *et al.*, 2014 ; Oren, 2016).

#### 3.1. Eaux salées

Les eaux sont considérées comme salées lorsque la salinité dépasse 0,3 % (p/v), et hypersalées lorsqu'elles présentent des concentrations en sels supérieures à celle de l'eau de mer, qui est d'environ 3,5 % (p/v) (Rodriguez-Valera, 1988 ; DasSarma et DasSarma, 2017). L'origine des eaux ainsi que leur composition ionique constituent des facteurs clés pour classer les environnements hypersalins aquatiques en deux catégories : thalassohalins et athalassohalins (Ghosh *et al.*, 2019).

##### 3.1.1. Environnements thalassohalins

Les environnements thalassohalins (du grec *thalasso*, la mer) sont issus de l'évaporation de l'eau de mer, ils sont caractérisés par une composition ionique reflétant celle de l'eau de mer avec une dominance du NaCl. Leur pH est neutre à légèrement alcalin (pH 7-8). Ils peuvent être d'origine anthropique, comme les marais salants, ou bien d'origine naturelle, comme les sebkhas ou les lagons (Ventosa et Arahal, 2009 ; Oren, 2012 ; Enache *et al.*, 2017).

### 3.1.1.1. Environnement thalassohalins d'origine anthropique : marais salants

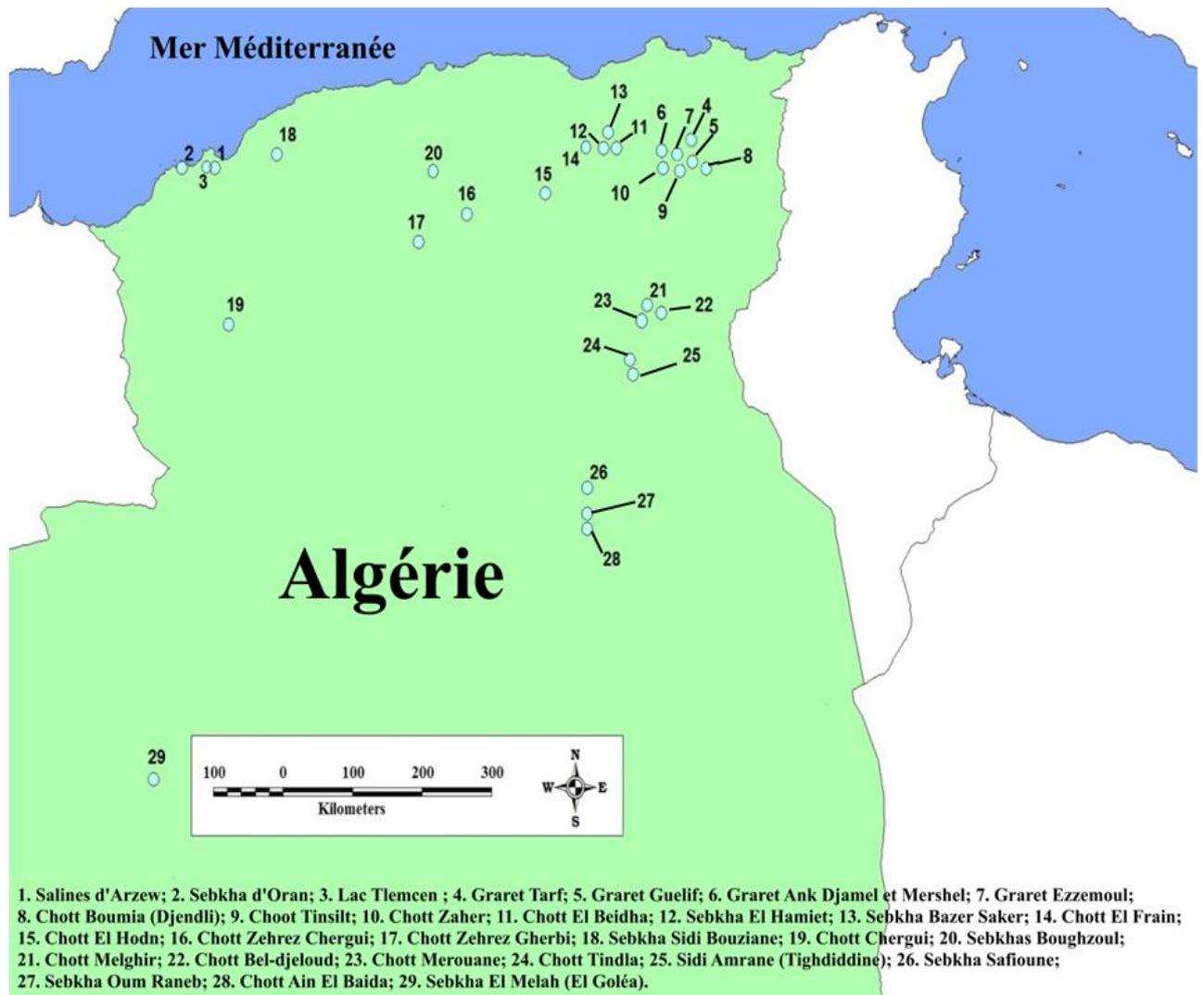
Les marais salants appelés également salines ou salins sont des milieux artificiels construits par l'homme pour la production du sel marin. Ils sont constitués d'une série de bassins d'évaporation peu profonds, reliés par des tuyaux et des canaux, et alimentés directement par l'eau de mer. Les bassins les plus proches de la mer ont une salinité similaire à celle de l'eau de mer. Plus on s'éloigne, plus la salinité augmente sous l'effet de l'évaporation de l'eau par le soleil, ce qui crée un degré croissant de salinité à travers les différents bassins d'évaporation jusqu'à atteindre le dernier bassin de cristallisation où le NaCl précipite (Ventosa *et al.*, 2015 ; DasSarma et DasSarma, 2017 ; Oren, 2019). Des exemples de tels environnements sont représentés par la saline de Santa Pola en Espagne, la saline de San Francisco aux États-Unis d'Amérique, la saline de Sfax en Tunisie, les salines de Samouco au Portugal (Gunde-cimerman et Zalar, 2014).

### 3.1.1.2. Environnements thalassohalins d'origine naturelle : lacs salés, sebkhas et chotts

Les lacs salés se forment généralement dans les zones arides à semi-arides, où l'évaporation potentielle est supérieure à la pluviosité. Le Grand Lac Salé Utah aux États-Unis d'Amérique est l'un des environnements hypersalins les plus étudiés. Ce lac n'a aucune communication avec la mer, mais sa composition ionique similaire à celle de l'eau de mer a permis de le classer comme thalassohalin (Merabet, 2011 ; Oren, 2011a).

En Afrique du Nord, ces lacs salés sont synonymes des chotts et des sebkhas. Une sebkha est définie comme une cuvette à inondation temporaire, sans végétation, dans laquelle se produit une accumulation de sel. Quant au terme chott, il représente la zone salée entourant la sebkha (Demnati, 2013). Ces lacs sont retrouvés dans les zones arides et semi-arides des pays du Maghreb ou le long des côtes du golfe Persique des Émirats arabes unis.

L'Algérie regroupe un nombre important de chotts et de sebkhas dont 19 sont classés sur la liste Ramsar des zones humides d'importance internationale, couvrant une superficie de 2 055 522 ha, représentant 70 % de la superficie totale des sites Ramsar algériens (Demnati *et al.*, 2017). Leur répartition géographique est très étendue. Ils s'étalent du Sud tunisien jusqu'au mont de l'Atlas au Nord algérien (Samraoui et Samraoui, 2013 ; Demnati, 2013) (Figure 2).



**Figure 2.** Situation géographique des chotts et des sebkhas en Algérie (Demnati *et al.*, 2017).

### 3.1.2. Environnements athalassohalins

Les environnements athalassohalins ont une composition ionique différente de celle de l'eau de mer. Ils sont d'origine continentale et sont générés par la dissolution, après action des eaux de pluie ou des eaux de ruissellement, des sels contenus dans les roches ou des couches géologiques traversées (Cayol *et al.*, 2011 ; Ghosh *et al.*, 2019). L'exemple typique de ces environnements est la mer Morte, caractérisée par des concentrations élevées en cations divalents ( $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$ ) et un pH légèrement acide (pH 5,5-6) (Oren, 2011a). Il existe également des environnements athalassohalins alcalins tels que le lac Mono aux États-Unis d'Amérique, le lac Magadi au Kenya, et le lac Wadi Natrun en Égypte. Ces lacs sont caractérisés par l'absence des cations divalents, mais contiennent de fortes concentrations en ions carbonates ( $CO_3^{2-}$ ) et hydrogénocarbonates ( $HCO_3^-$ ), responsables de l'alcalinité, en plus du chlorure ( $Cl^-$ ) et des sulfates ( $SO_4^{2-}$ ) (Oren, 2010a ; Edbeib *et al.*, 2016).

### 3.2. Sols salins

Les sols salins, aussi appelés halomorphes ou sodiques sont caractérisés par une concentration en sel supérieure à 0,2 % (p/v). Ils sont relativement pauvres en sodium et contiennent, principalement des chlorures ( $\text{Cl}^-$ ), des sulfates de sodium ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), des sulfates de calcium ( $\text{CaSO}_4$ ) et des sulfates de magnésium ( $\text{MgSO}_4$ ). Ces sols se caractérisent par un pH inférieur à 8,5, et ils se manifestent naturellement sous les climats arides où l'évaporation dépasse les précipitations pluviales (Bouteyre et Loyers, 1992 ; Escudier *et al.*, 2019).

La formation d'un sol salin résulte généralement de l'accumulation des sels dans les horizons de surface. Ces sels peuvent être issus de l'altération des roches contenant des minéraux sodiques, potassiques et magnésiques, de la dissolution des évaporites contenant les ions chlorures ou des activités humaines : l'utilisation des eaux d'irrigation riches en sel, la production de sel, etc. (Berrada, 2012; Essington, 2015). Les sols salins couvrent une surface importante du globe terrestre, leur proportion est notablement élevée en Afrique du Nord (Égypte, Tunisie), au Moyen-Orient (Iran, Pakistan, Bangladesh), en Asie centrale (Ouzbékistan), au Nord de la Chine et en Argentine (Marlet et Job, 2006).

En Algérie, les sols salins occupent de vastes superficies d'environ 3,2 millions d'hectares dont une bonne partie est localisée dans les régions steppiques (Benzellat, 2012). Selon l'Institut National des Sols, de l'Irrigation et Drainage (INSID), les sols salins sont répandus dans les basses plaines de l'Oranie, dans la vallée de la Mina près de Relizane, sur les hautes plaines sud de Sétif et de Constantine et aux bords de certains chotts comme le chott Melghir. Ils ont aussi une grande extension dans les régions sahariennes au sud de Biskra jusqu'à Touggourt, Ouargla et au-delà (INSID, 2008).

### 4. Diversité phylogénétique des halophiles et des halotolérants

Les organismes halophiles et halotolérants présentent une grande diversité phylogénétique, ils sont rencontrés dans les trois domaines du vivant : *Archaea*, *Bacteria* et *Eucarya* (Oren, 2008) (Figure 3).

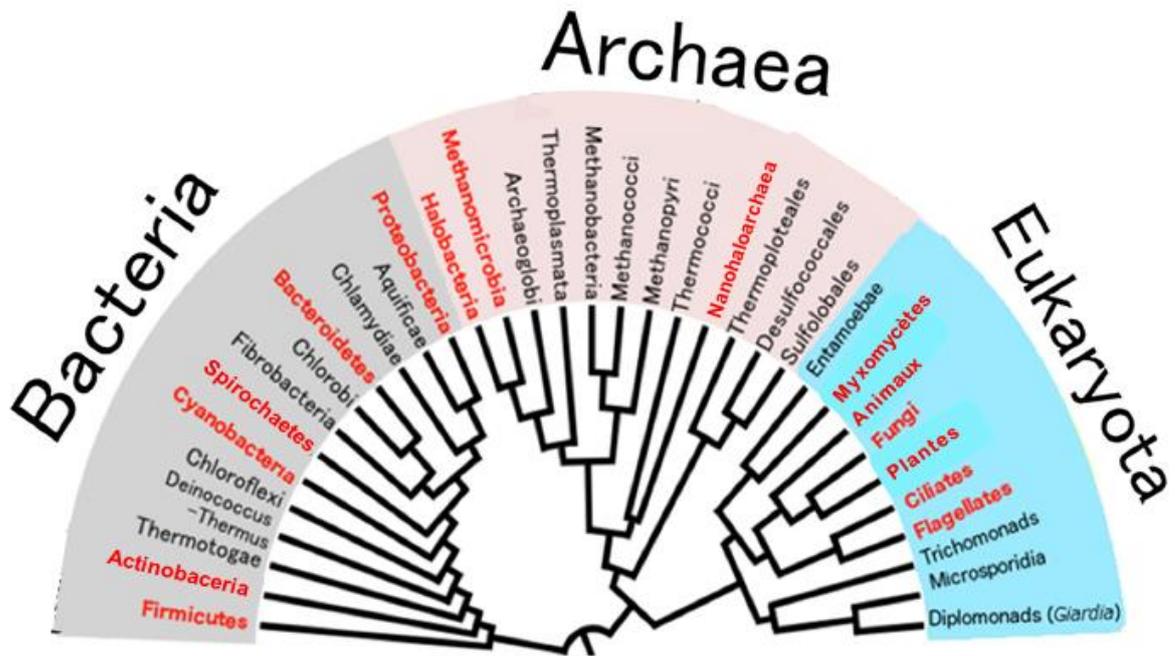
Au sein des *Archaea*, les halophiles se trouvent dans le phylum des *Euryarchaeota* et la classe des *Halobacteria*. Cette classe contient les halophiles les plus extrêmes qui constituent les principaux composants de la masse microbienne des lacs hypersalés. Également, la branche méthanogène des *Euryarchaeota* contient des halophiles dont l'activité méthanogène est possible même à des seuils proches de la saturation en NaCl (5,2 M). Ils sont représentés par trois genres : *Methanohalobium*, *Methanohalophilus* et *Methanosalsum*, placés dans la famille des *Methanosarcinaceae* (Oren, 2002b ; Ventosa *et al.*, 2012 ; Edbeib *et al.*, 2016).

Grâce au développement des techniques de métagénomique, des archées halophiles extrêmes phylogénétiquement distants de la classe des *Halobacteria* ont été découvertes dans le lac hypersalé Tyrrell en Australie (Narasingarao *et al.*, 2012). Ces organismes ont été regroupés dans une nouvelle classe, les *Nanohaloarchaea*, initialement proposée au sein du phylum des *Euryarchaeota* (Oren, 2012). En effet, une étude phylogénétique récente a révélé que la classe des *Nanohaloarchaea* avait été incorrectement placée dans le phylum des *Euryarchaeota* et a été déplacée dans le phylum des *Nanohaloarchaeota* (Aouad *et al.*, 2018) au sein du super-embranchement DPANN proposé par Rinke *et al.* (2013) et regroupant les embranchements *Diapherotrites*, *Parvarchaeota*, *Aenigmarchaeota*, *Nanoarchaeota* et *Nanohaloarchaeota*. Ainsi, c'est la première fois que des représentants halophiles sont identifiés comme appartenant à un phylum autre que celui des *Euryarchaeota*.

Le domaine *Bacteria* regroupe la plus grande diversité des halophiles. Il comprend, principalement des espèces halophiles modérées et halotolérantes réparties sur un grand nombre de groupes phylogénétiques. Ces espèces sont incluses dans 8 phyla : *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes*, *Cyanobacteria*, *Bacteroidetes*, *Tenericutes* et *Thermotogae*. La majorité est à Gram négatif appartenant à la famille des *Halomonadaceae* (phylum *Proteobacteria*). Cependant, certaines bactéries sont à Gram positif et appartiennent à la famille des *Bacillaceae* du phylum des *Firmicutes* (Ventosa *et al.*, 2012 ; Edbeib *et al.*, 2016 ; DasSarma et DasSarma, 2017).

Concernant les bactéries halophiles extrêmes, l'exemple le plus connu est *Salinibacter ruber*. Cette bactérie, en forme de bâtonnet et de couleur rouge-orangée, appartient au phylum des *Bacteroidetes*. Elle requiert une concentration en sels aussi élevée que celle des haloarchaea et partage beaucoup d'autres caractéristiques avec ses homologues archéens colonisant les mêmes habitats (Oren, 2013b).

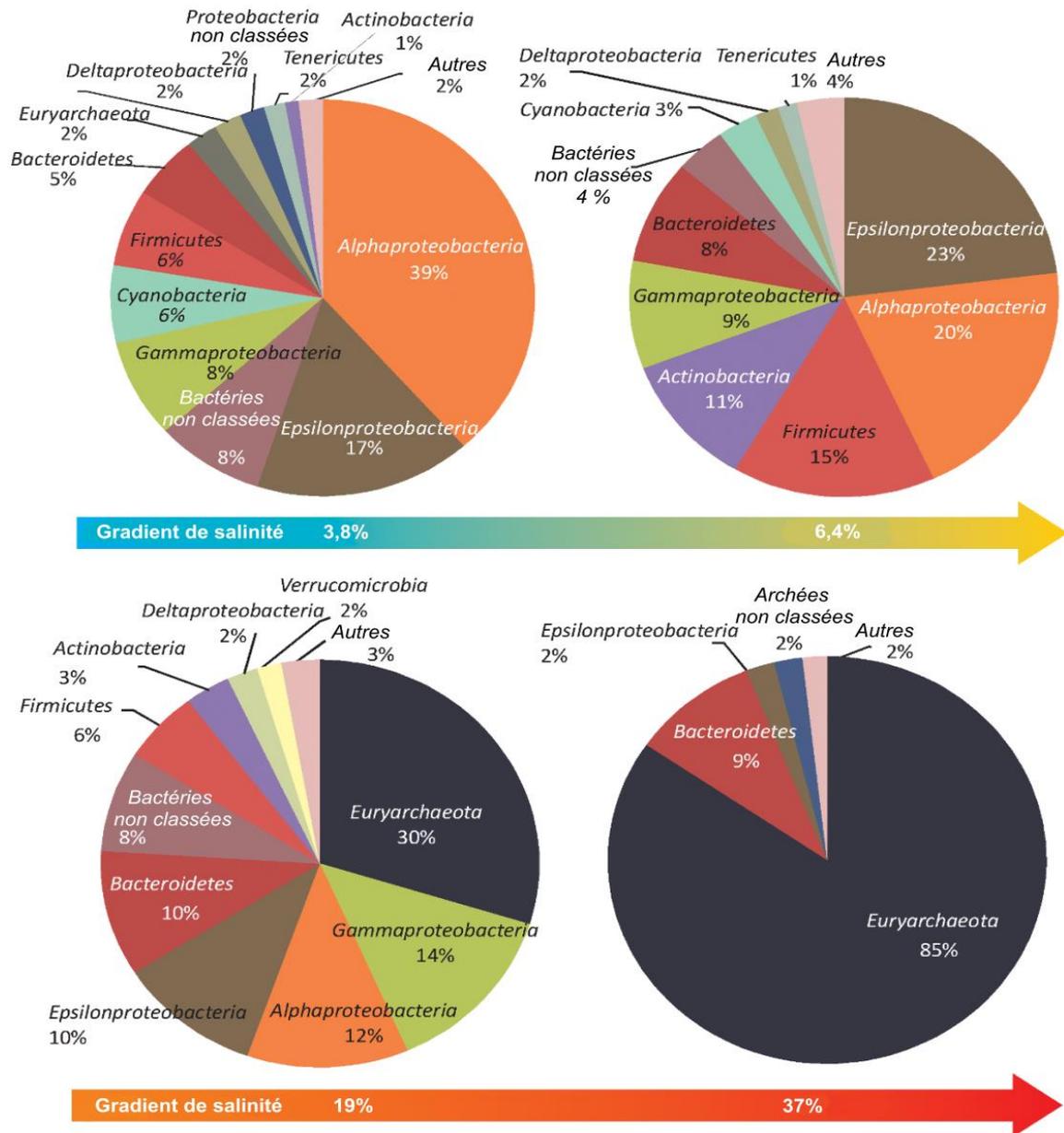
Le phylum *Proteobacteria* contient également des espèces halophiles extrêmes appartenant aux genres *Salicola*, *Halovibrio* et *Halospina* (Kharroub *et al.*, 2006 ; Sokorin *et al.*, 2006).



**Figure 3.** Distribution des halophiles dans les trois domaines du vivant. Les groupes phylogénétiques écrits en rouge contiennent au moins un représentant halophile (Edbeib *et al.*, 2016 ; Aouad *et al.*, 2018).

Dans le domaine *Eukarya*, les halophiles sont rares. Les plus étudiés et les plus connus sont les algues appartenant au genre *Dunaliella*, dont quelques espèces sont halophiles extrêmes (*Dunaliella salina*, *Dunaliella bardawil*), ayant la capacité de synthétiser de grandes quantités de  $\beta$ -carotène. On retrouve également des ciliés (*Schmidingerothrix salinarum*), des flagellés (*Ancyromonas melba*), des moisissures (*Hortaea werneckii*) et des levures (*Debaryomyces hansenii*), ainsi que le crustacé *Artemia salina* retrouvé dans des concentrations en sel dépassant 20 % (p/v) (Cho, 2005 ; Oren, 2011b ; DasSarma et DasSarma, 2017). Des plantes sont aussi présentes dans les environnements hypersalins comme *Atriplex halimus* et *Mesembryanthemum crystallinum*, qui peuvent survivre dans des sols à une concentration en sels modérée (Manousaki et Kalogerakis, 2011).

Bien qu'ils n'appartiennent à aucun des trois règnes du vivant, les virus halophiles ou bien halovirus constituent une composante importante des environnements hypersalins où ils sont 10 fois plus nombreux que les cellules procaryotes. Ils sont considérés comme les seuls prédateurs dans ces environnements, et, de ce fait, jouent un rôle important dans le contrôle de la population des microorganismes halophiles (Atanasova *et al.*, 2012 ; Dyall-Smith *et al.*, 2019).



**Figure 4.** Distribution des microorganismes halophiles en fonction de la salinité.

Le pourcentage des communautés procaryotes résulte d'études métagénomiques réalisées dans 4 environnements de salinités différentes : la mer méditerranée (3,8 % (p/v)), le lagon Punta Cormoran (6,4 % (p/v)), et deux bassins de la saline Bras del Port, de salinité 19 % et 37 % (p/v) (Ghai *et al.*, 2011).

À ce jour, plus de 100 virus halophiles ont été décrits dont la majorité infecte les archées halophiles extrêmes (Mizuno *et al.*, 2019). Sur la base de leur morphologie, les virus halophiles sont classés en six familles : *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae*, *Pleolipoviridae*, *Sphaerolipoviridae* et *Fuselloviridae* (Luk *et al.*, 2014).

## 5. Distribution des halophiles en fonction de la salinité

Plusieurs études portant sur la diversité des halophiles au sein des environnements hypersalins ont montré, par approches moléculaires non culturales, que la distribution des microorganismes dépend fortement de la salinité et que l'augmentation de la salinité s'accompagne d'une réduction de la diversité des communautés microbiennes (Antón *et al.*, 1999 ; Benlloch *et al.*, 2002 ; Casamayor *et al.*, 2002 ; Ghai *et al.*, 2011 ; Boujelben *et al.*, 2012 ; Ventosa *et al.*, 2014) . D'après les travaux de Ghai *et al.* (2011), une large diversité des taxons bactériens est retrouvée à des concentrations en sels allant de 3,8 à 6,4 % (p/v), alors qu'un seul taxon est largement dominant lorsque la concentration saline atteint 37 % (p/v). Il s'agit du phylum des *Euryarchaeota*, comprenant la majorité des archées halophiles, et qui est d'ailleurs dominante dès que la salinité atteint 19 % (p/v). Au-delà de 24 % (p/v) de salinité, un petit nombre de bactéries subsistent, celles du phylum des *Bacteroidetes*, représentée par les espèces du genre *Salinibacter* (Figure 4).

## 6. *Archaea* halophiles de la classe *Halobacteria*

### 6.1. Généralités

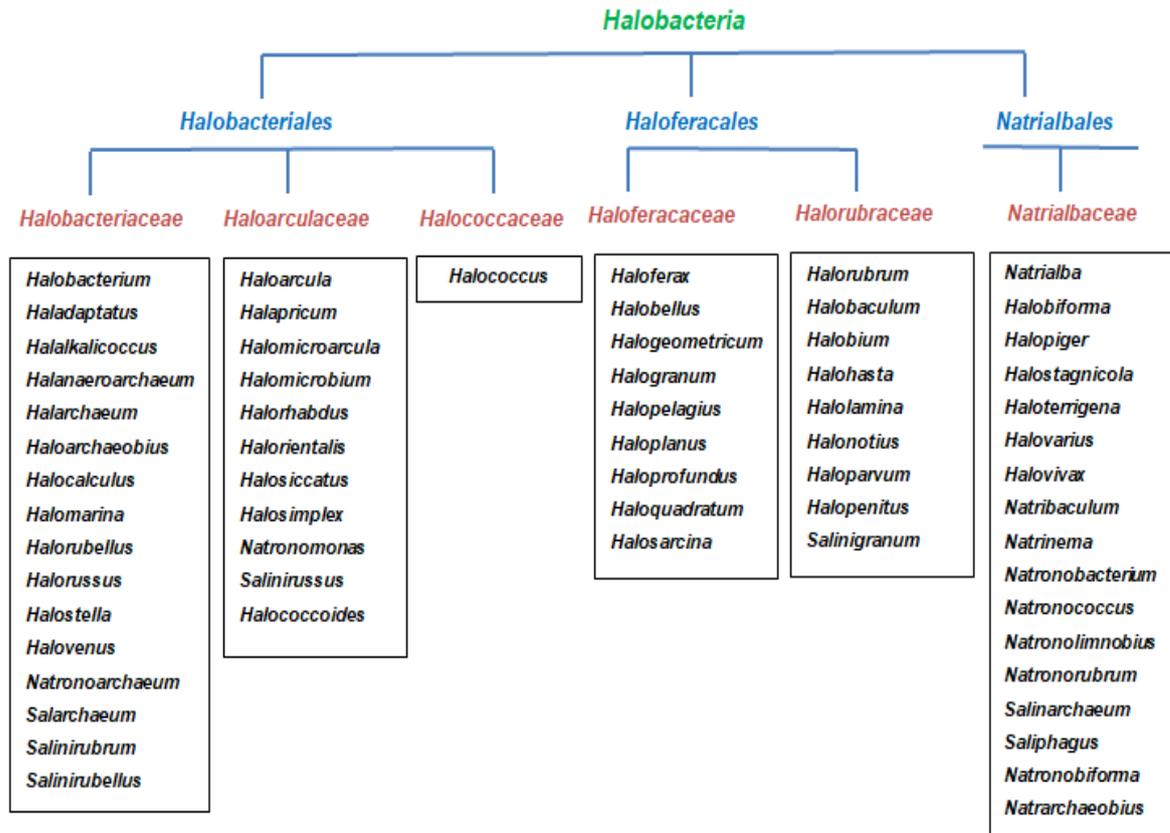
Les *Archaea* halophiles extrêmes ou haloarchaea de la classe *Halobacteria* forment un groupe diversifié de microorganismes aérobies, hétérotrophes ou phototrophes qui habitent les environnements à forte concentration en sels tels que les lacs hypersalés (mer Morte, Grand Lac Salé Utah aux États-Unis d'Amérique, lac Magadi au Kenya), les marais salants, les sols salins, les sebkhas, les chotts, les cristaux de sel et aussi les produits de salaison (Kharroub *et al.*, 2014 ; Stan-Lotter et Fendrihan, 2015 ; DasSarma *et al.*, 2019). Elles requièrent au moins 9 % (p/v) de NaCl (1,5 M) pour leur croissance. La plupart des haloarchaea montrent une croissance optimale à 20 ou 25 % (p/v) de NaCl (3,4-4,3 M) et subissent des dommages irréversibles, voire une lyse cellulaire si la concentration saline est inférieure à 6 % (p/v) (1M). Cependant, quelques souches sont moins exigeantes, se développant à des concentrations en NaCl inférieures à 1 M (Ventosa, 2006 ; Andrei *et al.*, 2012). En plus de leurs exigences en NaCl, certaines espèces requièrent aussi des concentrations élevées en ion  $Mg^{2+}$  (20 à 50 mM), telle que *Halorubrum sodomense*, ou en cations divalents  $Ca^{2+}$ , cas de *Haloferax volcanii* (Abrevaya, 2012).

Les haloarchaea sont en général neutrophiles, mais quelques genres sont alcalophiles représentés par *Natronobacterium* et *Natronococcus*, qui peuvent croître à pH 10-11 (Enache *et al.*, 2017). Toutefois, très peu d'espèces ont été rapportées comme étant acidophiles, cas de *Halarchaeum acidiphilum*, isolée d'un sel australien (Minegishi *et al.*, 2010). La température optimale de croissance pour la plupart des espèces est comprise entre 35°C et 50°C (Amoozegar *et al.*, 2017 ; Oren *et al.*, 2017). Certaines peuvent cependant croître à de plus hautes températures comme *Natronolimnobius aegyptiacus* et *Haloferax mediterranei* qui ont un optimum à 55°C et 51°C, respectivement (Bowers et Wiegel, 2011). D'autres se développent à des températures plus basses, c'est notamment le cas de *Halorubrum lacusprofundi* trouvée dans un lac salé en Antarctique qui peut survivre à des températures aussi basses que 4°C avec un optimum à 31-37°C (Franzmann *et al.*, 1988).

## 6.2. Taxonomie

Jusqu'en 2014, la classe *Halobacteria* comprenait un seul ordre, celui des *Halobacteriales* et une seule famille des *Halobacteriaceae* (Oren, 2014a). La découverte de nombreux nouveaux genres et espèces d'haloarchaea et l'augmentation de la quantité des données issues du séquençage de génomes complets ont permis d'affiner cette classification. En effet, l'analyse de 120 génomes de 30 genres d'haloarchaea et l'identification de signatures moléculaires telles que les 234 signatures de protéines conservées et les 40 signatures d'indels (insertions-délétions) conservées ont permis de définir 2 nouveaux ordres dans la classe des *Halobacteria* (Gupta *et al.*, 2015 ; 2016). Ainsi, selon cette nouvelle classification, la classe *Halobacteria* comprend trois ordres et six familles : les *Halobacteriales* contenant trois familles (*Halobacteriaceae*, *Halococcaceae* et *Haloarculaceae*), les *Haloferacales* comportant deux familles (*Halorubraceae* et *Haloferacaceae*) et enfin les *Natrialbales* qui contiennent une seule famille (*Natrialbaceae*) (Amoozegar *et al.*, 2017 ; Oren *et al.*, 2017 ; DasSarma *et al.*, 2019).

En juin 2019, les *Halobacteria* comptaient 63 genres clairement définis et validés par le comité international de systématique des Procaryotes (ICSP) et le sous-comité de la taxonomie des *Halobacteria* (Figure 5) (Oren et Ventosa, 2019).



**Figure 5.** Classification phylogénétique des haloarchaea (Oren et Ventosa, 2019).

### 6.3. Structures cellulaires

#### 6.3.1. Morphologie

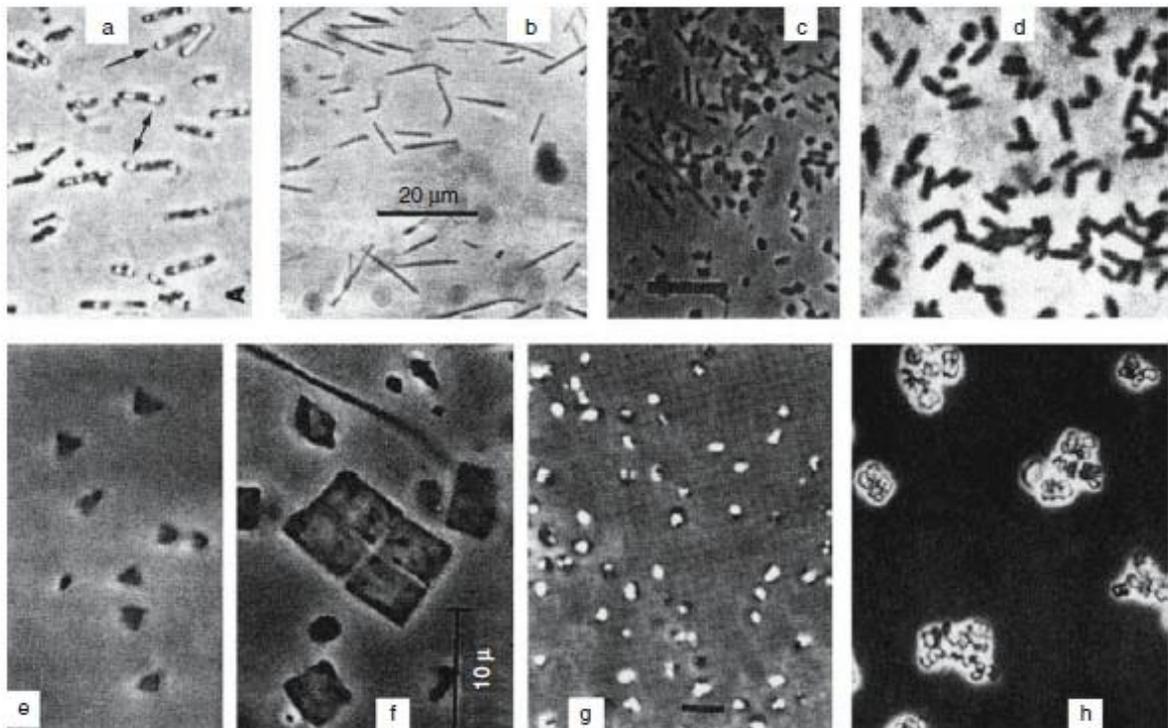
Les cellules des *Archaea* halophiles extrêmes se caractérisent par une grande diversité morphologique. On distingue des haloarchaea sous forme de bâtonnets (*Halobacterium*), de cocci (*Halococcus*), de disques (*Halarchaeum acidiphilum*) ou encore de carrées (*Haloquadratum walsbyi*), de triangles (*Haloarcula japonica*), et même pléomorphiques (*Haloferax*), en particulier quand les conditions de croissance sont défavorables (Figure 6). Elles sont à Gram négatif et leur taille varie entre 1 et 15  $\mu\text{m}$  (Oren, 2006 ; Abrevaya, 2012 ; Amoozegar *et al.*, 2017).

Beaucoup d'haloarchaea sont motiles grâce à des flagelles formés de plusieurs flagellines de nature glycoprotéique sulfatée. Ils sont plus résistants que ceux des bactéries face aux agents dissociant tels que les protéases et les températures élevées. Cependant, ils se dissolvent en solutions de faible salinité (Oren, 2006 ; Syutkin *et al.*, 2014). Quelques espèces produisent également des vésicules à gaz. Ce sont des structures creuses rigides entourées par une membrane protéique, et comblées par la diffusion des gaz dissous dans l'environnement. Leur

fonction est de permettre aux cellules de flotter sur la surface des saumures, en réponse à un besoin d'oxygène ou de lumière (Fendrihan *et al.*, 2006 ; Oren, 2006).

À l'exception de quelques espèces, tous les membres de la classe *Halobacteria* produisent sur milieu solide des colonies de couleurs rouge, orange ou rose. Cette pigmentation est due à la présence de pigments membranaires de type caroténoïde C<sub>50</sub> (bactériorubérine et ses dérivés), qui servent de protection contre les dommages photo-oxydatifs et de renforts structurels pour les membranes plasmiques. La production de ces pigments dépend du statut nutritionnel de la cellule et de la salinité du milieu (Fendrihan *et al.*, 2006 ; Calegari-Santos *et al.*, 2016 ; Amoozgar *et al.*, 2017 ; Oren *et al.*, 2017).

En plus de ces caroténoïdes, certains membres des genres *Halobacterium*, *Haloarcula* et *Halorubrum* produisent des pigments rétinieniens qui captent l'énergie lumineuse (500–700 nm) et la convertissent en énergie chimique qui sera utilisée pour le transport actif des ions à travers la membrane plasmique (Oren *et al.*, 2017).



**Figure 6.** Aspects microscopiques des haloarchaea. a : *Halobacterium salinarum*, b : *Natronobacterium gregoryi*, c : *Halorubrum lacusprofundi*, d : *Natronomonas pharaonis*, e : *Haloarcula japonica*, f : *Haloquadratum walsbyi*, g : *Halogeometricum borinquense*, h *Natronococcus occultus* (Oren, 2006).

### 6.3.2. Paroi cellulaire

La paroi cellulaire des haloarchaea est dépourvue de peptidoglycane mais présente à la place une variété de composés chimiques tels que des polysaccharides, des protéines et des glycoprotéines. L'absence du peptidoglycane confère à ces microorganismes un caractère de résistance aux antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi tels que les  $\beta$ -lactamines (Kandler et König, 1998 ; Oren, 2006).

Chez la plupart des haloarchaea, la paroi cellulaire est constituée de nombreuses sous-unités hexagonales de glycoprotéines, organisées en une unique couche appelée couche S (*S-layer*), qui sert à la protection des cellules contre le stress osmotique et les perturbations du pH. Cependant elle est très sensible aux détergents tel que le sodium dodécylsulfate (SDS) et à l'urée. Les glycoprotéines contiennent des teneurs élevées en acides aminés acides chargés négativement qui interagissent facilement avec les ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$ , ce qui permet de capturer les molécules d'eau, favorisant ainsi l'hydratation de la paroi et l'augmentation de la solubilité des nutriments (Klingl, 2014 ; Oren, 2014b). Ce type de paroi nécessite des concentrations élevées en NaCl pour maintenir sa stabilité. En effet, les groupes carboxyles chargés négativement des glycoprotéines sont liés aux ions  $\text{Na}^+$ , ce qui aide au maintien de l'intégrité pariétale. Lorsque la concentration en ces ions diminue, les régions chargées négativement de la paroi ont tendance à se repousser ce qui provoque la lyse cellulaire (Abrevaya, 2012 ; Calegari-Santos *et al.*, 2016).

Cependant, certains membres possèdent une paroi cellulaire composée de plusieurs polymères, qui contrairement au premier type ne requière pas des salinités élevées pour maintenir sa stabilité. C'est le cas des espèces du genre *Halococcus* qui possèdent une enveloppe rigide composée d'hétéropolysaccharides hautement sulfatés, dont les principaux composants sont le mannose, le glucose le galactose ainsi que la N-acétylglucosamine. L'espèce *Natronococcus occultus* est un autre exemple dont la paroi se compose d'un polymère constitué d'une chaîne de poly(L)-glutamine liée de façon covalente à deux oligosaccharides (Abrevaya, 2012 ; Oren, 2014b ; Gupta *et al.*, 2015).

### 6.3.3. Lipides et membrane cytoplasmique

Le caractère le plus distinctif des membranes des *Archaea* halophiles est la nature de leurs lipides. Ces lipides sont constitués par une bicouche d'éthers d'isoprényl-L-glycérol qui forment une matrice dans laquelle les différentes protéines sont incrustées. Ils présentent des chaînes d'acides gras ramifiés liées au glycérol par des liaisons éther, ces dernières sont plus

stable à la température et à l'oxydation par rapport aux liaisons ester présentes chez les bactéries (Kates, 1996).

Les lipides membranaires sont constitués par 10 % de lipides neutres incluant des isoprénoïdes C<sub>20</sub> et C<sub>30</sub>, des éthers de glycérol, des quinones et des caroténoïdes. Le reste est constitué par des lipides polaires qui comprennent des phospholipides, des sulfolipides et des glycolipides. Le phosphatidylglycérol phosphate méthyl ester (PGP-Me) représente 50 à 80 % des lipides polaires membranaires, il joue un rôle important dans la stabilité de la membrane à des salinités élevées, grâce à sa nature très acide (Tenchov *et al.*, 2006 ; Oren, 2014). Le type et la composition des lipides polaires, en particulier celle des glycolipides (triglycosyl sulfaté : S-TGD-1 ; triglycosyl archeol galactosyl-mannosyl-glucosyl : TGD-1 ; tétraglycosyl sulfaté :S-TeGD ; etc.) ont été utilisés comme critères chimiotaxonomiques de différenciation des genres d'*Halobacteria* (Oren, 2006).

#### 6.4. Métabolisme

Les haloarchaea sont typiquement des organismes aérobies, hétérotrophes qui dégradent les sources de carbone via le cycle de Krebs, le cas échéant en combinaison avec le cycle du glyoxylate et la chaîne respiratoire (Oren, 2006). Elles utilisent une grande variété de substrats dont les principaux sont les acides aminés, les glucides ou encore les extraits de levures. Quelques-unes sont même capables de dégrader des composés aromatiques et des hydrocarbures. C'est le cas des espèces des genres *Haloferax* et *Haloarcula* (Oren, 2014b ; DasSarma et DasSarma, 2017 ; DasSarma *et al.*, 2019).

L'emploi des glucides est souvent associé à la production d'acides, comme l'oxydation de ces substrats est incomplète. Par exemple, l'espèce *Halorubrum saccharovorum* produit du pyruvate, de l'acétate et du lactate lorsqu'elle est cultivée sur des hexoses (Oren, 2006).

Des études sur les voies de dégradation des glucides chez *Halococcus saccharolyticus* ont montré que le fructose est dégradé par une modification de la voie d'Embden-Meyerhof (EM) tandis que la dégradation du glucose est réalisée via la voie modifiée d'Entner-Doudoroff (ED). Dans cette voie, le glucose 6-phosphate présent dans la voie conventionnelle est absent et le premier intermédiaire phosphorylé est le 2-céto-3-désoxygluconate-6-phosphate, qui est ensuite clivé en pyruvate et en 3-phosphoglyceraldéhyde (Oren, 2004 ; Falb *et al.*, 2008 ; Andrei *et al.*, 2012).

Les *Archaea* halophiles extrêmes peuvent aussi dégrader le glycérol présent en grandes quantités dans les lacs hypersalés où il est produit et utilisé comme soluté compatible par

l'algue verte *Dunaliella*. La présence d'une glycérol kinase constitutive a été démontrée chez la plupart des espèces étudiées (Falb *et al.*, 2008).

En absence d'oxygène, les haloarchaea sont capables d'un mode de vie alternée. Certaines produisent des vésicules à gaz qui leur permettent d'atteindre des surfaces plus oxygénées, tandis que d'autres ont la capacité de se développer en anaérobiose (Oren, 2006). Ainsi, de nombreuses espèces peuvent faire de la respiration anaérobie en utilisant le nitrate, le diméthylsulfoxyde, le triméthylamine N-oxyde ou le fumarate comme accepteur final d'électrons. À titre d'exemple, les espèces *Haloferax mediterranei* et *Haloferax denitrificans* sont capables de croître en utilisant la dénitrification ou la voie de respiration anaérobie des nitrates. Des espèces du genre *Halobacterium* peuvent utiliser l'arginine en anaérobiose et en obscurité comme source de carbone, d'azote et d'énergie (Torregrosa-Crespo *et al.*, 2016 ; Oren *et al.*, 2017). Un seul membre des *Halobacteria* est décrit comme anaérobie à microaérophile, il s'agit de *Halorhabdus tiamatea* isolée de l'interface eau-sédiments de la mer Rouge (Antunes *et al.*, 2008).

Un autre mode entièrement différent de croissance anaérobie est pratiqué par certains membres des genres *Halobacterium*, *Haloarcula* et l'espèce *Halorubrum sodomense*. Il s'agit de la photohétérotrophie, qui consiste en l'utilisation de la lumière comme source d'énergie, grâce à la bactériorhodopsine. Celle-ci est composée d'une fraction protéique : la bactériopsine et d'un chromophore particulier : le rétinol. Elle absorbe la lumière à 570 nm et se comporte comme une pompe à protons générant une différence de pH entre le cytoplasme et le milieu extracellulaire, ce gradient de protons permettant à son tour de produire de l'ATP (Betlach *et al.*, 1986 ; Oren, 2002b).

En plus de la bactériorhodopsine, les haloarchaea possèdent trois autres photosystèmes basés sur le rétinol. Il s'agit de l'halorhodopsine jouant le rôle d'une pompe à chlorures dont l'absorption a lieu à 578 nm et les rhodopsines sensorielles I et II qui absorbent à 587 et 487 nm, respectivement. Ces dernières sont impliquées dans le phototactisme, elles permettent de localiser les longueurs d'onde optimales pour le fonctionnement de la bactériorhodopsine et de l'halorhodopsine (Lanyi et Balashov, 2011 ; Cai *et al.*, 2012).

## 6. 5. Génétique

À l'instar des bactéries, les *Archaea* halophiles extrêmes possèdent un génome constitué d'un seul chromosome circulaire de 2 à 4 Mpb, à la différence qu'il est associé à des protéines homologues aux histones eucaryotes. Beaucoup d'espèces contiennent, en plus de ce chromosome principal, des gènes supplémentaires dans de gros plasmides (mégaplasmides).

Une dizaine de ces mégaplasmides ont été séquencés et certains d'entre eux ont été nommés minichromosomes à cause de la présence de gènes importants ou essentiels à la vie de l'organisme. Ils représentent 25 à 30 % de l'ADN total. À titre d'exemple, la souche *Halobacterium* sp. NRC-1 contient deux mégaplasmides : pNRC100 et pNRC200 de 191 et 365 kpb, respectivement, codants des vésicules de gaz ainsi que d'autres protéines à fonction vitale (DasSarma *et al.*, 2009 ; Oren, 2014b).

Le génome des haloarchaea est composé de deux parties, une fraction riche en GC (67 à 68%) correspondant au chromosome principal, et une deuxième fraction moins riche en GC (58 à 59%) correspondant aux mégaplasmides (Oren, 2014b).

Les *Archaea* halophiles extrêmes ont des ribosomes 70S, de taille et de composition similaires à celles des bactéries. Ces ribosomes contiennent trois molécules d'acide ribonucléique (ARN) : ARNr 16S, 23S et 5S et 50 à 70 protéines selon les espèces. Cependant, les structures primaires de l'ARNr et des protéines ribosomales sont plus proches de celles des eucaryotes. Les ribosomes sont adaptés à fonctionner à des salinités élevées et requièrent chez certaines espèces des concentrations élevées en KCl (3 à 4 M) pour maintenir leur intégrité. Ceci est expliqué par la nature acide des protéines ribosomales des haloarchaea, contrairement à celles des organismes non halophiles qui sont basiques (Eisenberg et Wachtel, 1987 ; Londei, 2001). En général, l'appareil répliatif des *Archaea* est très similaire à celui des eucaryotes, bien davantage qu'à celui des bactéries. L'initiation de la réplication a lieu au niveau d'un site spécifique appelé origine de réplication oriC (pour « *origin of replication complex*»). Cette séquence est située dans une région intergénique, riche en A-T, et entourée par des séquences ORB (*Origin Recognition Boxes*) qui recrutent le complexe protéique d'initiation puis le complexe protéique de réplication, appelé réplisome (Kish et DiRuggiero, 2012). Comme chez les eucaryotes, des origines multiples de réplication ont été observées chez les haloarchaea, leur nombre varie en fonction des genres. Par exemple *Haloferax mediterranei* possède deux origines de réplication alors que *Haloferax volcanii* et *Halobacterium* sp. NRC1 en possèdent trois et quatre, respectivement (Lestini *et al.*, 2015). Les protéines intervenant dans la réplication sont de type eucaryote (PolB), à l'exception de l'ADN polymérase PolD uniquement présente chez les *Archaea* (Kish et DiRuggiero, 2012).

Bien que la transcription soit similaire entre les archées et les eucaryotes, les ARNm des archées ont des propriétés comparables à celles des bactéries. Les transcrits primaires sont triphosphorylés, sans introns ni de queue poly(A) et sont souvent polycistroniques codants pour plusieurs chaînes polypeptidiques. Quant aux ARN polymérases, elles sont similaires à celles des eucaryotes, formées d'au moins 10 sous-unités, ce qui en fait une machinerie plus

complexe que celle des bactéries qui est formée de 5 sous-unités (Bell et Jackson, 2001 ; Clouet-d'Orval *et al.*, 2015).

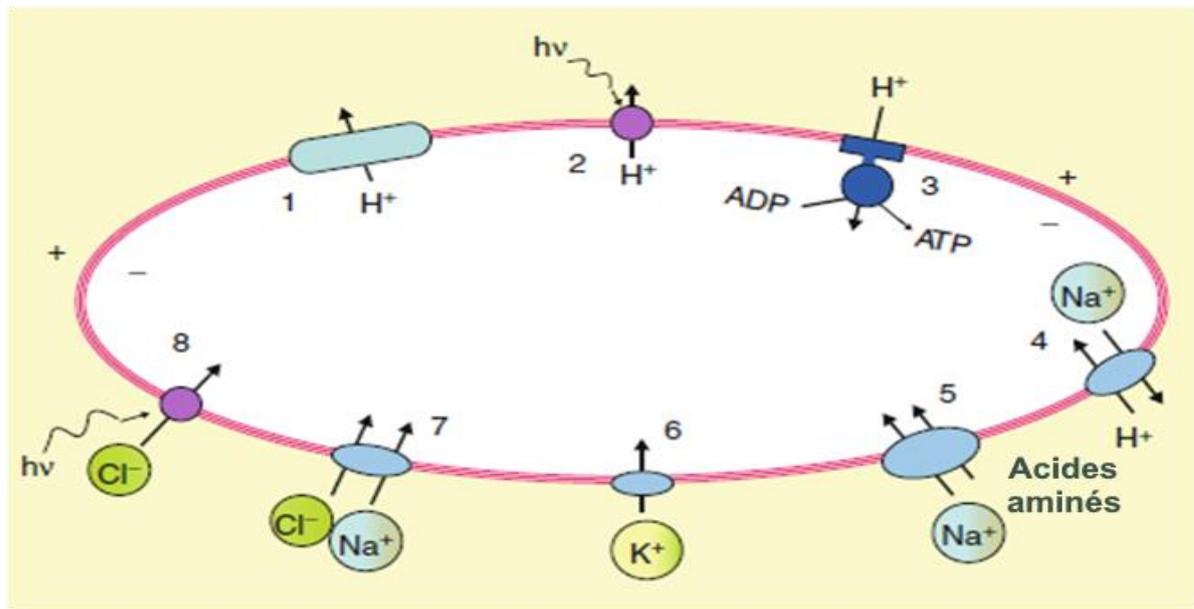
À l'opposé des bactéries et des eucaryotes, les ARNt des halobactéries sont dépourvus de thymine et contiennent une pseudouridine ou de la 1-méthylpseudouridine. Mais comme chez les eucaryotes, l'ARNt initiateur porte la méthionine au lieu de la N-formylméthionine comme chez les bactéries. Les aminoacyl-tRNA synthétases fonctionnent mieux en présence de KCl. Chez la souche *Halobacterium* sp.NRC1, elles requièrent 3,3 M de KCl pour atteindre une activité maximale (Evilia et Hou, 2006).

### 6.6. Stratégies d'adaptation à la salinité

La survie des halophiles dans des environnements hypersalins nécessite des mécanismes d'adaptation cellulaires et enzymatiques spécialisés qui leur permettent de se développer et de faire face au stress osmotique et ionique. En effet, la différence d'osmolarité entre l'intérieur et l'extérieur d'une cellule génère une pression osmotique sur la membrane plasmique conduisant à une fuite d'eau et à la plasmolyse de la cellule (Oren, 2002a). Afin d'éviter la plasmolyse, les halophiles doivent maintenir un équilibre osmotique entre le cytoplasme et le milieu environnant. Pour ce faire, ils ont développé deux stratégies : la stratégie «*salt-in*», utilisée par les haloarchaea et basée sur l'accumulation du sel dans le cytoplasme, à des concentrations similaires à celles du milieu extérieur. La seconde stratégie est appelée «*low salt-in* », elle est basée sur l'accumulation de solutés organiques compatibles qui agissent comme agents protecteurs contre le stress salin. Cette stratégie est adoptée par les halophiles du domaine *Bacteria* et *Eucarya* (Edbeib *et al.*, 2016 ; DasSarma et DasSarma, 2017 ; Oren, 2019).

La stratégie «*salt-in*» consiste en l'accumulation intracellulaire des ions  $K^+$  et  $Cl^-$  et l'exclusion du  $Na^+$  (Oren, 2013c) (Figure 7). Ce processus implique l'utilisation de pompes membranaires qui permettent les échanges bidirectionnels des ions. La source principale d'énergie pour le transport des ions est un gradient électrochimique de protons formé de part et d'autre de la membrane cytoplasmique. Ce gradient de protons résulte, soit de la chaîne respiratoire au niveau de laquelle le transport d'électrons est accompagné par l'extrusion des protons, soit des ATP synthases fonctionnant comme des pompes à protons transmembranaires. Certaines espèces peuvent générer directement un gradient électrochimique de protons en utilisant la bactériorhodopsine (Oren, 2013c ; Gunde-Cimerman *et al.*, 2018).

Les ions  $\text{Na}^+$  sont exclus du cytoplasme via un antiport  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , localisé au niveau de la membrane cytoplasmique, tandis que les ions  $\text{K}^+$  entrent passivement via un système uniport. Le  $\text{Na}^+$  extracellulaire peut également être utilisé pour permettre l'import des substances organiques telles que les acides aminés (Oren, 2013c). La différence entre l'influx des ions  $\text{K}^+$  et l'afflux des ions  $\text{Na}^+$  doit être compensée par un nombre équivalent d'ions chlorures. Deux systèmes de transport actif de  $\text{Cl}^-$  sont utilisés. Le premier est un symport  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ . Le second est une pompe à chlorures activée par la lumière : l'halorhodopsine (Edbeib *et al.*, 2016 ; Gunde-Cimerman *et al.*, 2018).



**Figure 7.** Différents systèmes de transport des ions chez les haloarchaea selon la stratégie «salt-in». [1] Transporteur, [2] Bactérorhodopsine, [3] ATP synthase, [4] Antiport  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , [5] Co-transporteur acide aminé/ $\text{Na}^+$ , [6] Uniport  $\text{K}^+$ , [7] Symport  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ , [8] Halorhodopsine. ATP: adénosine triphosphate, ADP: adénosine diphosphate, hv : photon (Oren, 2013c).

L'adaptation à la salinité par accumulation de  $\text{KCl}$  nécessite peu d'énergie, mais exige une adaptation particulière de la machinerie enzymatique intracellulaire. En effet, l'importante concentration en sel à l'intérieur de la cellule diminue le volume d'eau libre dans la cellule et favorise les liaisons hydrophobes inter- et intra-protéiques, conduisant à la destruction des structures protéiques. Pour s'adapter, les protéines des halophiles concentrent fortement le sel près de leur surface et utilisent ses capacités hygroscopiques pour capturer les molécules d'eau nécessaires à leur repliement, leur stabilisation et leur solubilité. Ce phénomène est rendu possible par une abondance d'acides aminés acides (glutamate, aspartate), connus pour interagir fortement avec les molécules d'eau et les cations tels que  $\text{K}^+$  (Oren, 2002a ; Gunde-Cimerman *et al.*, 2018).

**Tableau 3.** Critères exigés et recommandés pour l'identification d'un taxon au sein des *Halobacteria* (Oren *et al.*, 1997).

Critères exigés	Critères recommandés
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Morphologie des colonies et des cellules</li> <li>- Mobilité</li> <li>- Pigmentation</li> <li>- Gram</li> <li>- Salinité optimale de croissance</li> <li>- Concentration optimale de MgCl<sub>2</sub> pour la croissance</li> <li>- Gamme de salinités permettant la croissance</li> <li>- Gamme de température et de pH permettant la croissance</li> <li>- Croissance anaérobie en présence d'arginine</li> <li>- Croissance anaérobie en présence des nitrates</li> <li>- Réduction des nitrates en nitrites</li> <li>- Formation du gaz à partir des nitrates</li> <li>- Production d'acides à partir des hydrates de carbone</li> <li>- Capacité de croissance sur différentes sources de carbone</li> <li>- Catalase et oxydase</li> <li>- Formation d'indole</li> <li>- Hydrolyse de : gélatine, amidon, caséine, Tween 80</li> <li>- Sensibilité aux antibiotiques</li> <li>- Caractérisation des lipides polaires membranaires</li> <li>- G+C%</li> <li>- Séquençage de l'ARNr 16S</li> <li>- Hybridation ADN-ADN avec la souche la plus proche (pour la description de nouvelles espèces).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Microscopie électronique</li> <li>- Croissance anaérobie en présence de DMSO ou TMAO</li> <li>- Recherche des enzymes (phosphatase, uréase, β-galactosidase, lysine décarboxylase, ornithine décarboxylase)</li> <li>- Recherche des glycoprotéines dans la membrane cellulaire</li> <li>- Recherche des PHA</li> <li>- Recherche de plasmides</li> <li>- Électrophorèse des protéines cellulaires</li> </ul>

DMSO : diméthylsulfoxyde, TMAO : oxyde de triméthylamine, PHA : polyhydroxyalcanoates.

## 7. Étude de la diversité des haloarchaea

### 7.1. Approche culturelle

L'approche culturelle consiste à isoler les haloarchaea en culture pure puis à les identifier en fonction des critères recommandés pour la description de nouveaux taxons dans la classe des *Halobacteria* (Oren *et al.*, 1997) (Tableau 3).

Cette approche a pour principal avantage l'obtention des souches isolées, permettant ainsi d'étudier leurs capacités métaboliques, de comprendre leurs rôles dans l'environnement naturel, et d'explorer leur potentiel biotechnologique. En outre, les cultures pures permettent la description de nouveaux taxons : familles, genres et espèces (Burns et Dyall-Smith, 2006).

Les techniques culturelles ont été utilisées dans l'étude de la diversité des haloarchaea dans plusieurs environnements hypersalins (Kharroub, 2007 ; Xu *et al.*, 2007; Luque *et al.*, 2012; Quadri *et al.*, 2016 ; Rasooli *et al.*, 2016; Naghoni *et al.*, 2017, Menasria *et al.*, 2018). Néanmoins, elles présentent l'inconvénient d'illustrer de façon restreinte l'abondance des microorganismes dans un échantillon. Il est admis que seule une faible proportion estimée à 0,1-10 % d'espèces microbiennes de l'environnement est cultivable dans les conditions du laboratoire (Oren, 2012 ; Chaudhary *et al.*, 2019).

### 7.2. Approche non-culturelle

Les méthodes non-culturelles permettent d'évaluer l'abondance et d'appréhender la structure génétique et la diversité des communautés microbiennes, directement à partir de l'ADN extrait des échantillons environnementaux (Nocker *et al.*, 2007). Parmi ces méthodes utilisées dans l'étude de la diversité des haloarchaea on distingue :

- les techniques de génotypages ou « d'empreintes génétiques » basées sur le principe de migration électrophorétique de fragments d'ADN (préalablement amplifiés par PCR) sur gels d'agarose ou de polyacrylamide suivant leurs polymorphismes de tailles (T-RFLP : *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*, RISA : *Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*) ou de séquences (DGGE : *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) (Cytryn *et al.*, 2000 ; Casamayor *et al.*, 2002 ; Litchfield et Gillivet, 2002 ; Leuko *et al.*, 2007) ;
- les techniques de clonage/séquençage basées sur l'amplification des séquences d'ADN cibles pour les intégrer ensuite dans des clones à l'aide de vecteurs. Les inserts sont alors séquencés et comparés à des séquences connues (Zafrilla *et al.*, 2010) ;
- la métagénomique basée sur le séquençage de l'ADN directement extrait d'un échantillon, s'affranchissant ainsi des étapes de clonage ou d'amplification. Cette méthode emploie des

technologies de séquençage haut débit (HTS : *High-Throughput Sequencing*) : pyroséquençage 454, illumina, etc. (Narasingarao *et al.*, 2012 ; Gómez-Villegas *et al.*, 2018) ;

- les techniques d'hybridation basées sur le principe de la formation de duplex ARN-ADN ou ADN-ADN, où l'une des molécules est immobilisée dans la cellule et l'autre est utilisée comme sonde moléculaire pour la localiser. Les sondes sont marquées par des enzymes ou des fluorochromes, on parle alors de FISH (*Fluorescent in Situ Hybridization*) (Amann *et al.*, 1997 Antón *et al.*, 1999 ; Rossello-Mora *et al.*, 2003) ;
- d'autres techniques basées sur la détection de certaines structures cellulaires servant de biomarqueurs d'haloarchaea telles que : FAME (*Fatty Acid Methyl Ester*) et MALDI-TOF/MS (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass. Spectrometry*) (Keith-Roach *et al.*, 2002, Lopalco *et al.*, 2011).

**Chapitre 2.**  
**Biotechnologie des**  
***Archaea* halophiles**  
**extrêmes**

## 1. Potentiel biotechnologique des haloarchaea

La grande diversité métabolique des haloarchaea leur confère un potentiel biotechnologique très important. Ces archées offrent en effet de nombreuses applications qui vont de l'utilisation directe de leurs cellules à l'utilisation de leurs biomolécules purifiées (Oren, 2010b ; Singh et Singh, 2017). En outre, l'exigence de fortes concentrations en sel pour le développement de ces microorganismes minimise les risques de contamination, facilitant ainsi leur exploitation à l'échelle industrielle (Yin *et al.*, 2015). En dépit de leur potentiel biotechnologique riche et diversifié, les haloarchaea sont peu exploitées par rapport à d'autres groupes d'extrémophiles. Toutefois, le développement d'applications biotechnologiques pour ces microorganismes ainsi que leurs métabolites est en plein essor (Torregrosa-Crespo *et al.*, 2017 ; Ghosh *et al.*, 2019).

### 1.1. Utilisation des cellules des haloarchaea

#### 1.1.1. Bioremédiation

Certains procédés industriels tels que la production des produits chimiques, l'extraction du pétrole ou la fabrication du cuir génèrent des effluents à haute salinité contenant des composés toxiques. Ces eaux résiduaires doivent être traitées avant leur rejet dans l'environnement. Étant donné que la plupart des traitements biologiques sont inhibés par la forte concentration en NaCl, les halorachaea sont de bons candidats dans la bioremédiation des eaux usées industrielles grâce à leurs capacités métaboliques qui restent actives en fortes concentrations de sel et en présence des contaminants organiques (Abrevaya, 2012 ; Bonete *et al.*, 2015 ; Singh et Singh, 2017). Plusieurs études ont révélé la capacité de ces microorganismes à dégrader différents composés organiques tels que le phénol, l'acide benzoïque, l'acide p-hydroxybenzoïque, le naphthalène, le pyrène, l'anthracène, etc. (Al-Mailem *et al.*, 2010 ; Ding et Lai, 2010 ; Tapilatu *et al.*, 2010 ; Bonfá *et al.*, 2011 ; Khemili-Talbi *et al.*, 2015). La capacité de certaines haloharchaea à dégrader les colorants azoïques représente également un moyen efficace pour la décoloration des effluents de l'industrie textile (Kiadehi *et al.*, 2018). Aussi, quelques souches des espèces de *Haloferax mediterranei* et *Haloferax denitrificans* ont démontré un potentiel de dénitrification intéressant, et peuvent ainsi être utilisées dans l'élimination des nitrites et des nitrates des eaux salines (Cyplik *et al.*, 2007 ; Nájera-Fernández *et al.*, 2012).

#### 1.1.2. Fermentation des aliments

Les *Archaea* halophiles extrêmes sont les principaux microorganismes isolés à partir des aliments fermentés salés (Singh et Singh, 2017). Des études ont montré que les protéases

produites par ces microorganismes sont impliquées dans le processus de fermentation. Certaines espèces comme *Natrimena gari* et *Halobacterium salinarum* peuvent également diminuer la teneur en histamine et de ce fait améliorer la sécurité sanitaire de ces produits (Tapingkae *et al.*, 2010 ; Alfonzo *et al.*, 2017). Des essais d'incorporation de la souche *Halobacterium* sp. SP1 dans la sauce à poisson ont été menés afin d'accélérer le processus de fermentation et d'améliorer la qualité organoleptique du produit (Akolkar *et al.*, 2010).

### 1.1.3. Utilisation en nanobiotechnologie

La nanobiotechnologie consiste à utiliser les cellules microbiennes pour la production des nanoparticules (or, argent, silicium, etc.). Les haloarchaea peuvent être de bons candidats pour la synthèse des nanoparticules. Leurs cellules sont lysées facilement à faibles concentrations de sel, rendant ainsi la récupération de ces particules plus facile et plus rentable par rapport à d'autres microorganismes. La synthèse des nanoparticules d'argent a été rapportée chez l'espèce *Halococcus salifodinae* (Srivastava *et al.*, 2014 ; Srivastava et Kowshik, 2015).

### 1.1.4. Augmentation de la production du sel

La présence des haloarchaea dans les marais salants est considérée bénéfique au processus de fabrication du sel. En effet, les pigments caroténoïdes de ces microorganismes absorbent l'énergie lumineuse, et augmentent de ce fait la température des bassins, ce qui conduit à une augmentation des taux d'évaporation, accroissant ainsi la production de sel (Oren, 2010b).

## 1.2. Utilisation des biomolécules des haloarchaea

### 1.2.1. Enzymes hydrolytiques

Les haloarchaea constituent une source extrêmement variée d'enzymes hydrolytiques intéressantes telles que les amylases, les protéases, les lipases, les estérases, etc. (Torregrosa-Crespo *et al.*, 2016) (Tableau 4). Ces enzymes sont dites polyextremophiles du fait de leur capacité à fonctionner en présence de fortes concentrations en sel et de solvants organiques, de tolérer des températures relativement élevées, et des variations de pH (Kumar *et al.*, 2016a ; Delgado-García *et al.*, 2018). Ces propriétés rendraient les haloenzymes attrayantes pour différentes applications biotechnologiques puisqu'elles seraient capables de catalyser des réactions dans des conditions difficiles. Cependant, elles restent largement inexploitées à l'échelle industrielle. Cela est dû en partie à la demande limitée en enzymes osmotolérantes

dans les procédés de fabrication (Bonete et Martinez-Espinosa, 2011; Amoozegar *et al.*, 2017).

**Tableau 4.** Exemples d'haloenzymes et de leurs propriétés physico-chimiques.

Hydrolases	Espèces productrices	Conditions optimales			Références
		NaCl (M)	T (°C)	pH	
<b><math>\alpha</math>-amylases</b>	<i>Haloferax mediterranei</i>	3,0	60	7,8	(Pérez-Pomares <i>et al.</i> , 2003)
	<i>Halorubrum xinjiangense</i>	4,0	70	8,5	(Moshfegh <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Natronococcus amylolyticus</i>	2,5	55	8,7	(Kobayashi <i>et al.</i> , 1992)
	<i>Haloarcula</i> sp.S-1	4,3	50	7,0	(Fukushima <i>et al.</i> , 2005)
	<i>Haloarcula hispanica</i>	5,0	50	6,5	(Hutcheon <i>et al.</i> , 2005)
<b>Protéases</b>	<i>Haloferax lucentensis</i>	4,3	60	8,0	(Manikandan <i>et al.</i> , 2009)
	<i>Halobacterium</i> sp.	2,6	60	10,0	(Vijayaraghavn <i>et al.</i> , 2012)
	<i>Natrialba magadii</i>	1,5	60	10,0	(Giménez <i>et al.</i> , 2000)
	<i>Halobacterium</i> sp. HP25	2,9	60	8,0	(Elbanna <i>et al.</i> , 2015)
<b>Lipases</b>	<i>Haloarcula</i> sp. G41	2,6	70	8,0	(Li et Yu, 2014)
	<i>Natronococcus</i> sp. TC6	4,0	50	7,0	(Boutaiba <i>et al.</i> , 2006)
	<i>Halovivax</i> sp.	4,5	65	8,5	(Ozcan <i>et al.</i> , 2012)
<b>Estérases</b>	<i>Halobacterium</i> sp. NRC-1	4,6	30	6,0	(Camacho <i>et al.</i> , 2009)
	<i>Natronococcus</i> sp. TC6	4,0	35	7,5	(Bhatnagar <i>et al.</i> , 2005)
	<i>Haloarcula marismortui</i>	3,4	45	9,5	(Rao <i>et al.</i> , 2009)
	<i>Natrinema</i> sp.	3,0	55	8,5	(Ozcan <i>et al.</i> , 2012)
<b><math>\beta</math>-xylanase</b>	<i>Halorhabdus utahensis</i>	0,4	70	6,5	(Wainø et Ingvorsen, 2003)
<b><math>\beta</math>-xylosidase</b>	<i>Halorhabdus utahensis</i>	0,1	65	7,6	(Wainø et Ingvorsen, 2003)
<b>Cellulase</b>	<i>Haloarcula</i> sp. G10	3,0	60	9,0	(Li et Yu, 2013)
<b>Chitinase</b>	<i>Halobacterium salinarum</i>	1,5	40	7,3	(García-Fraga <i>et al.</i> , 2014)
<b>Agarase</b>	<i>Halococcus</i> sp. 197A	3,5	70	6,0	(Minegishi <i>et al.</i> , 2013)
<b>Enzymes de restriction</b>	<i>Halococcus acetoinfaciens</i>	0,3	45	7,5	(Amoozegar <i>et al.</i> , 2017)

### 1.2.2. Bactériorhodopsine

La bactériorhodopsine est une protéine rétinienne de 25-kDa découverte au début des années 1970 au niveau de la membrane pourpre de l'espèce *Halobacterium salinarum* (Oren, 2010b). Sa structure en treillis hexagonal extrêmement stable lui confère une résistance à la dégradation chimique, thermique et photochimique, ce qui permet son application dans différents domaines, y compris la thérapie génique, la production de rétines artificielles, d'amplificateurs optiques et de biocapteurs (Knoblauch *et al.*, 2014 ; Li *et al.*, 2018 ; Ghosh *et al.*, 2019). Grâce à ses propriétés optiques et à la densité importante de stockage qu'elle peut générer, la bactériorhodopsine peut également être utilisée dans le stockage optique ou impliquée dans la fabrication des biopuces pour les ordinateurs (Singh et Singh, 2017).

### 1.2.3. Polyhydroxyalcanoates

Les polyhydroxyalcanoates (PHA) sont des polymères de stockage accumulés en grandes quantités dans les cellules d'haloarchaea (Oren, 2010b). Ils sont biodégradables, biocompatibles et insolubles dans l'eau, d'où leur application dans de nombreux domaines. Ces polymères peuvent être utilisés dans la fabrication de plastique biodégradable, une alternative au plastique synthétique qui présente une préoccupation environnementale majeure au cours des dernières décennies, en raison de sa résistance à la dégradation par l'air, l'eau ou toute entité biologique. Ils servent également dans le domaine médical pour la production de matériaux résorbables, de matériaux de structure ou d'implants (Poli *et al.*, 2011 ; Kumar et Tiwari, 2019). Les PHA sont produits par plusieurs archées halophiles extrêmes appartenant aux genres *Haloferax*, *Haloarcula*, *Halogeometricum*, *Natrialba*, *Haloterrigena*, *Halococcus*, *Haloquadratum*, *Halorubrum* (Hezayen *et al.*, 2000 ; Koller, 2019). L'espèce *Haloferax mediterranei* a été identifiée comme le meilleur producteur de PHA, tout étant capable d'en accumuler jusqu'à 60 % (p/p) de son poids sec (Abrevaya, 2012 ; Koller, 2019).

### 1.2.4. Exopolysaccharides

Les exopolysaccharides (EPS) sont des polymères de haut poids moléculaire composés de résidus de sucre sécrétés par les microorganismes et qui peuvent prétendre à des applications dans de nombreux secteurs industriels (Squillaci *et al.*, 2016). Les EPS produits par les haloarchaea, en particulier par le genre *Haloferax* sont caractérisés par une haute viscosité et une résistance aux températures et pH extrêmes. Ainsi, ils constituent des candidats idéaux pour différents processus biotechnologiques. Ces polymères peuvent être utilisés dans l'industrie alimentaire en tant que gélifiants, stabilisateurs et épaississants, mais

également dans les industries pharmaceutiques et cosmétiques (Oren, 2010b ; Poli *et al.*, 2011 ; Singh et Singh, 2017).

### 1.2.5. Halocines

Les halocines sont des peptides antimicrobiens qui empêchent la croissance des halophages et des *Archaea*. Il en existe différents types, avec des spectres d'activités variés. Certaines d'entre elles sont aussi dotées d'activité protéolytique, et ont été identifiées comme des protéases à sérine (Kumar et Tiwari, 2019). Les halocines peuvent être utilisées en industrie alimentaire en tant qu'agents de conservation pour contrôler la croissance des haloarchaea dans les aliments salés (Charlesworth et Burns., 2016). Elles serviraient également dans le domaine médical, dans la protection de l'ischémie myocardique et dans la réduction des blessures lors de la transplantation d'organes (Besse *et al.*, 2015 ; Charlesworth et Burns, 2015).

### 1.2.6. Caroténoïdes

La majorité des membres de la classe *Halobacteria* produisent de grandes quantités de pigments caroténoïdes, ces pigments sont fortement demandés en tant qu'agents antioxydants bénéfiques pour la santé humaine. Ces pigments peuvent également être utilisés comme des colorants dans les aliments et les produits cosmétiques ou comme additifs alimentaires (Rodrigo-Baños *et al.*, 2015 ; De la Vega *et al.*, 2016). Ces composés font l'objet d'une étude détaillée dans le chapitre suivant.

# **Chapitre 3. Caroténoïdes**

## 1. Introduction aux caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des molécules apolaires hydrophobes appartenant à la famille des tétraterpénoïdes, une des plus grandes familles de pigments naturels. Ils sont très répandus dans la nature où ils sont principalement synthétisés par les végétaux et, dans une moindre mesure, par des levures, moisissures, algues ou d'autres groupes de microorganismes. Cependant, les animaux sont incapables de les synthétiser et ils se les procurent de leur alimentation. Environ 1178 caroténoïdes ayant des structures très variées ont été isolés et caractérisés (Calegari-Santos *et al.*, 2016 ; Fernandes *et al.*, 2018 ; Mussagy *et al.*, 2019).

Les caroténoïdes sont généralement composés de 40 atomes de carbone (structure en C<sub>40</sub>), avec un squelette carboné construit à partir de huit unités isopréniques à C<sub>5</sub>, formant ainsi la structure de base, le lycopène C<sub>40</sub>H<sub>56</sub> (Figure 8). Toutefois, il existe aussi des structures en C<sub>30</sub>, C<sub>45</sub> ou en C<sub>50</sub> contenant six, neuf et dix unités isopréniques, respectivement. Ces caroténoïdes sont exclusivement synthétisés par les bactéries et les archées (Yabuzaki, 2017).

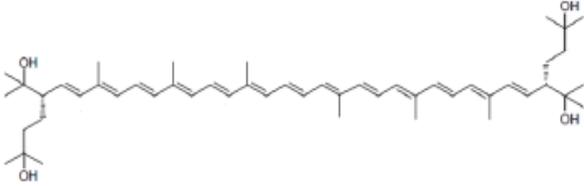
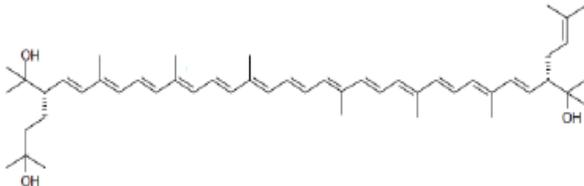
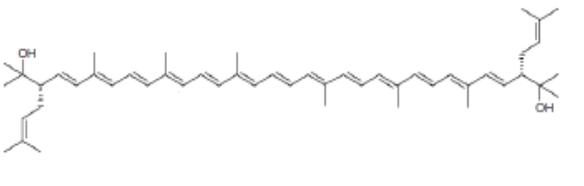
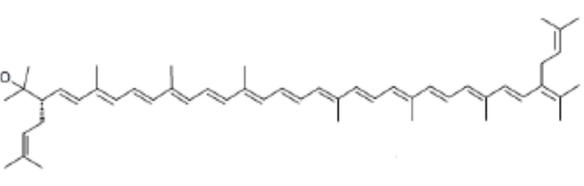
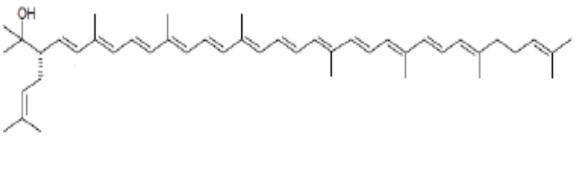
La structure de base des caroténoïdes est linéaire et symétrique, elle fait l'objet de réactions variées : hydrogénations, déshydrogénations, cyclisations, oxydations et réactions secondaires, ce qui a conduit à la grande variété des caroténoïdes connus (Nicol et Maudet, 2000 ; Fernandes *et al.*, 2018).

En fonction de la présence ou de l'absence d'oxygène dans leurs structures, les caroténoïdes sont classés en deux groupes: les carotènes qui sont purement hydrocarbonés et ne contiennent pas d'oxygène, et les xanthophylles contenant les fonctions hydroxyle, époxyde, carbonyle ou carboxyle (Nisar *et al.*, 2015).

La structure chimique des caroténoïdes présente un système conjugué de doubles liaisons (chaîne polyène) alternées avec des liaisons simples, formant la partie centrale de la molécule qui constitue le chromophore. Ce dernier est responsable de l'absorption de la lumière visible à 400-700 nm et de l'aspect coloré de ces molécules. On peut les trouver en multiples nuances de jaune, d'orange ou de rouge (Britton 1995). La variabilité de configuration des doubles liaisons induit la formation de plusieurs isomères *cis* ou *trans* à partir d'un même caroténoïde, mais la forme all-*trans* est largement prédominante dans la nature (Fernandes *et al.*, 2018).

Les caroténoïdes jouent un rôle important dans la nutrition et la santé humaine grâce à leurs propriétés intéressantes. En effet, ces pigments sont d'abord connus pour la convertibilité de certains d'entre eux en vitamine A, une vitamine essentielle, indispensable à la préservation des tissus épithéliaux des yeux et au système immunitaire. Ils sont également de puissants antioxydants agissant en tant que piègeur de radicaux libres lipophiles et inhibant efficacement l'oxydation des lipides de la membrane cellulaire.

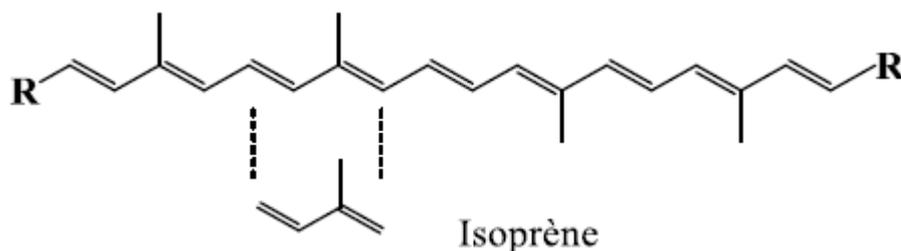
**Tableau 5.** Structures chimiques de la bactériorubérine et de ses dérivés (Rodrigo-Baños *et al.*, 2015).

Nom	Formule chimique	Structure
<b>Bactériorubérine</b>	$C_{50}H_{76}O_4$	
<b>Monoanhydrobactériorubérine</b>	$C_{50}H_{74}O_3$	
<b>Bisanhydrobactériorubérine</b>	$C_{50}H_{72}O_2$	
<b>Trisanhydrobactériorubérine</b>	$C_{50}H_{70}O$	
<b>2-isopentényle-3,4-déhydrorhodopine</b>	ND	

ND : non déterminé.

Plusieurs études ont montré que ces molécules seraient aussi dotées d'activités anti-inflammatoires et anticancéreuses (Calegari-Santos *et al.*, 2016 ; Young et Lowe, 2018 ; Amengual, 2019).

Le  $\beta$ -carotène et l'astaxanthine sont actuellement les principaux caroténoïdes utilisés dans l'industrie alimentaire, pharmaceutique et cosmétique (Farkas *et al.*, 2020).



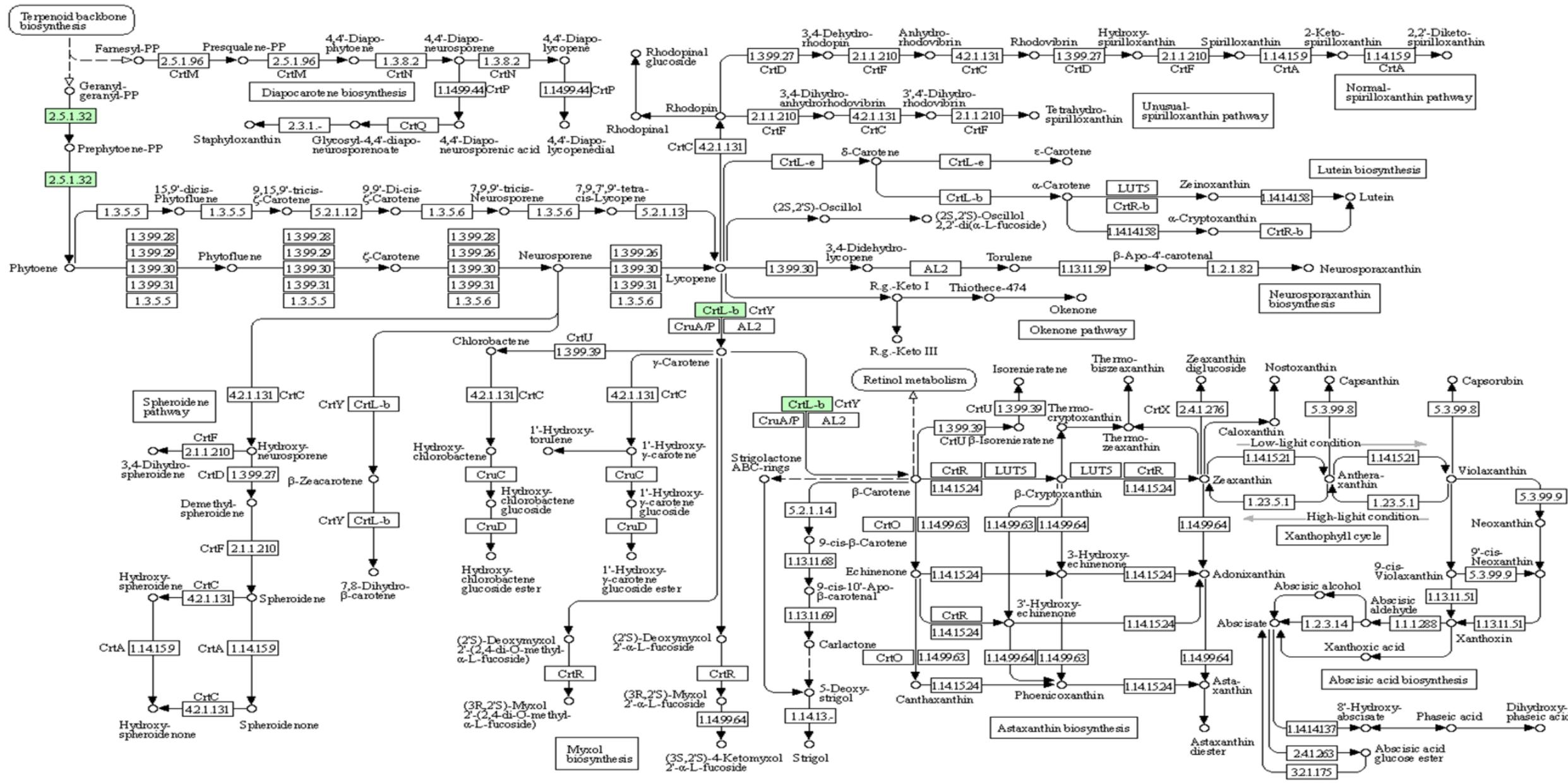
**Figure 8.** Structure chimique générale des caroténoïdes (Fernandes *et al.*, 2018).

## 2. Caroténoïdes produits par les *Archaea* halophiles extrêmes

### 2.1. Types et structures des caroténoïdes

Il existe peu de travaux publiés sur les caroténoïdes produits par les microorganismes halophiles par rapport à ceux produits par les autres organismes. Cependant, il a été démontré que la majorité des membres de la classe *Halobacteria* produisent des caroténoïdes C<sub>50</sub> représentés, principalement par la bactériorubérine et ses dérivés : 2-isopentenyle-3,4-déhydrorhodopine (IDR), bisanhydrobactériorubérine (BABR), et monoanhydrobactériorubérine (MABR) (Montero-Lobato *et al.*, 2018; Giani *et al.*, 2019) (Tableau 5). Plusieurs autres dérivés ont été trouvés, mais en petites quantités. Il s'agit du 3',4'-dihyromonoanhydrobactériorubérine, de l'haloxanthine et du 3',4'-époxymonoanhydrobactériorubérine. Ce dernier a été uniquement identifié chez *Haloferax volcanii*. D'autres caroténoïdes tels que le phytoène, le lycopène et le  $\beta$ -carotène sont également produits par ces microorganismes, mais à une concentration très faible, suggérant qu'ils peuvent être des précurseurs d'autres caroténoïdes (Calegari-Santos *et al.*, 2016 ; Torregrosa-Crespo *et al.*, 2016).

La bactériorubérine est le caroténoïde majeur synthétisé par les haloarchaea dont la structure est assez différente des autres caroténoïdes. C'est un composé tétra-hydroxylé à 50 atomes de carbone, constitué d'une chaîne isoprénoïde avec une série de treize doubles liaisons conjuguées (C=C). Ce composé ainsi que ses dérivés peuvent se présenter sous forme d'isomères *trans* et *cis* (Mandelli *et al.*, 2012 ; Torregrosa-Crespo *et al.*, 2018).



00906 7/11/19  
(c) Kanehisa Laboratories

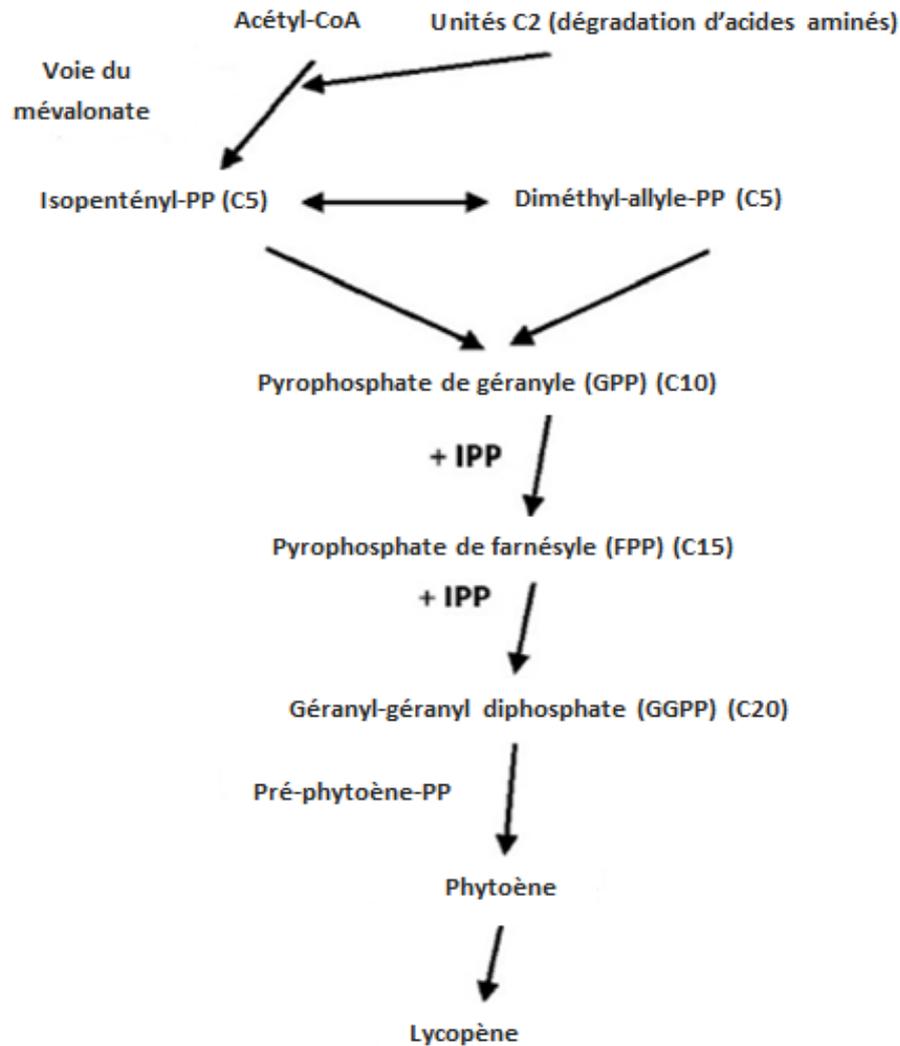
**Figure 9.** Carte métabolique de référence de la biosynthèse des caroténoïdes sur la base KEGG pathway (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (consultable sur le lien : [https://www.kegg.jp/dbget-bin/www\\_bget?hma00906](https://www.kegg.jp/dbget-bin/www_bget?hma00906)). Les enzymes impliquées sont représentées sous la forme de rectangles contenant le numéro EC (*Enzyme Commission*). La voie marquée en vert représente la voie de biosynthèse présente chez l'espèce *Haloarcularia marismortui*.

## 2.2. Biosynthèse

La caroténogénèse, sa régulation et ses voies métaboliques n'ont pas été étudiées en détail chez les haloarchaea et peu d'informations existent sur les voies de biosynthèse et les enzymes impliquées (Giani *et al.*, 2019) (Figure 9).

Les premières étapes sont communes à tous les organismes produisant des caroténoïdes, les haloarchaea utilisent la voie du mévalonate qui commence par la formation de l'acide mévalonique, intermédiaire clé de la biosynthèse, à partir de l'acétyl-CoA. L'acide mévalonique subit ensuite une décarboxylation suivie d'une phosphorylation aboutissant à la formation d'isopentényle diphosphate (IPP) (Falb *et al.*, 2008). Les enzymes responsables de ces deux réactions ont été identifiées et caractérisées au niveau moléculaire chez l'espèce *Haloferax volcanii*, il s'agit de la phosphomévalonate décarboxylase codée par le gène *mvaD* et l'isopentényle phosphate kinase codée par le gène *HVO\_2762* (VanNice *et al.*, 2014).

L'IPP est ensuite transformé par une isomérisation, en diméthyl-allyle pyrophosphate, la molécule de base pour l'allongement de la chaîne. Les additions de molécules d'isopentényle pyrophosphate par réactions de désaturation, conduisent à la formation successive du géranyle pyrophosphate (GPP) (10 carbones), du farnésyle pyrophosphate (FPP) (15 carbones) et du géranyl-géranyl diphosphate (GGPP) (20 carbones). Les enzymes responsables de ces réactions n'ont pas été identifiées. La condensation de deux molécules de GGPP donne le phytoène (incolore) qui est le premier caroténoïde à 40 carbones. Cette réaction de condensation est catalysée par une phytoène synthétase prédite codée par le gène *CrtB*. La formation de caroténoïdes colorés nécessite un système d'extension de doubles liaisons par une série de réactions de désaturations catalysées par une phytoène désaturase prédite codée par le gène *CrtI*. La désaturation du phytoène donne successivement du phytofluène, du ζ-carotène, du neurosporène et enfin du lycopène (Sandmann, 2001 ; Falb *et al.*, 2008 ; Rodrigo-Baños *et al.*, 2015 ; Yang *et al.*, 2015 ; Calegari-Santos *et al.*, 2016) (Figure 10).



**Figure 10.** Premières étapes de la biosynthèse des caroténoïdes C<sub>50</sub> chez les haloarchaea (Rodrigo-Baños *et al.*, 2015).

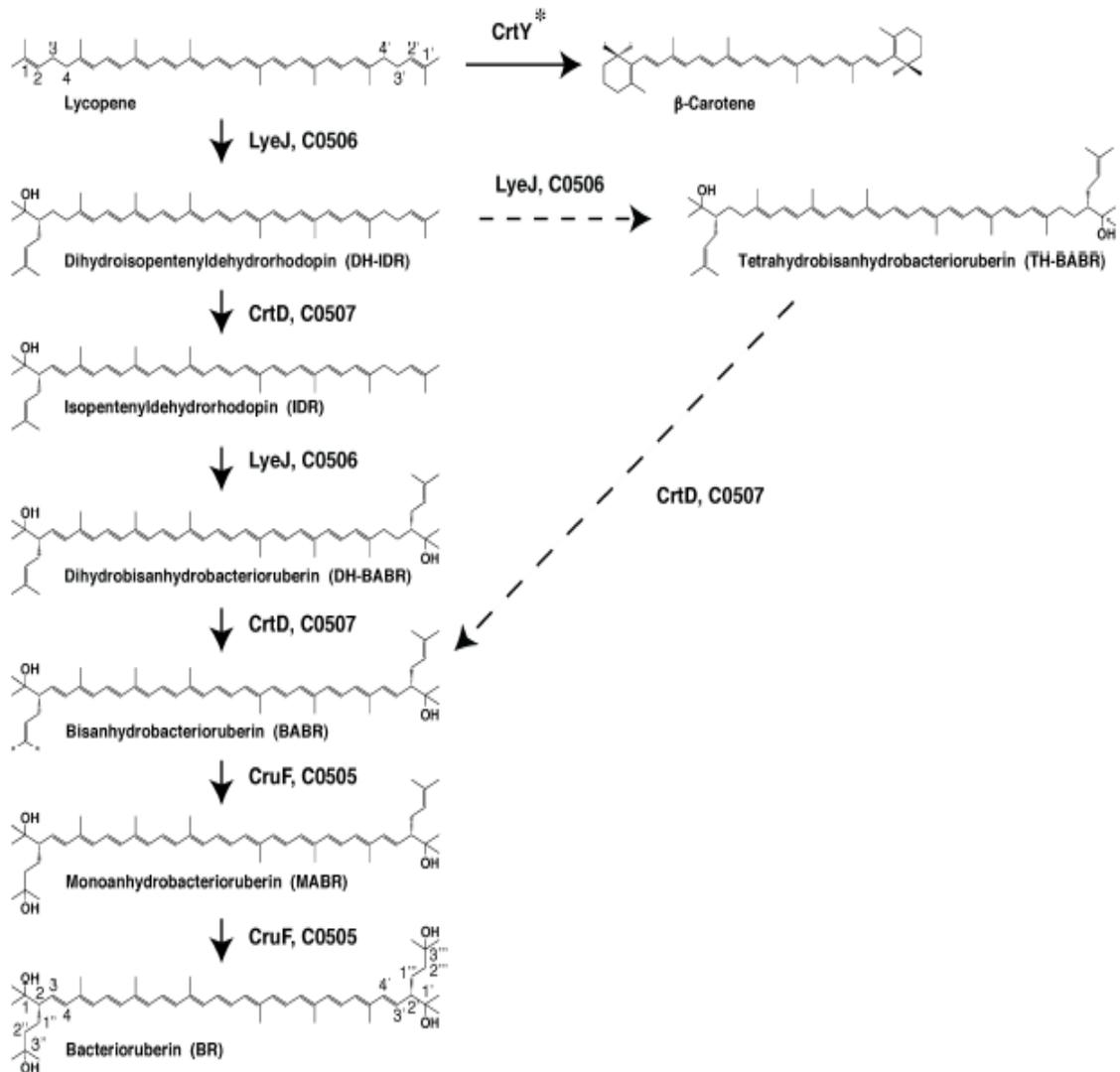
Les étapes tardives de la caroténogénèse, dans lesquelles le lycopène est converti en bactériorubérine n'ont pas été étudiées en détail. Les premiers rapports ont indiqué que la bactériorubérine est issue de l'ajout d'unités d'isoprène C<sub>5</sub> à chaque extrémité de la chaîne du lycopène, suivi de l'introduction des groupes hydroxyles. Cependant, toutes les enzymes associées et, par conséquent, la voie de biosynthèse complète n'ont pas été déterminées (Kushwaha et Kates, 1975 ; Kushwaha et Kates, 1976 ; Kamekura et Kates, 1988 ; Falb *et al.*, 2008).

En 2011, Dummer *et al.* ont révélé la présence d'un gène nommé *lye* codant une lycopène élongase chez *Halobacterium salinarum*, cette enzyme catalyse la conversion du lycopène en tétrahydrobis-anhydrobactériorubérine, un précurseur de la bactériorubérine.

Plus tard, une étude menée chez *Haloarcula japonica* a décrit pour la première fois les étapes de la conversion du lycopène en bactériorubérine (Yang *et al.*, 2015). Selon cette étude la bactériorubérine est synthétisée sous l'action de trois enzymes :

- Une enzyme bifonctionnelle lycopène élongase /1,2-hydratase (LyeJ), codée par le gène *c0506*, responsable de l'ajout d'une unité d'isoprène C<sub>5</sub> et d'un groupe hydroxyle à l'extrémité du lycopène et à celle de l'isopentényldéhydrorhodopine pour donner la dihydroisopentényldéhydrorhodopine et la dihydrobis-anhydrobactériorubérine, respectivement ;
- Une caroténoïde 3,4-désaturase (CrtD) codée par le gène nommé *c0507*, qui introduit des doubles liaisons en C<sub>3</sub> et C<sub>4</sub> de la dihydroisopentényldéhydrorhodopine et en C<sub>3'</sub> et C<sub>4'</sub> de la dihydrobis-anhydrobactériorubérine pour donner l'isopentényldéhydrorhodopine et la bis-anhydrobactériorubérine, respectivement ;
- Une bis-anhydrobactériorubérine hydratase (CruF) codée par le gène *c0505*, catalysant la réaction qui introduit des groupes hydroxyle au C<sub>3''</sub> et C<sub>3'''</sub> de la bis-anhydrobactériorubérine pour donner la bactériorubérine.

Cette étude est la seule à ce jour qui a décrit la voie de biosynthèse complète de la bactériorubérine à partir du lycopène et identifié les enzymes impliquées (Figure 11). Cependant, une autre étude basée sur l'annotation de 100 génomes d'espèces d'haloarchaea a été menée récemment afin de prédire le processus de caroténogénèse. Les résultats obtenus ont révélé que tous les génomes analysés contiennent les gènes impliqués dans la conversion du lycopène en bactériorubérine, précédemment identifiés chez *Haloarcula japonica*. Ces génomes contiennent également au moins une copie des gènes codant pour une phytoène synthétase, une phytoène désaturase, une prényltransférase et une protéine hypothétique dont la séquence est similaire à celle du gène codant la bis-anhydrobactériorubérine hydratase (Giani *et al.*, 2020). D'après cette étude, la voie décrite par Yang *et al.* (2015) semble être la principale voie de la biosynthèse de la bactériorubérine à partir du lycopène chez les haloarchaea.



**Figure 11.** Étapes de la conversion du lycopène en bactériorubérine chez *Haloarcula japonica*. Flèches pleines, étapes de la conversion ; flèches en pointillés, étapes possibles ; astérisque, enzyme non identifiée (Yang *et al.*, 2015).

### 2.3. Fonctions biologiques

La bactériorubérine et ses dérivés participent à plusieurs grandes fonctions physiologiques, ils sont de puissants antioxydants qui protègent les cellules contre le stress oxydatif, en piégeant les radicaux libres générés par l'exposition aux rayons UV, et en captant leurs électrons célibataires, les transformant ainsi en molécules ou ions stables (Abbes *et al.*, 2013). Ces pigments augmentent la rigidité de la membrane cellulaire en agissant comme des rivets intercellulaires grâce à la présence de groupes hydroxyles dans leurs structures. Ils augmentent également la perméabilité de la membrane cellulaire à l'oxygène et jouent le rôle d'une barrière contrôlant la perméabilité à l'eau, contribuant ainsi à l'adaptation des

haloarchaea dans les environnements hypersalins (Fang *et al.*, 2010 ; Torregrosa-Crespo *et al.*, 2018).

Les fonctions biologiques des caroténoïdes C<sub>50</sub> chez l'homme sont liées à leur nature d'antioxydants. Ils sont capables de protéger les cellules contre les attaques des radicaux libres et d'exercer ainsi une action préventive contre un certain nombre de maladies dégénératives. Certaines études ont trouvé que la bactériorubérine présente une capacité antioxydante supérieure à celle du  $\beta$ -carotène, ceci est lié au nombre de doubles liaisons conjuguées dans leurs structures. En effet, la bactériorubérine contient 13 doubles liaisons contre 11 dans le  $\beta$ -carotène (Mandelli *et al.*, 2012 ; Yang *et al.*, 2015 ; Squillaci *et al.*, 2017). En outre, certaines études ont montré que ces caroténoïdes seraient dotés d'activités anticancéreuses, antihémolytiques et antitumorales (Abbes *et al.*, 2013 ; Hou et Cui, 2017).

### **3. Caractérisation et purification des caroténoïdes produits par les haloarchaea**

#### **3.1. Extraction**

Les caroténoïdes des haloarchaea sont retrouvés à l'intérieur de la cellule, au niveau de la membrane cellulaire. Ainsi, leur récupération nécessite de faire une extraction en cassant la paroi de la cellule. Plusieurs techniques, de type chimique ou physique, sont proposées dans la littérature. Cependant, l'extraction par solvant organique est la technique la plus utilisée, étant donné que la paroi de ces microorganismes est sensible à l'action des solvants. La lyse cellulaire étant simplement provoquée en diminuant la concentration en sel (Oren, 2002). Cette technique est basée sur le principe de la diffusion du solvant à travers la matrice ce qui permet de solubiliser les caroténoïdes et de précipiter les protéines et les lipides membranaires (Strati et Oreopoulou, 2014). Les solvants choisis pour l'extraction doivent avoir un point d'ébullition faible afin de minimiser la température d'extraction et d'être adaptés à la polarité des caroténoïdes (Machmudah et Goto, 2013). Les solvants organiques les plus utilisés sont le méthanol, l'acétone et l'hexane (Squillaci *et al.*, 2018).

#### **3.2. Techniques d'analyse et de purification**

La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) est la technique la plus utilisée pour l'analyse et la purification des caroténoïdes produits par les haloarchaea (Giani *et al.*, 2019). Elle présente l'avantage de protéger les échantillons de possibles dégradations. En effet, la possibilité de faire les analyses à température ambiante évite la dégradation thermique, la dégazéification de la phase mobile protège les caroténoïdes de l'oxydation et le système confiné de l'effet de la lumière directe. Les extraits de caroténoïdes

sont séparés selon leur polarité sur colonne généralement de type C18 (Rodriguez-Amaya 2010 ; Amorim-Carrilho *et al.*, 2014).

La chromatographie sur couche mince (CCM) est également très utilisée pour la séparation et la purification des caroténoïdes produits par des haloarchaea (Giani *et al.*, 2019). Elle repose, principalement sur des phénomènes d'adsorption, et permet la séparation des composés en fonction de leur interaction avec deux phases non-miscibles: une phase stationnaire constituée d'une couche mince de matériel adsorbant (souvent le gel de silice ou l'oxyde d'aluminium) et une phase mobile formée d'un solvant ou d'un mélange de solvants qui va entraîner les composés à se séparer le long de la phase stationnaire (Akash et Rehman, 2020).

La limite de l'utilisation de la CCM est le manque de sensibilité et de résolution. En effet, elle ne permet pas toujours une bonne séparation, en particulier dans le cas d'extraits complexes. Aussi, l'instabilité des caroténoïdes en présence de lumière et d'oxygène en plus d'éventuelles réactions de dégradation sur la phase stationnaire peut influencer et fausser les résultats (Zaghdoudi, 2015).

### 3.3. Identification des caroténoïdes

La spectrophotométrie UV-visible couplée à la spectrométrie de masse (SM) est la méthode utilisée pour l'identification des caroténoïdes produits par les haloarchaea (Giani *et al.*, 2019). Les détecteurs UV-visible permettent la détection continue et la collection des données spectrophotométriques au cours de l'analyse. Les spectres d'absorption des caroténoïdes d'haloarchaea montrent de façon constante trois pics situés sur l'intervalle 455-532 nm, et deux autres pics à des longueurs d'onde plus petites. Ces pics sont utilisés pour caractériser ces pigments. Cependant leur position est sensiblement influencée par la pureté du pigment et la nature du solvant utilisé. La spectrométrie de masse permet d'augmenter la sensibilité de détection et donne une caractérisation plus précise basée sur la masse moléculaire et le profil de fragmentation de chaque caroténoïde. Le détecteur le plus utilisé pour l'analyse des caroténoïdes en SM est l'ionisateur par électro-spray (ESI) (Britton 1995 ; Van Breemen *et al.*, 2012 ; Amorim-Carrilho *et al.*, 2014).

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) est souvent utilisée pour l'élucidation de la structure des isomères (Lorantfy *et al.*, 2014).

La spectroscopie Raman a été également utilisée pour l'identification de la bactériorubérine chez certaines espèces d'haloarchaea (Winters *et al.*, 2013 ; Oren *et al.*, 2018).

#### 4. Production des caroténoïdes par les haloarchaea

La production des caroténoïdes par les haloarchaea présente plusieurs avantages. Tout d'abord, la tolérance de ces microorganismes aux concentrations élevées en sels empêche la contamination par d'autres microorganismes, ce qui permet de travailler dans des conditions non stériles, facilitant ainsi leur culture à grande échelle et réduisant les coûts de production. Ensuite, le processus d'extraction des caroténoïdes est facile, rapide et pas cher. La lyse cellulaire est provoquée par l'eau distillée sans avoir recours à un traitement mécanique, nécessaire chez d'autres organismes. Aussi, les haloarchaea présentent un taux de production de caroténoïdes supérieur à celui rapporté pour plusieurs microalgues. Enfin, cette production peut être améliorée ou accélérée par modification génétique ou même en modifiant les conditions de culture. En effet, les *Archaea* halophiles extrêmes ont été le premier groupe d'*Archaea* chez lequel la transformation de routine avec l'ADN étranger a été possible, et une gamme de méthodes pour leur manipulation génétique a été développée (Rodrigo-Baños *et al.*, 2015 ; Torregrosa-Crespo *et al.*, 2018 ; Giani *et al.*, 2019).

#### 5. Intérêt biotechnologique des caroténoïdes des haloarchaea

Les caroténoïdes haloarchéens sont d'un grand intérêt biotechnologique et offrent plusieurs applications dans de nombreux domaines. Cependant, ils restent peu étudiés et aucune application à grande échelle n'a été développée à ce jour (Torregrosa-Crespo *et al.*, 2016 ; Giani *et al.*, 2019).

##### 5.1. En industrie agroalimentaire

Compte tenu des tendances de consommation, l'industrie agroalimentaire essaye de remplacer intégralement les composés synthétiques par des composés naturels notamment les colorants qui sont de large utilisation dans les conserves, les confiseries, les boissons, mais qui sont très connus pour leurs effets indésirables, tant sur la santé que sur l'environnement. Les caroténoïdes produits par les haloarchaea peuvent donc être utilisés comme des agents de coloration dans les denrées alimentaires, limitant ainsi l'utilisation des colorants synthétiques (Rodrigo-Baños *et al.*, 2015 ; Wang *et al.*, 2019). Grâce à leurs importantes propriétés antioxydantes, ces caroténoïdes serviraient d'additifs alimentaires. Leur action protégerait, d'une part les aliments des altérations provoquées par l'oxydation, et d'autre part jouerait un rôle important dans la prévention de plusieurs pathologies. Les aliments fonctionnels supplémentés par ces caroténoïdes pourraient ainsi prévenir certaines pathologies telles que les maladies cardio-vasculaires, certains cancers et certaines affections des yeux liées au vieillissement (dégénérescence de la rétine) (Vilchez *et al.*, 2011; De la Vega *et al.*, 2016). En

effet, plusieurs études ont démontré que les caroténoïdes C<sub>50</sub> possèdent un potentiel antioxydant beaucoup plus important que celui de plusieurs antioxydants de référence notamment le  $\beta$ -carotène, l'acide ascorbique et le BHT (Butyl Hydrxy Toluène) (Hou et Cui, 2017 ; Squillaci *et al.*, 2018).

Ces composés peuvent également être utilisés en tant que suppléments alimentaires destinés à l'alimentation animale (volailles, crustacés, etc.) (Giani *et al.*, 2019).

## 5.2. Autres applications

Dans le domaine médical, les caroténoïdes C<sub>50</sub> peuvent être utilisés comme agents de prévention des maladies cardiaques ou activateurs de la production d'anticorps (Rodrigo-Baños *et al.*, 2015). Ils peuvent également être utilisés comme anti-tumoraux. Ainsi, Abbes *et al.* (2013) ont trouvé que l'exposition des cellules d'hépatocarcinome humain HepG2 à des concentrations sublétales de caroténoïdes produits par *Halobacterium halobium* conduit à une diminution de la viabilité de ces cellules. Plus tard, Hou et Cui (2017) ont montré que les caroténoïdes extraits à partir de *Haloplanus vescus* et de *Halogeometricum limi* possèdent un effet antiprolifératif dose-dépendant sur ces cellules tumorales. Les mêmes auteurs ont trouvé que ces caroténoïdes sont également dotés d'activité anti-hémolytique et pourraient être utilisés dans les traitements contre l'anémie hémolytique.

Récemment, une étude menée par Hegazy *et al.* (2020) a montré que les caroténoïdes produits par la souche *Natrialba* sp. M6 sont dotés d'une importante activité cytotoxique sur quatre lignées de cellules cancéreuses représentant les cancers humains les plus répons, sans pour autant être toxiques sur la lignée cellulaire humaine WI-38. Il s'agit des cellules Caco-2 (lignée cellulaire du cancer du côlon), MCF-7 (lignée cellulaire du cancer du sein), HepG-2 (lignée cellulaire du cancer hépatique) et HeLa (lignée cellulaire du carcinome épithéloïde du col de l'utérus). Ces mêmes caroténoïdes ont également montré une activité antivirale contre les virus de l'hépatite B et C en inhibant leurs polymérases, et pourraient ainsi être utilisés comme agents antiviraux.

Des essais d'utilisation des caroténoïdes C<sub>50</sub> comme agents protecteurs sont menés afin de réduire les lésions cutanées induites par la radiothérapie (Kuchina, 2018).

En cosmétologie, une étude récente suggère l'incorporation de l'*all-trans*-bacteriorubérine en tant que filtre UV dans les crèmes solaires. Il a été montré que ce caroténoïde n'induisait aucune réaction de phototoxicité ou de photoallergie (Silva *et al.*, 2019).

**MATÉRIEL**  
**ET**  
**MÉTHODES**

Les lacs hypersalins représentent un exemple typique des environnements extrêmes colonisés par une flore microbienne particulière. Les *Archaea* halophiles extrêmes constituent la principale composante de la biomasse microbienne de ces environnements. Elles sont capables de produire une grande variété de biomolécules à intérêt industriel, notamment des caroténoïdes (Enache *et al.*, 2017 ; Ghosh *et al.*, 2019 ; Corral *et al.*, 2020).

Notre étude vise la prospection de souches archéennes productrices de pigments à partir d'environnements hypersalins algériens, elle a pour objectifs de :

- Isoler des souches archéennes productrices de caroténoïdes à partir d'environnements hypersalins algériens ;
- Effectuer une caractérisation polyphasique des souches les plus intéressantes, sélectionnées sur la base de leurs caractères physiologiques et de leur potentiel de production des pigments ;
- Caractériser les caroténoïdes produits par une sélection de ces souches.

### 1. Déroulement de l'expérimentation

Ce travail a été réalisé entre octobre 2016 et mai 2019. L'expérimentation a été effectuée dans différents laboratoires :

- L'isolement, la caractérisation phénotypique des isolats et le dosage des pigments ont été réalisés au niveau du laboratoire de recherche Biotechnologie et Qualité des Aliments (BIOQUAL) et des laboratoires pédagogiques de l'institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires (INATAA), de l'Université Frères Mentouri Constantine 1 (UFMC1) ;
- La caractérisation moléculaire des souches, la caractérisation des caroténoïdes et l'évaluation de leurs activités biologiques ont été effectuées au département d'agrochimie et de biochimie de l'université d'Alicante (Espagne) (Janvier-Avril 2018), et à la faculté des sciences expérimentales de l'université de Huelva (Espagne) (Janvier-Avril 2019).

Les différentes étapes de l'expérimentation menée afin d'atteindre les objectifs de notre travail sont résumées dans la figure 12.

## Matériel et Méthodes

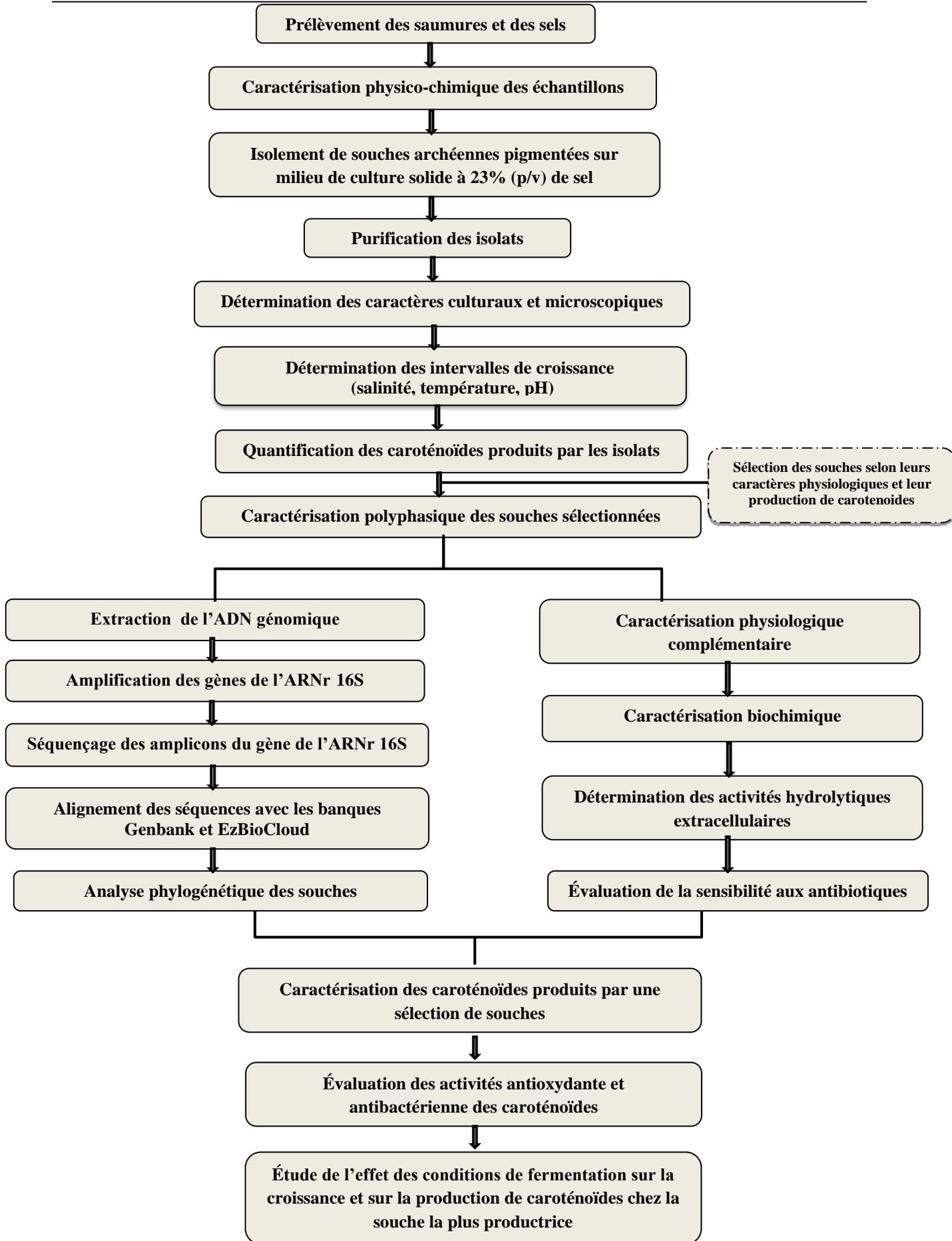


Figure 12. Schéma récapitulatif de la démarche expérimentale adoptée.

## 2. Échantillonnage

### 2.1. Présentation des sites d'études

L'Algérie compte un nombre important de lacs hypersalés continentaux (chotts et sebkhas), répartis entre les deux chaînes montagneuses de l'Atlas tellien, l'Atlas saharien et l'Erg oriental. Ces écosystèmes hypersalins font partie des ressources les plus précieuses sur le plan de la diversité biologique et de la productivité naturelle (Demnati, 2017). Au cours de ce travail, sept environnements hypersalins situés sur différentes zones géographiques ont été étudiés (Figure 13) :

- **Chott Melghir** : c'est le plus grand lac salé en Algérie avec près de 551500 ha de superficie. Il est situé au Nord-Est (34°11'N, 6°21'E) du Sahara septentrional entre trois wilayas (EL Oued, Biskra et Khenchela). Le climat dans ce chott est chaud et aride avec une forte évaporation et de faibles précipitations. Il est alimenté pendant la saison des pluies hivernales par les oueds Djeddi, Biskra, EL Arab et EL Abiod. Ce chott est exploité par l'entreprise nationale du sel (ENASEL) pour l'extraction du sel de table (Ballais, 2010 ; Demnati, 2013) ;

- **Sebkha de Bazer Sakra** : cette sebkha est située dans le secteur méridional des hautes plaines sétifiennes, à 9 km au Sud de la ville d'El-Eulma (36°4'N, 5°40'E). Elle couvre une superficie de 4379 ha. C'est une dépression endoréique dont l'altitude est la plus élevée de la région de Sétif. Elle est alimentée par l'eau de pluie et les eaux usées domestiques et industrielles apportées par trois cours d'eau : Oued Djermane, Oued El-guitoun et Oued El-Mellah (Baaziz, 2012) ;

- **Chott El Frain** : il est situé sur le territoire des communes de Tella et de Beida Bordj (35°55'N, 5°37'E), Wilaya de Sétif. Il occupe une superficie totale de 1500 ha. Ce chott est non exploité et est exposé à un fort taux d'évaporation (Baaziz *et al.*, 2011) ;

- **Sebkha Ezzemoul** : elle est située sur le territoire de la wilaya d'Oum El-Bouaghi, Daïra de Souk Naâmae commue de Ouled Zouai (35°53'N, 6°30'E). Elle est distante de 17 km au Sud de Ain M'lila et longe la route nationale N°3 reliant Constantine à Batna. Elle a une superficie de 6765 ha et une profondeur de 0,6 mètre. Cette sebkha comprend 12 tables salantes ou bassins de concentration et un bassin de cristallisation, destinés à la production de sel par l'ENASEL (Kharroub, 2007) ;

- **Salin de Ain Oulmene** : c'est une unité de production de sel de l'ENASEL, connu sous le nom « Guergour Lamri », elle est située à 25 km du chef-lieu de la Wilaya de Sétif (35°59'N,

5°18'E). Il s'agit d'un diapir souterrain dont la saumure se forme par dissolution naturelle suite au rechargement de la nappe par les pluies ;

- **Sebkha de Sidi Bouziane** : elle est située à 18 km de la ville de Relizane (35°51'N, 00°39'E). Cette sebkha est connue sous le nom de « salines de Oued Djemaa », et s'étend sur une superficie de 1890 ha dont 32 ha sont répartis en huit surfaces, constituant les tables salantes destinées à la production de sel (Bennabi *et al.*, 2015) ;

- **Sebkha de Bethioua** : elle est située à 25 km au Sud-Ouest d'Arzew et à 50 km d'Oran (35°42'N, 00°18'W). Elle couvre une superficie de 5770 ha et peut atteindre une profondeur de 1,20 m. Elle est connue sous le nom de « salines d'Arzew » qui a pour mission de produire, de traiter et de commercialiser le sel (Bennabi *et al.*, 2015) ;

À l'exception de chott Frain et des salines d'Ain Oulmene, tous ces sites sont classés sur la liste Ramsar des zones humides d'importance internationale (Demnati *et al.*, 2017).

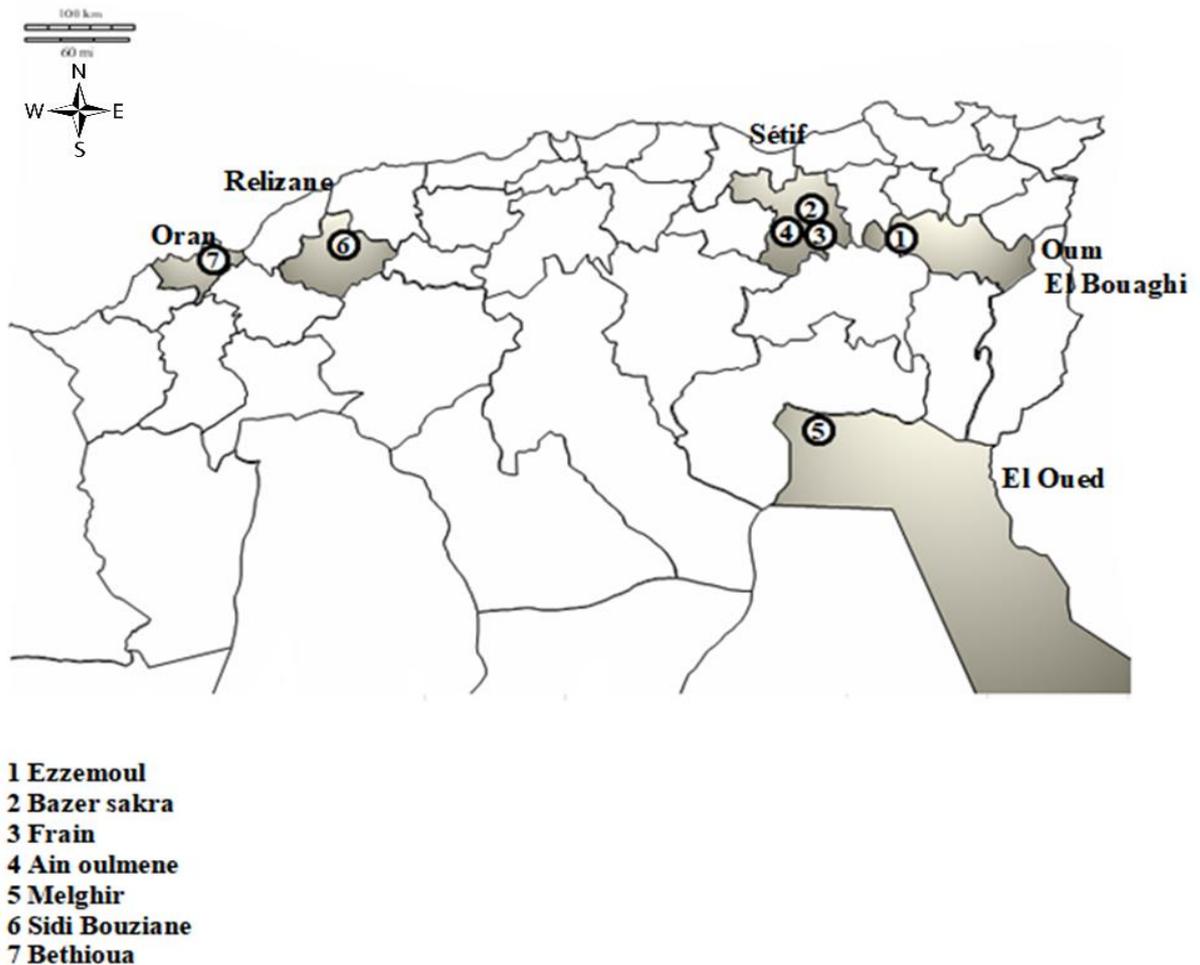


Figure 13. Répartition géographique des sites étudiés.

### 2.2. Prélèvement des échantillons

Les prélèvements ont été effectués entre octobre 2016 et mars 2017. La description des points de prélèvement et des échantillons est illustrée dans la figure 14 et dans le tableau 6, respectivement.

Les échantillons de saumures sont prélevés à environ 10 cm de la surface de l'eau dans des flacons en verre stériles. Les échantillons de sels sont prélevés par un raclage de la couche superficielle à l'aide d'une spatule stérile, puis récupérés dans des bocaux en verre stériles.

La température de l'air ambiant et des saumures est mesurée *in situ* à l'aide d'un thermomètre à immersion totale avec mercure. Les échantillons sont transportés dans une glacière et conservés à 4°C jusqu'à leur traitement.

Au laboratoire, le pH des échantillons est mesuré à l'aide d'un pH-mètre étalonné (OHAUS). Le pH des sels est déterminé selon la technique décrite par Pochon et Tradieux (1962) qui consiste à mélanger 5 g d'échantillon dans 12,5 mL d'eau distillée. La salinité des saumures est mesurée en utilisant un réfractomètre portatif (FG-108).

La composition ionique des échantillons a été déterminée au niveau du laboratoire de chimie de l'entreprise nationale de sel. Le dosage des ions calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) et magnésium ( $\text{Mg}^{2+}$ ) est réalisé par la méthode complexométrique utilisant l'EDTA (Éthylène Diamine Tétra-Acétique). La concentration des chlorures ( $\text{Cl}^-$ ) est déterminée par la méthode argentimétrique selon la norme ISO 2481, et celle des ions sulfates ( $\text{SO}_4^-$ ) par la méthode gravimétrique au sulfate de baryum selon la norme ISO 2480. La teneur en humidité des échantillons de sel est définie à 110 °C selon la norme ISO 2483.



**Figure 14.** Photographies des sites étudiés. A : salin de Ain Oulmene ; B : sebkha Ezzemoul ; C : sebkha Bazer Sakra ; D : chott Frain ; E : chott Melghir ; F : sebkha Sidi Bouziane ; G : sebkha Bethioua (photos prises par un appareil photo de marque Sony modèle DSC-W330).

**Tableau 6.** Distribution des échantillons par site et par point de prélèvement.

Site	Date de prélèvement	Code du point	Nature de l'échantillon
<b>Ezzemoul</b>	10/10/2016	EZ1	Saumure
		EZ2	Sels
		EZ3	Saumure
		EZ4	Sels
		EZ5	Saumure
		EZ6	Sels
<b>Bazer Sakra</b>	24/10/2016	BS1	Saumure
		BS2	Saumure
<b>Melghir</b>	10/12/2016	ME1	Saumure
		ME2	Sels
		ME3	Saumure
<b>Ain oulmene</b>	14/02/2017	AW1	Saumure
		AW2	Saumure
		AW3	Sels
		AW4	Saumure
		AW5	Sels
<b>Frain</b>	14/02/2017	FE	Sels
<b>Bethioua</b>	02/03/2017	BT	Saumure
<b>Sidi Bouziane</b>	15/03/2017	SB	Sels

### 3. Isolement, purification et conservation des isolats

L'isolement des souches archéennes à partir des échantillons de saumure et de sel est effectué sur le milieu de culture MGM (*modified growth medium*) contenant 5 g.L<sup>-1</sup> de peptone et 1 g.L<sup>-1</sup> d'extrait de levure et à une concentration saline de 23 % (p/v).

Le stock de sel à 30 % (p/v) qui a servi à la préparation de la solution saline est préparé suivant la composition de Subov (1931) modifiée par Dyall-Smith (2009) : NaCl 240 g; MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 30 g; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 35 g; KCl 7 g; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,5 g, et complété à 1000 mL avec de l'eau distillée.

D'après la littérature, le milieu MGM permet la culture d'une grande variété d'halophiles extrêmes. Sa composition ionique reflète celle des saumures et il contient la peptone et l'extrait de levure qui représentent une bonne source d'acides aminés, de peptides et de vitamines (Burns *et al.*, 2006 ; Dyall-Smith 2009). Ce milieu de culture a déjà été utilisé pour l'isolement d'un grand nombre d'*Archaea* halophiles à partir de divers environnements hypersalins (Sabet *et al.*, 2009 ; Makhdoumi-Kakhki *et al.*, 2012 ; Jaakkola *et al.*, 2014 ; Baricz *et al.*, 2015 ; Salari *et al.*, 2019).

Le milieu de culture est ajusté à pH 7,5 avec du NaOH 4M (Dyall-Smith, 2009), puis autoclavé à 120°C pendant 15 minutes avant utilisation. Pour avoir un milieu de culture solide, 20 g.L<sup>-1</sup> d'agar-agar sont ajoutés au milieu liquide.

L'isolement des halorachaea à partir des saumures est effectué par étalement en surface de 0,1 mL de chaque échantillon ou de ses dilutions (10<sup>-1</sup> à 10<sup>-4</sup>). Ces dernières sont préparées en diluant 1 mL de l'échantillon dans 9 mL d'une solution stérile de NaCl à 23 % (p/v).

Pour les échantillons de sel, un enrichissement est préalablement effectué en inoculant 9 mL du milieu liquide MGM à 23 % (p/v) avec 1 g de l'échantillon. Après homogénéisation, les tubes sont incubés à 37°C jusqu'à apparition de trouble. 1 mL de chaque bouillon d'enrichissement est dilué dans 9 mL d'une solution stérile de NaCl à 23 % (p/v) puis une série de dilutions est effectuée (10<sup>-1</sup> à 10<sup>-4</sup>). Ensuite, 0,1 mL de la solution mère ou de ses dilutions est étalé à la surface de la gélose MGM (Sabet *et al.*, 2009).

Les boîtes de Pétriensemencées sont emballées dans des sacs plastiques pour éviter la dessiccation puis incubées à 37 °C pendant 15 à 20 jours. Cette température permet l'isolement de la majorité des représentants des *Archaea* halophiles extrêmes (Schneegurt, 2012).

Après la période d'incubation, 4 à 5 colonies pigmentées d'aspects différents sont sélectionnées de chaque boîte, puis purifiées par repiquages successifs sur de nouvelles boîtes du même milieu d'isolement jusqu'à l'obtention des colonies bien pures.

La conservation des isolats est faite sur gélose MGM à 4 °C avec repiquage régulier, ou à -18 °C sur bouillon MGM additionné de 40 % (v/v) de glycérol utilisé comme cryoprotecteur (Di Ferdinando et Vreeland, 2006).

#### 4. Étude macroscopique et microscopique des isolats

L'aspect macroscopique des colonies (forme, taille, pigmentation, consistance, etc.) est déterminé sur gélose MGM, à l'œil nu ou à l'aide d'une loupe binoculaire (Motic S10).

La morphologie, l'arrangement et le Gram des cellules sont déterminés après application de la méthode de coloration de Gram (1884) modifiée par Dussault (1955), qui consiste à traiter les frottis avec une solution d'acétate à 2 % (v/v) pendant 5 minutes avant coloration. L'observation est effectuée à l'immersion, à l'aide d'un microscope optique Motic B3.

#### 5. Étude physiologique des isolats

La capacité des souches à se développer sous différentes conditions de salinité, de température et de pH est déterminée en variant un des paramètres alors que les deux autres sont maintenus constants.

Chaque souche estensemencée dans 5 mL du milieu MGM à 23 % (p/v) de sel puis est incubée à 37 °C pendant 7 jours. Ensuite, 0,1 mL de culture estensemencé sur milieu MGM solide. La croissance est contrôlée périodiquement entre 24 heures et 7 jours d'incubation. Les optima de croissance correspondent aux valeurs de salinité, de température et de pH ayant visuellement donné la meilleure croissance (Kharroub, 2007) :

➤ **Salinité** : l'exigence en sel est déterminée par ensemencement du milieu solide à pH 7,5, contenant des concentrations finales variables en sels : 10 ; 15 ; 20 ; 25 et 30 % (p/v) puis incubation à 37 °C ;

➤ **Température** : l'intervalle de température de croissance est déterminé par ensemencement du milieu solide à pH 7,5, contenant la concentration optimale en sel, puis incubation à 20 ; 25 ; 30 ; 37 ; 40 ; 45 ; 50 ; 55 et 60 °C ;

➤ **pH** : L'intervalle de pH de croissance est déterminé par ensemencement de milieu gélosé contenant la concentration optimale en sel, et additionné de 25 mM de tampon MES (pH 5,0 ; 5,5 ; 6,0 et 6,5), de MOPS (pH de 7,0 à 7,5) et de Tris (pH 8,0 ; 8,5 et 9,0) (Yang *et al.*, 2007). L'incubation est faite à température optimale.

## 6. Quantification des pigments caroténoïdes produits par les isolats

L'objectif de cette étape est de sélectionner parmi l'ensemble des souches isolées celles présentant des taux de production de caroténoïdes élevés sur milieu liquide (Figure 12).

### 6.1. Culture des isolats

Chaque souche estensemencée dans 5 mL du bouillon MGM préparé à la concentration optimale en sel, puis incubée pendant 7 jours à  $T_{opt}$  (température optimale) dans un bain-marie à agitation (Memmert) à 150 tours par minute (tpm). À l'issue de l'incubation, 1 mL de préculture de chaque souche est ajusté à une absorbance de 1,0 à 600 nm avec le bouillon MGM stérile, en utilisant un spectrophotomètre (JENWAY 7305). Après ajustement, 1 mL de cette préculture est transféré dans 20 mL du bouillon MGM à salinité optimale contenus dans des fioles Erlenmeyer de 50 mL. Les cultures sont incubées pendant 7 jours, à  $T_{opt}$  de chaque souche, sous une agitation de 150 tpm (Yachai, 2009)

### 6.2. Extraction et quantification des caroténoïdes

L'extraction des caroténoïdes à partir des cultures est réalisée selon le protocole décrit par Asker et Ohta (1999) (Figure 15). À l'issue de l'incubation, 5 mL de culture sont transférés dans un tube et centrifugés à 4000 g à 4 °C pendant 20 min. Après élimination du surnageant, le culot est remis en suspension dans 1 mL d'eau distillée. La suspension est agitée pendant 30 min à 37 °C avant d'être à nouveau centrifugée dans les mêmes conditions. Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 3 mL de méthanol pur. Après 1 heure d'agitation à l'abri de la lumière, le tube est centrifugé une dernière fois dans les mêmes conditions.

Le spectre d'absorption de tous les extraits est déterminé par un spectrophotomètre UV-Visible (Beckman/DU 800) sur une longueur d'onde de 300 à 700 nm.

La teneur en caroténoïdes totaux est calculée par application de la loi de Beer-Lambert :

$$A = \epsilon \times l \times C$$

- Où A est l'absorbance à la longueur d'onde du pic majeur ( $\lambda_{max}$ )
- $\epsilon$  : Coefficient d'absorption molaire en  $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$  ou d'absorption en masse % ( $E^{1\%}_{cm}$  : absorbance d'une solution de 1 g/100 mL)
- C : Concentration de la solution
- l : Largeur de cuve de spectrophotomètre en cm

Donc :  $C (mol \cdot L^{-1}) = A / (\epsilon \times l)$  ou  $C (mg \cdot L^{-1}) = \frac{A \times 10^4}{(E^{1\%}_{cm} \times l)}$

## Matériel et Méthodes

Avec  $l = 1 \text{ cm}$ , et en considérant la valeur du coefficient d'absorption spécifique  $E^{1\%}_{1\text{cm}}$  de 2660 (caroténoïdes des halophiles dans le méthanol) (Britton, 1995), la teneur en caroténoïdes a été alors calculée selon la formule suivante :

$$C = A \times 10^4 / 2660$$

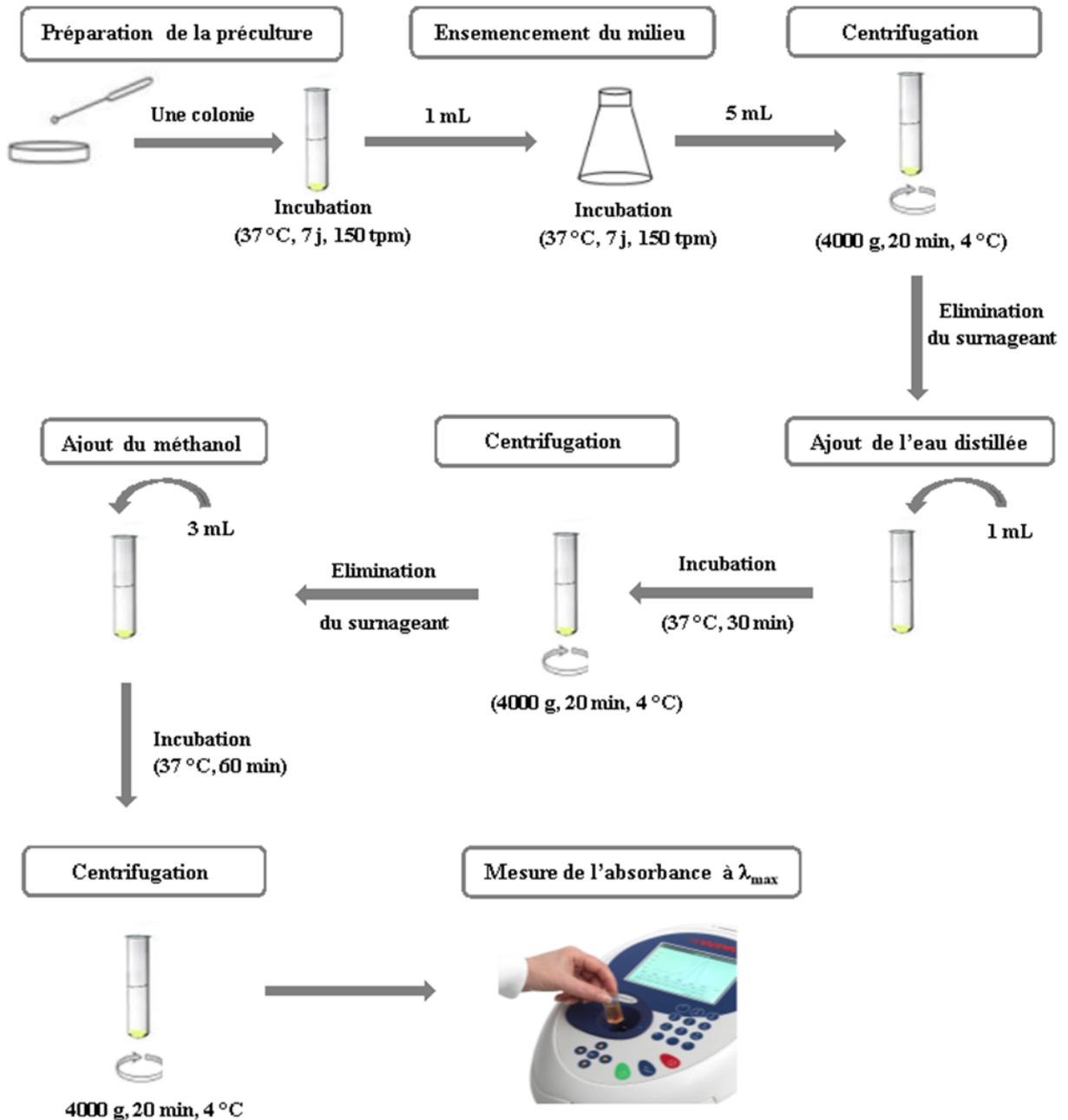


Figure 15. Protocole d'extraction et de quantification des caroténoïdes.

### 7. Caractérisation phénotypique des isolats

Les isolats sélectionnés sur la base de leurs caractères physiologiques et leur potentiel de production de caroténoïdes sont soumis à une caractérisation phénotypique. Les tests utilisés lors de cette caractérisation sont ceux recommandés par Oren *et al.* (1997) pour la description de nouveaux taxons dans l'ordre des *Halobacteriales*.

Les milieux de culture utilisés dans ces tests sont ajustés aux pH et salinité optimaux de chaque souche. L'incubation est réalisée à  $T_{opt}$  quand c'est indiqué.

#### 7.1. Utilisation des substrats carbonés

L'utilisation de substrats tests comme unique source de carbone, d'énergie et/ou d'azote est testée sur gélose MGM modifiée en supprimant toute source organique, et en rajoutant du  $NH_4Cl$  ( $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ ), du  $KH_2PO_4$  ( $0,005 \text{ g.L}^{-1}$ ), et du tampon MOPS (25 mM).

Les substrats sont utilisés à une concentration finale de 1 % pour les sucres et de 0,1 % pour les alcools, les acides organiques et les acides aminés (Oren *et al.*, 1997). L'incubation est faite pendant 15 jours.

Les substrats testés sont : D(+)-glucose, D(+)-galactose, D(+)-fructose, D(+)-lactose, D(+)-saccharose, D(+)-maltose, D(+)-mannose, cellulose, amidon, L-arginine, L-alanine, L-méthionine, L-histidine, L-tyrosine, L-isoleucine, L-thréonine, L-glutamine, citrate, oxalate, lactate, acétate, formiate, acide ascorbique, mannitol et glycérol.

#### 7.2. Caractérisation biochimique

##### 7.2.1. Recherche de la cytochrome-oxydase

Ce test est effectué à l'aide de disques «Ox» (Sigma) dont la zone réactionnelle est composée d'un papier filtre imprégné de N,N-diméthyl-1,4-phénylène diamine-dichlorure. Une colonie est prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur stérile puis est déposée sur un disque oxydase imprégné d'eau distillée stérile. La présence d'une cytochrome-oxydase se traduit au bout de 20 à 60 secondes par l'apparition d'une coloration mauve (Gerhardt *et al.*, 1994).

##### 7.2.2. Recherche de la catalase

Ce test est réalisé en versant une goutte de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) dilué au dixième, sur une lame de verre et d'y ajouter, à l'aide d'une pipette Pasteur, une colonie développée sur milieu gélosé. L'apparition immédiate d'une effervescence indique une réaction positive (Montalvo-Rodriguez *et al.*, 1998).

### 7.2.3. Réduction et production de gaz à partir de nitrate

Des tubes munis de cloches de Durham et contenant 20 mL de bouillon MGM, additionné de 0,5 % (p/v) de nitrate de sodium ( $\text{NaNO}_3$ ) sont ensemencés puis incubés pendant 7 jours. La réduction des nitrates en nitrite est mise en évidence par l'apparition d'une coloration rouge après l'ajout de quelques gouttes de chacun des réactifs de Griess I et II (composition en Annexe 1). En l'absence de cette coloration, quelques milligrammes de poudre de zinc sont ajoutés. La persistance de la couleur jaune indique une réaction positive (Elvi *et al.*, 2004).

La production d'azote gazeux est déterminée par l'apparition des bulles de gaz au moins à 1/10 de la cloche de Durham (Hayward 1956).

### 7.2.4. Production de sulfure d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{S}$ )

La production d' $\text{H}_2\text{S}$  est testée sur milieu MGM solide, additionné de 0,5 % (p/v) de thiosulfate de sodium ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ). Les souches sont ensemencées et incubées pendant 7 jours. Une réaction positive se traduit par l'apparition des colonies à centre noir (Elshahed *et al.*, 2004).

### 7.2.5. Production de l'indole

10 mL de bouillon MGM contenant 1 % (p/v) de tryptophane sont ensemencés puis incubés pendant 7 jours. La production d'indole est mise en évidence par l'apparition d'un anneau rouge après addition de quelques gouttes du réactif de Kovacs (diméthyl-amino-4-benzaldéhyde) (Ozcan *et al.*, 2006).

### 7.2.6. Croissance en anaérobiose sur la L-arginine

Ce test est réalisé selon le protocole décrit par Oren et Litchfield (1999). Des tubes à essai de 20 mL sont complètement remplis de bouillon MGM additionné de 5 g.L<sup>-1</sup> de L-arginine, puis inoculés par 0,1 mL de culture en phase de croissance exponentielle. Des tubes témoins sans L-arginine sont parallèlement préparés et ensemencés. Après 10 jours d'incubation à l'obscurité et à  $T^{\circ}_{\text{opt}}$ , la turbidité des cultures est mesurée à 600 nm et comparée à celle des tubes témoins. Les réactions sont considérées comme positives lorsque la turbidité de la culture contenant le L-arginine dépassait 0,05 et était au moins le double de celle du témoin.

### 7.2.7. Production d'acides à partir de substrats carbonés

La production d'acides à partir des sucres et d'alcools est testée sur des bouillons MGM non tamponnés, dépourvus de toute source organique, additionnés de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0,5 g.L<sup>-1</sup>), de

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $0,005 \text{ g.L}^{-1}$ ), du substrat-test ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ ) et de rouge de phénol ( $0,0003 \text{ g.L}^{-1}$ ). La production d'acide est appréciée par un virage de couleur au jaune après incubation (Oren *et al.*, 1997).

Les substrats utilisés sont : D(+)-glucose, D(+)-galactose, D(+)-fructose, D(+)-lactose, D(+)-saccharose, D(+)-maltose, D(+)-mannose, mannitol et glycérol.

### 7.3. Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires

La mise en évidence qualitative d'hydrolases extracellulaires est effectuée sur une gélose MGM, modifiée par réduction de la quantité de peptone et d'extraits de levure à 0,03% (p/v) et par addition du polymère-test à une concentration de 1 % (p/v ou v/v) (Oren *et al.*, 1997).

#### 7.3.1. Détermination de l'activité amylolytique

Ce test est réalisé par ensemencement des souches sur le milieu de culture solide modifié, additionné d'amidon soluble. Après 7 jours d'incubation à  $T_{\text{opt}}$ , les colonies sont inondées avec une solution de lugol (composition en Annexe 1). L'hydrolyse de l'amidon est détectée par apparition d'une zone claire autour de la colonie (Montalvo-Rodriguez *et al.*, 1998).

#### 7.3.2. Détermination de l'activité lipolytique

La présence d'estérases est examinée sur milieu de culture solide modifié, contenant le Tween 80. Les boîtes de Pétri ensemencées sont incubées pendant 7 jours à  $T_{\text{opt}}$ . L'apparition d'une auréole opaque autour des colonies indique la production d'estérases (Gutiérrez et Gonzalez, 1972).

#### 7.3.3. Détermination de l'activité protéolytique

##### ➤ Recherche de gélatinases

La recherche de gélatinases est effectuée par ensemencement des souches sur milieu de culture solide modifié supplémenté de gélatine, suivi d'une incubation pendant 7 jours à  $T_{\text{opt}}$ . L'hydrolyse de ce polymère est révélée en recouvrant la gélose par le réactif de Frazier (15 g d' $\text{HgCl}_2$ , 20 mL d'HCl concentrés et complétés à 100 mL avec de l'eau distillée). Le développement d'une zone claire autour des colonies témoigne la dégradation de la gélatine (Gutiérrez et Gonzalez, 1972).

### ➤ Recherche de caséinases

La présence de caséinases est détectée en observant la formation d'un halo clair autour des colonies développées après 7 jours d'incubation, sur milieu de culture solide modifié, contenant la caséine (Holding et Collee 1971).

### 7.4. Sensibilité aux antibiotiques

Cette étude est réalisée par la méthode de diffusion des disques d'antibiotiques sur milieu solide MGM préparé à la salinité optimale spécifique pour chaque souche. Les géloses sont ensemencées à l'aide d'un écouvillon par stries serrées en trois cadrons, à partir d'une suspension archéenne préparée dans une solution saline stérile à 23 % (p/v). Ensuite, les disques d'antibiotiques sont déposés à la surface des géloses, à l'aide d'une pince stérile. La souche est considérée sensible si la zone d'inhibition dépasse au moins 2 mm autour du disque après 10 jours d'incubation à  $T_{opt}$  (Montalvo-Rodriguez *et al.*, 1998). Les antibiotiques étudiés sont : la pénicilline G (1 IU), le chloramphénicol (10 µg), la vancomycine (5 µg), la gentamicine (10 µg), l'acide nalidixique (30 µg), l'érythromycine (2 µg), la cefoxitine (30 µg).

### 7.5. Construction de phénogramme

Un total de 97 caractères basés sur les tests phénotypiques réalisés est utilisé pour étudier les liens de parenté entre les souches. Cette étude est réalisée en construisant un phénogramme (dendrogramme) à l'aide du logiciel NTSYS-pc version 2.02i. Les caractères obtenus sont codifiés sous forme binaire : 1 pour « positif ou présent », 0 pour « négatif ou absent ».

Le degré de similitude entre souches est estimé en calculant le coefficient d'appariement simple (*simple matching coefficient*) (Sokal, 1958). La matrice de similarité (SM) est utilisée pour le regroupement des isolats par la méthode des groupes de paires non pondérés avec moyenne arithmétique ou UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) (Sneath et Sokal, 1973).

## 8. Caractérisation moléculaire des isolats

Les souches sélectionnées ont fait l'objet d'une caractérisation moléculaire basée sur l'amplification et l'analyse de la séquence du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S.

### 8.1. Extraction de l'ADN génomique

L'ADN génomique des isolats sélectionnés est extrait en utilisant le kit *GeneJET Genomic Purification* (Thermo Fisher Scientific) selon les instructions du fabricant. Ainsi,

4 mL d'une culture en phase exponentielle de croissance sont centrifugés à 5000 g pendant 10 min. Après avoir éliminé le surnageant, le culot archéen est resuspendu dans 180 µL d'une solution de digestion supplémentée par 20 µL de protéinase K. Le mélange est homogénéisé par vortex, puis incubé pendant 30 min à 56 °C dans un bain-marie à agitation. À la fin de cette étape, 20 µL d'une solution de RNase A sont ajoutés, puis la suspension est laissée 10 min à température ambiante.

Par la suite, 200 µL d'une solution de lyse et 400 µL d'éthanol à 50 % (v/v) sont ajoutés, puis la suspension est vortexée jusqu'à homogénéisation.

Le mélange est ensuite transvasé sur une colonne placée dans un microtube de 2 mL, puis est centrifugé à 6000 g pendant une minute. Après élimination de l'éluant, la colonne contenant l'ADN est replacée dans le microtube, et est soumise à deux cycles de lavage par deux tampons (500 µL du tampon 1 et 500 µL du tampon 2), chacun suivi d'une centrifugation de 3 min à 12000 g. Ces étapes de lavage tentent d'éliminer toute trace de résidus pour améliorer la qualité finale de l'ADN.

Ensuite, la colonne est placée dans un microtube de 1,5 mL et 200 µL du tampon d'éluion (10 mM Tris-HCl à pH 9,0 ; 0,1 mM EDTA) sont ajoutés au centre de la colonne, directement sur la membrane contenant l'ADN. Le microtube est laissé à température ambiante pendant 2 min puis est centrifugé à 8000 g pendant 1 min. La colonne est éliminée et l'ADN est alors récupéré dans le tampon d'éluion. L'ADN ainsi obtenu est conservé à -20 °C jusqu'à utilisation.

### **8.2. Contrôle de la pureté et détermination de la concentration de l'ADN en solution**

La pureté et la concentration de l'ADN sont mesurées automatiquement grâce à un spectrophotomètre modèle Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) sur 2 µL d'échantillon. La concentration des acides nucléiques est généralement déterminée par une mesure effectuée à 260 nm. L'interférence par des contaminants est évaluée par le calcul des rapports  $A_{260}/A_{280}$  et  $A_{260}/A_{230}$ . Un rapport  $A_{260}/A_{280}$  compris entre 1,8 et 2,0 signifie que l'acide nucléique est pur. Tandis qu'une faible valeur indique une contamination par des protéines et une valeur supérieure à 2,0 reflète une contamination par de l'ARN. Un rapport  $A_{260}/A_{230}$  compris entre 1,8 et 2,2 est également un indicateur de pureté, alors qu'une faible valeur est le signe d'une contamination par des substances telles que les glucides, les peptides, les phénols ou les composés aromatiques (Desjardins et Conklin, 2011).

### 8.3. Amplification des gènes de l'ARNr 16S par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est une technique de répllication *in vitro*. Elle permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN. Elle consiste à amplifier de façon spécifique une séquence d'ADN bornée par deux oligonucléotides ou amorces, sous l'action d'une ADN polymérase thermostable (Durand et Beaudeau, 2011).

Les gènes codant l'ARNr 16S des souches étudiées sont amplifiés par utilisation des amorces universelles : l'amorce sens ou *forward* 21F (TTCCGGTTGATCCTGCCGGA) spécifique aux archées et l'amorce anti-sens ou *reverse* 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) spécifique aux procaryotes (López-García *et al.*, 2002). La composition du mélange réactionnel pour PCR est montrée dans le tableau 7.

Les réactions d'amplification sont réalisées dans un thermocycleur Applied Biosystems modèle ProFlex, selon une optimisation du protocole décrit par Zafrilla *et al.* (2010).

Chaque programme d'amplification est initié par un cycle de dénaturation à 95 °C pendant 5 min, suivi de 35 cycles de 1 min de dénaturation à 95 °C, 1 min d'hybridation à 54 °C, 2 min d'élongation à 72 °C et achevé par un cycle d'élongation finale de 8 min à 72 °C.

**Tableau 7.** Composition du mélange réactionnel pour la PCR.

Composés	Concentration finale	Volume (µL)
ADN génomique	100-500 ng/µL	1
Tampon MyTaq Red (Bioline)	1X	5
DMSO (Bioline)	1% (p/v)	0,5
MyTaq polymérase (Bioline)	2,5 U	0,3
Amorce sens 21F	1 nM	1
Amorce anti-sens 1492R	1 nM	1
ddH <sub>2</sub> O		16,2
<b>Volume final</b>		<b>25</b>

DMSO : diméthylsulfoxyde, ddH<sub>2</sub>O : eau ultra pure.

### 8.4. Électrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR

Après la PCR, une électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % (p/v) est réalisée pour s'assurer de la qualité et de la spécificité de l'amplification. Cette technique consiste à faire migrer les fragments d'ADN grâce à un champ électrique généré par un courant continu pendant un certain temps. Les molécules d'ADN étant chargées négativement à pH neutre, migrent vers l'anode (+) et leur vitesse est inversement proportionnelle à leur taille.

#### ➤ Préparation du gel d'agarose

1 g d'agarose est mélangé à 100 mL de tampon TAE [Tris, Acétate, Éthylène Diamine Tétracétique (EDTA)] à 1X [dilué à partir d'une solution mère 50X (pH 8,0) composée de: 24,22 % (p/v) Tris-HCl ; 5,71 % (v/v) acétate ; 10 % (v/v) EDTA à 0,5 M]. Le mélange est chauffé jusqu'à ébullition, puis refroidi à 50°C environ, et est additionné de 0,5 µL du colorant d'ADN RedSafe (20,000X) (VWR) (Zafrilla *et al.*, 2010). La préparation est ensuite versée dans un support muni d'un peigne pour délimiter les puits de chargement.

#### ➤ Migration

Une fois solidifié, le gel est placé dans une cuve Mini-Sub CELL GT (Bio-Rad) remplie du tampon TAE à 1X. Par la suite, 5 µL de chaque produit d'amplification sont déposés dans chaque puits du gel. Pour suivre la migration d'ADN, 5 µL d'un marqueur de taille (Thermo Scientific *Gene Ruler 1 Kb Plus DNA Ladder* de 15 000 à 100 pb) sont introduits dans un puits séparé du même gel. La migration est faite sous une tension de 90 volts pendant 60 minutes (Zafrilla *et al.*, 2010).

#### ➤ Révélation des bandes d'ADN aux rayons UV

Afin de visualiser les bandes d'ADN, le gel est observé et photographié sous lumière ultraviolette grâce à un système numérisé d'imagerie Kodak modèle Gel Logic 2200. Les fragments d'ADN sont visibles grâce à l'émission de fluorescence du colorant RedSafe liée aux acides nucléiques.

### 8.5. Séquençage des produits PCR

Les amplicons du gène de l'ARNr 16S des souches sélectionnées sont séquencés selon une modification de la méthode de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) en utilisant les amorces 21F et 1432R.

C'est une méthode de synthèse enzymatique du brin complémentaire de l'ADN dont on cherche à déterminer la séquence à l'aide d'une ADN polymérase, d'oligonucléotides non marqués et de didésoxyribonucléotides fluorescents (ddNTP). Ces derniers agissent comme

des terminateurs de chaîne, leur incorporation dans la chaîne de l'ADN entraîne l'arrêt de l'élongation. On obtient alors des fragments d'ADN de tailles différentes selon la position où la polymérisation a été interrompue, et dont le dernier nucléotide est fluorescent. Il s'en suit une migration par électrophorèse, puis une lecture en fluorescence du gel afin de détecter les fragments fluorescents (Lamoril *et al.*, 2008).

Le séquençage a été effectué au niveau du laboratoire STAB VIDA (Lisbonne, Portugal). Les réactions ont été réalisées à l'aide du kit Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) en utilisant les mêmes amorces citées précédemment, sur un séquenceur multicapillaire modèle 3130XL (Applied Biosystems).

### 8.6. Analyses des séquences du gène de l'ARNr 16S

Les séquences consensus du gène de l'ARNr 16S obtenues avec les deux amorces (directe et reverse) sont comparées avec les séquences homologues contenues dans les banques de séquences nucléiques de *The International Nucleotide Sequence Database Collaboration* (INSDC) [Genbank/ENA (*European Nucleotide Archive*)/ DDBJ (*DNA Database of Japan*)] version 09-2020 en utilisant l'outil nucléotide BLAST version 2.10.0 (*Basic Local Alignment Search Tool* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)) (Camacho *et al.*, 2009). Les résultats obtenus sont confirmés par un alignement avec la banque EzBioCloud version 05-2020 (<https://www.ezbiocloud.net/identify>) à l'aide de l'outil BLAST (Yoon *et al.*, 2017). Les résultats sont exprimés en pourcentage de similarité de la souche à identifier avec les espèces les plus proches.

### 8.7. Analyse phylogénétique

Les liens phylogénétiques entre les isolats de l'étude et les souches décrites les plus proches sont étudiés en se basant sur les séquences des gènes de l'ARNr 16S.

L'alignement multiple des séquences nucléiques est réalisé en utilisant l'outil ClustalW implanté dans le logiciel MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) version 7 (Thompson *et al.*, 2003 ; Kumar *et al.*, 2016b).

L'arbre phylogénétique est construit grâce au logiciel MEGA, en se basant sur la méthode du *Neighbor-Joining* (Saitou et Nei, 1986) et le modèle de maximum de vraisemblance composite prenant en compte les transitions et les transversions, et éliminant les insertions-délétions de l'alignement multiple (Tamura *et al.*, 2004). Afin de confirmer le résultat obtenu avec cette méthode, un deuxième arbre a été construit avec la méthode du maximum de vraisemblance (*Maximum Likelihood*) (Goldman, 1990). L'alignement multiple des séquences est effectué avec l'outil MUSCLE (Edgar, 2004) du logiciel MEGA.

La robustesse des deux arbres est estimée avec le test *Bootstrap* impliquant 1000 répliques (Felsenstein, 1985). La séquence du gène de l'ARNr 16S de la souche type *Methanospirillum hungatei* JF-1<sup>T</sup> a été utilisée comme groupe externe pour la construction des arbres.

### 8.8. Numéros d'accèsion des séquences nucléiques

Les séquences du gène de l'ARNr 16S obtenues lors de cette étude ont été déposées dans la banque Genbank sous les numéros d'accèsion MN134037 à MN134073 ; et MN241524 à MN241530.

## 9. Caractérisation des caroténoïdes

Les souches présentant les taux de production de caroténoïdes les plus élevés parmi les différents groupes taxonomiques, ont été sélectionnées pour la caractérisation de leurs caroténoïdes.

### 9.1. Production des caroténoïdes

La production des caroténoïdes par les souches sélectionnées est réalisée sur milieu MGM liquide à concentration saline optimale spécifique pour chaque souche.

Pour la préparation des précultures, 3 à 4 colonies de chaque souche sont ensemencées dans 50 mL du bouillon MGM et incubées pendant 7 jours à  $T_{opt}$ . Les précultures sont ensuite transférées dans des Erlenmeyers de 2000 mL contenant 500 mL du milieu de culture liquide. Les cultures ainsi préparées sont incubées pendant 10 jours à  $T_{opt}$  dans un shaker à agitation orbitale VWR modèle Professional 3500 à 180 tpm (Squillaci *et al.*, 2017).

À l'issue de l'incubation, les cultures sont centrifugées à 22 000 g pendant 30 minutes à 4 °C dans une centrifugeuse Sigma modèle 2-16KL. Après élimination des surnageants, les culots sont soumis à 5 cycles de congélation à l'azote liquide durant 1 minute suivie d'une étape de décongélation en bain à 50 °C pendant 1 minute, pour faciliter l'extraction. Par la suite, les culots sont repris dans 10 mL de méthanol pur, homogénéisés puis centrifugés à 10 000 g pendant 10 minutes à 4 °C. Les surnageants sont récupérés et les culots sont remis en suspension dans 10 mL de méthanol puis centrifugés dans les mêmes conditions. Cette étape est répétée plusieurs fois jusqu'à la décoloration totale des culots. (Naziri *et al.*, 2014 ; De la Vega *et al.*, 2016).

Les surnageants méthanoliques récoltés sont concentrés à l'aide d'un évaporateur rotatif Büchi modèle R-100 (Yachai, 2009).

Les extraits de caroténoïdes sont stockés à -20 °C, à l'obscurité dans des flacons en verre brun jusqu'à utilisation (Machmudah et Goto, 2013).

### 9.2. Analyse des caroténoïdes extraits par chromatographie liquide haute performance avec détecteur à barrette de diodes (HPLC/DAD)

Des aliquotes des extraits caroténoïdiques concentrés sont dilués dans 1 mL du méthanol pur contenant 1 % (p/v) BHT (Hydroxytoluène Butylé). Ces aliquotes sont ensuite centrifugées pendant 1 min à 10 000 g puis filtrées avec un filtre seringue de porosité 0,45 µm (Thermo Scientific), afin d'éliminer les éventuels débris cellulaires.

L'analyse est effectuée à l'aide du système HPLC ELITE LaChrom (Merck Hitachi) équipé d'une pompe (L-7100) et d'un détecteur d'absorbance à barrette de diodes (L-2455). La séparation des caroténoïdes est réalisée sur une colonne phase inverse C18 Luna (Phenomenex), de dimensions (Longueur 250 mm × Largeur 4,6 mm), et d'un diamètre des sphères de 5 µm.

Pour la phase mobile, deux solvants sont utilisés ; solvant A : acétate d'éthyle et solvant B : acétonitrile/eau (9:1, v/v), répartis selon le gradient d'élution suivant : 0-16 min/0-60 % A ; 16-30 min/60 % A ; 30-35 min/100 % B. Le débit est fixé à 1 mL/min. Le volume d'injection était de 100 µL à 25 °C. La détection est effectuée à 450 nm pour une variation de longueurs d'onde de 220 à 600 nm (Vila *et al.*, 2008)

Le système est géré par le logiciel EZChrom Elite version 3.1 qui permet d'obtenir les chromatogrammes et fournit également les spectres d'absorption correspondants à chaque pic (spectre UV-visible). Ces derniers sont utilisés par la suite pour l'identification des caroténoïdes en les comparant avec ceux rapportés dans la littérature.

### 9.3. Analyse des caroténoïdes par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS)

Les extraits des caroténoïdes ont fait l'objet d'une chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse afin de déterminer la masse moléculaire des composants et de confirmer leur identité (Naziri *et al.*, 2014).

Ainsi, 20 µL de chaque échantillon caroténoïdique sont analysés sur un système LC-MSD-Trap-SL Agilent Séries 1100. La séparation chromatographique est réalisée sur une colonne Zorbax SB-C18 (Longueur 250 mm × Largeur 4,6 mm, Diamètre 5 µm). La phase mobile est composée des solvants A : acétonitrile/eau (9:1, v/v) et B : acétate d'éthyle, répartis selon le gradient présenté dans le tableau 8.

Le spectromètre de masse est calibré en mode d'ionisation positive avec une gamme de balayage de m/z allant de 300 à 900 Th et un voltage de 4000 volts. Le débit du gaz de séchage et la température d'interface sont maintenus à 10 L/min et 350 °C, respectivement.

**Tableau 8.** Gradient d'élution utilisé pour la séparation chromatographie liquide haute performance/spectrométrie de masse.

<b>Temps (min)</b>	<b>Débit (mL/min)</b>	<b>Solvant A %</b>	<b>Solvant B %</b>
<b>0</b>	0,5	90	10
<b>9</b>	0,5	90	10
<b>17</b>	0,5	40	60
<b>18</b>	0,5	0	100
<b>20</b>	0,5	0	100
<b>22</b>	0,5	90	10
<b>25</b>	0,5	90	10

#### **9.4. Détermination du pouvoir antioxydant des caroténoïdes**

Les caroténoïdes extraits ont été soumis à une évaluation de leur pouvoir antioxydant en utilisant deux tests : le test de piégeage du radical libre DPPH• (2,2-diphényl-1-picryl hydrazyl) et celui du piégeage du radical cationique ABTS•<sup>+</sup> (2,2'-Azinobis-(3 ethylbenzothiazole-6-sulphonate).

##### **9.4.1. Test DPPH**

Le DPPH• est un radical libre qui possède un électron célibataire sur l'atome d'azote, il est caractérisé par une couleur violette et un pic d'absorbance spectral maximal à 517 nm. En présence d'antioxydants, le radical DPPH• est réduit à la forme d'hydrazine (non radical) en acceptant un atome d'hydrogène. La réduction s'accompagne par le passage de la solution d'une couleur violette à une couleur jaune. Cette décoloration est représentative de la capacité d'un composant à piéger ces radicaux libres, elle est suivie par spectrophotométrie UV-visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm (Dong-Sun Lee *et al.*, 2001).

Ce test est effectué selon le protocole décrit par Hou et Cui (2017). Avant le test, l'absorbance des extraits au cours de la réaction est suivie cinétiquement à différentes concentrations afin de déterminer le temps d'incubation et la concentration optimaux pour chaque échantillon.

Un volume de 25 µL de concentrations allant de 3 à 320 µg/mL de chaque extrait caroténoïdique ou d'antioxydant de référence (acide ascorbique) est ajouté à 1 mL de la solution méthanolique du DPPH (100 µM) fraîchement préparée. Après homogénéisation, le mélange est laissé pendant 5 minutes à l'obscurité à température ambiante, puis l'absorbance est mesurée à 517 nm par un spectrophotomètre Ultrospec 3100 pro. Un contrôle négatif est préparé en parallèle, en mélangeant 25 µL du méthanol pur avec 1 mL de la solution

méthanolique de DPPH. Un contrôle de couleur est également préparé en ajoutant 25 µL de chaque échantillon à 1 mL du méthanol. Tous les essais sont répétés 3 fois.

Le pourcentage d'inhibition des radicaux libres DPPH• (I %) est calculé selon la formule suivante (Mukherjee *et al.*, 2017) :

$$I \% = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$$

A<sub>C</sub>: valeur de l'absorbance du contrôle négatif à 517 nm ;

A<sub>E</sub> : valeur de l'absorbance de l'échantillon à 517 nm.

La concentration efficace médiane ou EC50 est défini comme étant la concentration du substrat qui peut réduire 50 % de DPPH. Les EC50 des échantillons sont déterminées graphiquement à partir des courbes de la variation du pourcentage d'inhibition I % en fonction de la concentration de chaque extrait, à l'aide du logiciel Graphpad Prism version 8.4.3 (Barros *et al.*, 2007 ; Chen *et al.*, 2013).

### 9.4.2. Test ABTS

Ce test est basé sur la mesure de la capacité des antioxydants à réduire le radical cationique ABTS<sup>•+</sup>. Ce radical de couleur verte bleue est généré par oxydation de la molécule stable d'ABTS avec un sel fort tel que le persulfate de potassium (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>). L'ajout d'un antioxydant réduit ce radical et provoque la disparition de la coloration vert bleu intense. Cette décoloration est suivie par mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 734 nm (Re *et al.*, 1999).

Ce test est effectué en se basant sur le protocole décrit par Thaipong *et al.* (2006).

Les tests préliminaires sont les mêmes que ceux décrits dans le cas du test DPPH.

La solution d'ABTS<sup>•+</sup> est préparée en mélangeant à volume égal une solution méthanolique d'ABTS à 7 mM, et une solution méthanolique de persulfate de potassium à 2,45 mM. Le mélange est maintenu dans l'obscurité à température ambiante pendant 12 à 16 heures. La solution ainsi obtenue est diluée avec du méthanol pur de façon à obtenir une absorbance d'environ 1 à 734 nm. 25 µL de chaque échantillon à des concentrations allant de 3 à 320 µg/mL (ou de méthanol pour le contrôle négatif), sont mélangés avec 1 mL de la solution d'ABTS<sup>•+</sup>. Après 5 minutes à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 734 nm.

Le même procédé est réalisé pour l'acide ascorbique utilisé comme antioxydant standard. Le contrôle de couleur est préparé en mélangeant 25 µL de chaque échantillon avec 1 mL du méthanol. Tous les essais sont répétés 3 fois.

Le pourcentage d'inhibition des radicaux ABTS<sup>•+</sup> (I %) est calculé selon la même formule utilisée précédemment.

Les EC50 sont déterminées graphiquement à partir des courbes de la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de chaque échantillon, à l'aide du logiciel Graphpad Prism version 8.4.3 (Chen *et al.*, 2013).

### 9.5. Détermination du pouvoir antibactérien des caroténoïdes

L'activité antibactérienne des extraits de caroténoïdes est évaluée en utilisant la méthode de diffusion par disque décrite par Suresh *et al.* (2015). C'est une technique qualitative permettant de déterminer la sensibilité des souches tests vis-à-vis d'une substance à tester. Elle consiste à déposer des disques stériles, imprégnés d'extraits caroténoïdiques, à la surface d'un milieu de culture solide préalablement ensemencé d'un inoculum bactérien. Après incubation, le développement d'une zone d'inhibition de la croissance des germes autour des disques traduit l'activité antibactérienne des caroténoïdes.

#### 9.5.1. Souches bactériennes testées

Afin de donner une vision large sur l'étendue du champ d'activité antibactérienne de nos extraits caroténoïdique, une variété de bactéries a été sélectionnée dont quatre pathogènes pour l'être humain et quatre pathogènes pour les poissons.

Les bactéries pathogènes pour l'être humain nous ont été fournies par le laboratoire de Microbiologie de l'Établissement Public Hospitalier Hafid Boudjemaa, Constantine. Il s'agit de : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. Quant aux bactéries pathogènes pour les poissons, elles nous ont été fournies par l'institut Andalou de Recherche Agricole (Séville, Espagne). Il s'agit de *Pseudomonas anguilliseptica* CECT 899, *Aeromonas salmonicida* CECT 894, *Vibrio anguillarum* CECT 522 et *Photobacterium damsela* CECT 626 (Fiches techniques des souches en Annexe 1-B).

#### 9.5.2. Préparation des suspensions bactériennes et ensemencement

Les souches tests sont repiquées sur milieu gélosé adéquat, à savoir le milieu Mueller Hinton pour les bactéries pathogènes humaines, et le milieu Marine agar pour les bactéries pathogènes pour les poissons (compositions en annexe 1-A). Après 18 heures d'incubation, des suspensions bactériennes sont préparées dans l'eau physiologique stérile, puis ajustées à une turbidité équivalente au standard 0,5 MacFarland ( $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>). Ces suspensions sont

ensuiteensemencées par écouvillonnage à la surface du milieu de culture solide approprié à chaque souche.

Des disques de papier Wattman N° 3 de diamètre 6 mm sont stérilisés, déposés à la surface des boîtesensemencées puis chargés par 10 µL de l'échantillon à tester, à une concentration de 100 µg/mL. Des disques imprégnés du méthanol pur sont utilisés comme contrôle négatif, la gentamicine (10 µg) et la dicentracine (50 µg) (peptide antimicrobien) ont servi de contrôle positif.

Les boîtes de Pétri ainsi préparées sont maintenues à 4 °C pendant 1 heure afin de permettre aux échantillons de diffuser dans la gélose, puis incubées pendant 24 heures à 37 °C pour les bactéries pathogènes humaines et à 30 °C pour les souches pathogènes pour les poissons. Tous les tests sont effectués en triple.

Après incubation, les diamètres des zones d'inhibition produites autour des disques sont mesurés et exprimés en mm (Suresh *et al.*, 2015).

### **10. Étude de l'effet de quelques paramètres physico-chimiques sur la croissance et la production de caroténoïdes par la souche la plus productrice**

Dans le but d'étudier l'influence des conditions de fermentation sur la croissance et la production des caroténoïdes par la souche la plus productrice, nous avons sélectionné quelques paramètres qui sont, selon la littérature, parmi les plus influents (Calegari-Santos *et al.*, 2016). Les taux de croissance et de production des caroténoïdes par la souche sélectionnée ont été estimés à différentes valeurs de salinité, d'agitation, de température et d'intensité lumineuse en variant à chaque fois un seul paramètre et en maintenant les autres constants.

Pour ce faire, une préculture de la souche étudiée est préparée comme décrit dans la section 9.1 puis 10 mL de cette préculture est transféré dans une fiole Erlenmeyer de 500 mL contenant 100 mL du milieu MGM. Les cultures ainsi préparées sont incubées pendant 7 jours et des échantillons sont prélevés à différents intervalles de temps. Le taux de croissance est estimé par mesure de l'absorbance à 600 nm, le taux de production des caroténoïdes est déterminé selon le protocole décrit dans la section 6.2.

Les différentes combinaisons de valeurs des paramètres testés (salinité, vitesse d'agitation, température, et intensité lumineuse) utilisées sont représentées dans le tableau 9. Le choix de ces valeurs est basé sur le travail réalisé par De la Vega *et al.* (2016).

**Tableau 9.** Valeurs de salinité, d'agitation, de température, et d'intensité lumineuse utilisées pour la détermination des taux de croissance et de production des caroténoïdes.

Essai Paramètre	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<b>Salinité (% ,p/v)</b>	15	20	25	30	25				25			25		
<b>Agitation (tpm)</b>	100				0	100	200	300	300			300		
<b>Température (°C)</b>	37				37				30	37	42	37		
<b>Intensité lumineuse (μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>)</b>	0				0				0			0	100	260

p/v : poids/volume, tpm : tour par minute, μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> : microeinstein par mètre carré et seconde.

### 11. Analyse statistique

Le test de l'analyse de la variance ANOVA à un facteur a été utilisé pour comparer les résultats de la détermination du pouvoir antioxydant et antibactérien des caroténoïdes ainsi que les résultats de la détermination de la croissance et de la production de caroténoïdes par la souche sélectionnée, sous différentes conditions physico-chimiques. Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de  $p < 0,05$ . L'analyse statistique est réalisée avec le logiciel XLSTAT version 2009.1.01.

**RÉSULTATS**  
**ET**  
**DISCUSSION**

Les principaux objectifs visés dans ce travail étaient d'isoler des souches d'*Archaea* halophiles extrêmes à partir d'environnements hypersalins algériens, d'évaluer leur potentiel de production de pigments et de caractériser les pigments produits par une sélection de ces souches.

Pour atteindre ces objectifs, des souches archéennes ont été isolées et purifiées à partir d'échantillons de saumure et de sel puis sélectionnées selon leurs caractères physiologiques et leur potentiel à produire des pigments. Les souches retenues ont été identifiées par une approche polyphasique en combinant une caractérisation phénotypique et moléculaire. Ensuite, les pigments produits par des souches de la sélection ont été caractérisés par méthodes chromatographiques puis soumis à une évaluation de leur pouvoir antioxydant et antibactérien. Enfin, la souche ayant le taux de production de caroténoïdes le plus élevé et présentant des activités biologiques intéressantes, a été sélectionnée pour étudier l'effet de la variation de certaines conditions physico-chimiques de culture sur sa croissance et sa production de caroténoïdes.

### 1. Caractérisation physico-chimique des échantillons

Dix-neuf échantillons de saumure et de sel ont été collectés à partir de sept environnements hypersalins incluant quatre sebkhas, deux chotts et une saline, situés dans différentes zones géographiques. Ces échantillons ont fait l'objet d'une caractérisation physico-chimique, les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 10.

La température de l'air des sites visités variait entre 19 et 25 °C, et celle des saumures entre 17 et 22 °C. La valeur la plus élevée a été enregistrée à Ezzemoul. Ces basses températures sont expliquées par le fait que les échantillonnages ont été effectués en automne et en hiver.

La température d'un lac salé est un facteur important conditionnant la prolifération des microorganismes, elle joue un rôle majeur dans la solubilité des sels et des gaz notamment l'oxygène et dans la détermination du pH. Elle est fortement liée aux conditions locales telles que la saison, le climat régional, la topographie, la durée de l'ensoleillement et la profondeur du lac (Khallef, 2019).

Les valeurs de pH des échantillons varient d'un site à un autre et peuvent être considérées selon Nollet et De Gelder (2000) comme neutres à alcalines. Chott Frain, la saline d'Ain Oulmene et la sebkha de Sidi Bouziane ont révélé un pH relativement alcalin allant de 7,64 à 8,40. Des valeurs proches ont été enregistrées à chott Ain El Beida et à la sebkha d'El Goléa en Algérie (Boutaiba *et al.*, 2011 ; Khallef, 2019), au niveau du chott El Djerid en Tunisie

Tableau 10. Résultats de l'analyse physico-chimique des échantillons.

Sites	Point de prélèvement	Nature de l'échantillon	pH	T (°C)*	H (%)	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Cl <sup>-</sup>	Na <sup>+</sup>	CaSO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	NaCl	CaCl <sub>2</sub>	MgCl <sub>2</sub>	Sal
<b>Ezzemoul</b>	<b>EZE1</b>	Saumure	6,88 ± 0,40	22	ND	Traces	14,22	21,64	155,31	100,48	0,00	27,12	0,00	255,80	0,00	34,27	317,20
	<b>EZE2</b>	Sel	7,29 ± 0,04	ND	15,42	0,51	6,49	13,46	ND	ND	1,74	15,34	0,00	969,59	0,00	13,29	999,96
	<b>EZE3</b>	Saumure	6,88 ± 0,36	22	ND	Traces	11,69	19,91	160,63	103,88	0,00	24,29	0,00	264,57	0,00	26,07	315,60
	<b>EZE4</b>	Sel	7,07 ± 0,01	ND	12,15	0,33	4,94	8,82	ND	ND	1,11	10,08	0,00	977,38	0,00	11,37	999,94
	<b>EZE5</b>	Saumure	7,33 ± 0,01	21	ND	0,52	14,54	13,00	167,63	108,52	1,76	14,73	0,00	276,26	0,00	45,33	317,20
	<b>EZE6</b>	Sel	7,23 ± 0,12	ND	10,61	0,70	3,38	8,48	ND	ND	2,38	8,53	0,00	982,55	0,00	6,50	999,96
<b>Bazer sakra</b>	<b>BSE1</b>	Saumure	7,25± 0,03	19	ND	0,26	13,12	26,58	176,61	114,26	0,88	32,53	0,00	290,88	0,00	25,65	349,95
	<b>BSE2</b>	Saumure	7,22 ± 0,07	19	ND	0,26	13,11	26,45	176,58	114,25	0,75	32,10	0,00	290,83	0,00	25,21	348,90
<b>Frain</b>	<b>FE</b>	Sel	8,40 ± 0,03	ND	13,92	3,96	3,31	16,48	ND	ND	13,46	8,75	0,00	970,98	0,00	6,06	999,25
<b>Melghir</b>	<b>MEE1</b>	Saumure	7,01 ± 0,02	19	ND	Traces	29,97	37,28	185,93	120,44	0,00	46,72	0,00	306,37	0,00	80,46	433,56
	<b>MEE2</b>	Sel	7,53 ± 0,03	ND	10,07	0,82	6,04	9,40	ND	ND	2,78	9,32	0,00	970,48	0,00	16,29	999,88
	<b>MEE3</b>	Saumure	7,30 ± 0,01	21	ND	0,26	6,48	11,02	178,38	115,41	0,88	13,03	0,00	293,80	0,00	15,07	322,80
<b>Ain Oulmene</b>	<b>AWE1</b>	Saumure	7,61 ± 0,02	19	ND	3,50	19,15	44,19	182,82	118,25	11,90	44,86	0,00	301,11	0,00	39,53	397,41
	<b>AWE2</b>	Saumure	7,60 ± 0,02	20	ND	1,50	17,63	47,07	177,50	114,83	5,10	54,48	0,00	292,34	0,00	25,94	377,88
	<b>AWE3</b>	Sel	8,12 ± 0,04	ND	0,27	1,36	0,55	4,09	ND	ND	4,58	1,07	0,00	991,08	0,00	1,29	999,80
	<b>AWE4</b>	Saumure	7,54 ± 0,09	19	ND	3,00	20,67	47,58	177,50	144,54	10,20	50,61	0,00	292,34	0,00	40,93	394,09
	<b>AWE5</b>	Sel	8,39 ± 0,05	ND	25,99	0,00	4,87	3,73	ND	ND	0,00	4,67	0,00	979,80	0,00	15,38	999,85
<b>Bethioua</b>	<b>BTE</b>	Saumure	7,42 ± 0,02	17	ND	2,60	13,59	3,37	183,71	118,86	4,78	0,00	0,00	302,57	3,31	53,28	303,95
<b>Sidi Bouziane</b>	<b>SBE</b>	Sel	7,61± 0,03	ND	2,19	4,85	3,62	10,40	ND	ND	14,74	0,00	0,00	968,87	0,01	14,18	997,80

La concentration en ions et la salinité sont représentées en g/L pour les échantillons de saumures et en g/kg pour les échantillons de sel, T\* : température des saumures au prélèvement, H : humidité, Sal : salinité, ND : non déterminé.

(Hedi *et al.*, 2009), à la saline d'Ayvalik en Turquie (Elevi *et al.*, 2004), et à la saline de Rambla Salada en Espagne (Luque *et al.*, 2006).

Le pH des autres sites était neutre à légèrement alcalin (pH 6,82 à 7,53), donc proche de ceux de chott Merouane et du lac salé Sidi Ameer en Algérie (Boutaiba *et al.*, 2011), ainsi que celui du Grand Lac Salé Utah aux États-Unis d'Amérique (Oren, 2011a).

Cette différence de pH entre les lacs hypersalins est traduite par la nature des terrains traversés par les eaux avant d'arriver au lac. En effet, les eaux provenant des terrains pauvres en calcaire ou siliceux ont un pH avoisinant 7, alors que celles provenant des terrains riches en calcaires ont un pH plus élevé. L'augmentation du pH peut aussi découler d'une hausse de la température, ceci s'explique par l'augmentation des concentrations des carbonates et des bicarbonates sous l'effet des fortes évaporations (Koull *et al.*, 2016).

Concernant la salinité totale, on remarque que tous les échantillons se caractérisent par leur haut niveau de salinité, répondant parfaitement aux exigences de la croissance des *Archaea* halophiles extrêmes. La salinité des saumures varie entre 31,5 à 43,3 % (p/v). La valeur la plus élevée est celle du chott Melghir caractérisé par un climat chaud et aride, alors que celle de la sebkha de Bethioua est la plus faible. La variation des concentrations en sels entre certains échantillons provenant du même site pourrait être expliquée par la différence entre les profondeurs des points de prélèvement. En effet, les sels ne précipitent pas tous en même temps, l'ordre de leur apparition est directement lié au taux d'évaporation. À de faibles profondeurs, l'évaporation est forte ce qui conduit à la précipitation du NaCl (halite) et du KCl (sylvite). Alors qu'à des profondeurs plus élevées, l'évaporation est faible, et dans ce cas c'est le CaCO<sub>3</sub> (calcite) et le CaSO<sub>4</sub> (gypse) qui précipitent (Oren, 2011a ; Warren, 2006 ; Gornitz, 2008).

D'après Gonzalo *et al.* (2006), la saison, les conditions climatiques, le contexte hydrologique (précipitations, ruissèlements de surface, apport d'eaux souterraines) et l'évaporation sont les principaux facteurs qui déterminent la teneur en sels des saumures. Quant à la salinité des échantillons de sels, elle était nettement plus élevée que celle des saumures avec une valeur de 99 % (v/v) pour tous les échantillons.

L'analyse chimique des échantillons a révélé la dominance des ions sodium (Na<sup>+</sup>) et chlorure (Cl<sup>-</sup>) avec une concentration en ions chlorure dépassant celle des ions sodium. Les ions magnésium (Mg<sup>2+</sup>) et sulfate (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) sont moins abondants et de très faibles concentrations en ions calcium (Ca<sup>2+</sup>) sont détectées.

Tableau 11. Répartition des isolats selon leur provenance (site et échantillon).

Code isolat	Site	Point de prélèvement	Échantillon	Code isolat	Site	Point de prélèvement	Échantillon	Code isolat	Site	Point de prélèvement	Échantillon
<b>EZ1</b>	Ezzemoul	EZE1	Saumure	<b>EZ39</b>	Ezzemoul	EZE6	Saumure	<b>ME19</b>	Melghir	MEE3	Sel
<b>EZ2</b>	Ezzemoul	EZE1	Saumure	<b>BS1</b>	Bazer Sakra	BSE1	Saumure	<b>ME20</b>	Melghir	MEE3	Sel
<b>EZ3</b>	Ezzemoul	EZE1	Saumure	<b>BS2</b>	Bazer Sakra	BSE1	Saumure	<b>ME21</b>	Melghir	MEE3	Sel
<b>EZ4</b>	Ezzemoul	EZE1	Saumure	<b>BS3</b>	Bazer Sakra	BSE1	Saumure	<b>ME22</b>	Melghir	MEE3	Saumure
<b>EZ5</b>	Ezzemoul	EZE1	Saumure	<b>BS4</b>	Bazer Sakra	BSE1	Saumure	<b>F1</b>	Frain	FE	Sel
<b>EZ6</b>	Ezzemoul	EZE1	Sel	<b>BS5</b>	Bazer Sakra	BSE2	Saumure	<b>F2</b>	Frain	FE	Sel
<b>EZ7</b>	Ezzemoul	EZE1	Sel	<b>BS6</b>	Bazer Sakra	BSE2	Saumure	<b>F3</b>	Frain	FE	Sel
<b>EZ8</b>	Ezzemoul	EZE1	Sel	<b>BS7</b>	Bazer Sakra	BSE2	Saumure	<b>F4</b>	Frain	FE	Sel
<b>EZ9</b>	Ezzemoul	EZE2	Saumure	<b>BS8</b>	Bazer Sakra	BSE2	Saumure	<b>F5</b>	Frain	FE	Sel
<b>EZ10</b>	Ezzemoul	EZE2	Saumure	<b>BT1</b>	Bethioua	BTE	Saumure	<b>AW1</b>	Ain Oulmene	AWE1	Saumure
<b>EZ11</b>	Ezzemoul	EZE2	Saumure	<b>BT2</b>	Bethioua	BTE	Saumure	<b>AW2</b>	Ain Oulmene	AWE1	Saumure
<b>EZ12</b>	Ezzemoul	EZE2	Saumure	<b>BT2</b>	Bethioua	BTE	Saumure	<b>AW3</b>	Ain Oulmene	AWE1	Saumure
<b>EZ13</b>	Ezzemoul	EZE2	Saumure	<b>BT3</b>	Bethioua	BTE	Saumure	<b>AW4</b>	Ain Oulmene	AWE1	Saumure
<b>EZ14</b>	Ezzemoul	EZE2	Saumure	<b>BT4</b>	Bethioua	BTE	Saumure	<b>AW5</b>	Ain Oulmene	AWE1	Saumure
<b>EZ15</b>	Ezzemoul	EZE2	Saumure	<b>BT5</b>	Bethioua	BTE	Saumure	<b>AW6</b>	Ain Oulmene	AWE2	Sel
<b>EZ16</b>	Ezzemoul	EZE2	Saumure	<b>BT6</b>	Bethioua	BTE	Saumure	<b>AW7</b>	Ain Oulmene	AWE2	Sel
<b>EZ17</b>	Ezzemoul	EZE2	Sel	<b>BT7</b>	Bethioua	BTE	Saumure	<b>AW8</b>	Ain Oulmene	AWE2	Sel
<b>EZ18</b>	Ezzemoul	EZE2	Sel	<b>BT8</b>	Bethioua	BTE	Saumure	<b>AW9</b>	Ain Oulmene	AWE2	Sel
<b>EZ19</b>	Ezzemoul	EZE2	Sel	<b>BT9</b>	Bethioua	BTE	Saumure	<b>AW10</b>	Ain Oulmene	AWE3	Sel
<b>EZ20</b>	Ezzemoul	EZE2	Sel	<b>BT10</b>	Bethioua	BTE	Saumure	<b>AW11</b>	Ain Oulmene	AWE3	Sel
<b>EZ21</b>	Ezzemoul	EZE2	Sel	<b>ME1</b>	Melghir	MEE1	Saumure	<b>AW12</b>	Ain Oulmene	AWE3	Sel
<b>EZ22</b>	Ezzemoul	EZE3	Saumure	<b>ME2</b>	Melghir	MEE1	Saumure	<b>AW13</b>	Ain Oulmene	AWE3	Sel
<b>EZ23</b>	Ezzemoul	EZE3	Saumure	<b>ME3</b>	Melghir	MEE1	Saumure	<b>AW14</b>	Ain Oulmene	AWE4	Saumure
<b>EZ24</b>	Ezzemoul	EZE3	Saumure	<b>ME4</b>	Melghir	MEE1	Saumure	<b>AW15</b>	Ain Oulmene	AWE4	Saumure
<b>EZ25</b>	Ezzemoul	EZE3	Saumure	<b>ME5</b>	Melghir	MEE1	Saumure	<b>AW16</b>	Ain Oulmene	AWE4	Saumure
<b>EZ26</b>	Ezzemoul	EZE3	Saumure	<b>ME6</b>	Melghir	MEE1	Saumure	<b>AW17</b>	Ain Oulmene	AWE4	Saumure
<b>EZ27</b>	Ezzemoul	EZE3	Sel	<b>ME7</b>	Melghir	MEE1	Saumure	<b>AW18</b>	Ain Oulmene	AWE4	Saumure
<b>EZ28</b>	Ezzemoul	EZE3	Sel	<b>ME8</b>	Melghir	MEE2	Sel	<b>AW19</b>	Ain Oulmene	AWE5	Saumure
<b>EZ29</b>	Ezzemoul	EZE4	Saumure	<b>ME9</b>	Melghir	MEE2	Sel	<b>AW20</b>	Ain Oulmene	AWE5	Saumure
<b>EZ30</b>	Ezzemoul	EZE4	Saumure	<b>ME10</b>	Melghir	MEE2	Sel	<b>AW21</b>	Ain Oulmene	AWE5	Saumure
<b>EZ31</b>	Ezzemoul	EZE4	Saumure	<b>ME11</b>	Melghir	MEE2	Sel	<b>AW22</b>	Ain Oulmene	AWE5	Saumure
<b>EZ32</b>	Ezzemoul	EZE5	Sel	<b>ME12</b>	Melghir	MEE2	Sel	<b>AW23</b>	Ain Oulmene	AWE5	Saumure
<b>EZ33</b>	Ezzemoul	EZE5	Sel	<b>ME13</b>	Melghir	MEE2	Sel	<b>SB1</b>	Sidi Bouziane	SBE	Sel
<b>EZ34</b>	Ezzemoul	EZE5	Sel	<b>ME14</b>	Melghir	MEE3	Saumure	<b>SB2</b>	Sidi Bouziane	SBE	Sel
<b>EZ35</b>	Ezzemoul	EZE5	Sel	<b>ME15</b>	Melghir	MEE3	Saumure	<b>SB3</b>	Sidi Bouziane	SBE	Sel
<b>EZ36</b>	Ezzemoul	EZE5	Sel	<b>ME16</b>	Melghir	MEE3	Saumure	<b>SB4</b>	Sidi Bouziane	SBE	Sel
<b>EZ37</b>	Ezzemoul	EZE6	Saumure	<b>ME17</b>	Melghir	MEE3	Saumure				
<b>EZ38</b>	Ezzemoul	EZE6	Saumure	<b>ME18</b>	Melghir	MEE3	Saumure				

Ces caractéristiques ont été rapportées pour un grand nombre de lacs hypesalins algériens (Hacene *et al.*, 2004; Boutaiba *et al.*, 2011 ; Khallef, 2019) et à travers le monde (Birbir et Sesal, 2002 ; Burns *et al.*, 2004 ; Elvie *et al.*, 2004 ; Oren, 2011a ; Makhdoumi-Kakhki *et al.*, 2012 ; Yildiz *et al.*, 2012 ; Thombre *et al.*, 2016 ; Gómez-Villegas *et al.*, 2018). En revanche, d'autres lacs hypersalins ont une composition ionique très différente. C'est notamment le cas de la mer Morte, caractérisée par une dominance en ions divalents ( $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$ ) et une faible concentration en ions monovalents ( $Na^+$ ,  $Cl^-$ ) (Oren, 2011a). Un autre exemple est celui des lacs hypersalins alcalins tels que les lacs Magadi au Kenya et Wadi Natrun en Égypte, caractérisés par l'absence des cations divalents ( $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$ ) et une forte concentration en ions  $CO_3^{2-}$  et  $HCO_3^-$ .

Sur la base de l'analyse physico-chimique des saumures, nos environnements peuvent être considérés comme thalassohalins, caractérisés par une composition ionique reflétant celle de l'eau de mer et convenant bien à la croissance des *Archaea* halophiles extrêmes.

### 2. Isolement, purification et sélection des isolats

L'isolement des *Archaea* halophiles à partir d'échantillons de saumures et de sels a été effectué sur milieu de culture solide MGM à une salinité de 23 % (p/v) et dont la composition est adéquate pour répondre aux exigences nutritives de cette catégorie de microorganismes. Le choix de ce milieu est basé sur les résultats déjà obtenus dans certaines études qui ont montré qu'il est le meilleur parmi plusieurs milieux testés du point de vue quantitatif (augmentation du nombre d'haloarchaea isolées) et qualitatif (diversité plus élevée des espèces) (Burns *et al.*, 2004 ; Burns et Dyll-Smith, 2006 ; Dyll-Smith 2009). Après incubation des boîtes de Petri, trois à quatre colonies pigmentées montrant des différences macroscopiques (taille, pigmentation, contour, consistance), ont été sélectionnées de chaque boîte puis purifiées par stries sur le même milieu d'isolement.

Au total, une collection de 110 isolats a été obtenue à partir des sept sites étudiés. Chaque isolat est désigné selon un code composé du code du point de prélèvement et d'un chiffre indiquant l'ordre de l'isolement (Tableau 11). Sur ce total, 39 isolats sont issus de la sebkha d'Ezzemoul, 23 isolats de la saline de Ain Oulmene, 21 isolats du chott Melghir, 10 isolats de la sebkha de Bethioua, 8 isolats de la sebkha de Bazer Sakra, 5 isolats de chott Frain et 4 isolats de la sebkha de Sidi Bouziane.

Tableau 12. Caractères macroscopiques et microscopiques des isolats.

Isolat	Caractères macroscopiques		Caractères microscopiques		Isolat	Caractères macroscopiques		Caractères microscopiques	
	AC	Couleur	Forme	MG		AC	Couleur	Forme	MG
Ez1	L	Rouge	Cocci	Isolé	Ez33	L	Orange claire	Cocci	Isolé
Ez2	L	Orange claire	Cocci	Isolé	Ez34	L	Orange	Cocci	Isolé
Ez3	L	Orange	Cocci	Isolé	Ez35	L	Orange claire	Bâtonnets pléomorphes	Isolé
Ez4	L	Orange claire	Coccobacilles	Isolé	Ez36	L	Orange	Cocci	Isolé
Ez5	L	Orange	Bâtonnets	Paire	Ez37	L	Orange	Bâtonnets	Isolé
Ez6	L	Orange	Bâtonnets pléomorphes	Isolé	Ez38	M	Rose claire	Bâtonnets	Isolé
Ez7	L	Orange claire	Cocci	Isolé	Ez39	L	Orange	Cocci	Amas
Ez8	L	Orange	Cocci	Isolé	Bs1	L	Orange	Cocci	Isolé
Ez9	M	Rose	Grands cocci	Isolé	Bs2	L	Rouge	Cocci	Isolé
Ez10	M	Rose	Grands cocci	Isolé	Bs3	L	Orange	Cocci	Isolé
Ez11	M	Rose	Grands cocci	Isolé	Bs4	L	Orange	Bâtonnets plémorphes	Isolé
Ez12	L	Orange	Cocci	Isolé	Bs5	L	Orange claire	Bâtonnets	Isolé
Ez13	L	Orange	Bâtonnets	Chaînette	Bs6	L	Rouge	Cocci	Isolé
Ez14	L	Orange	Cocci	Isolé	Bs7	L	Orange claire	Bâtonnets	Paire
Ez15	L	Orange	Cocci	Isolé	Bs8	L	Orange claire	Bâtonnets	Isolé
Ez16	L	Orange claire	Bâtonnets	Isolé	ME1	L	Orange claire	Cocci	Isolé
Ez17	L	Rouge	Cocci	Isolé	ME2	L	Orange claire	Cocci	Isolé
Ez18	L	Rouge	Cocci	Isolé	ME3	M	Rose	Bâtonnets pléomorphes	Isolé
Ez19	L	Orange claire	Cocci	Isolé	ME4	L	Orange claire	Diplocoques	Isolé
Ez20	L	Orange	Grands cocci	Isolé	ME5	L	Orange	Cocci	Isolé
Ez21	L	Rouge	Cocci	Isolé	ME6	M	Rose	Bâtonnets pléomorphes	Isolé
Ez22	L	Orange claire	Cocci	Amas	ME7	L	Orange	Cocci	Chaînette
Ez23	L	Orange claire	Cocci	Isolé	ME8	L	Orange claire	Cocci	Isolé
Ez24	L	Orange claire	Bâtonnets	Isolé	ME9	M	Rose claire	Cocci	Isolé
Ez25	L	Rouge	Cocci	Isolé	ME10	M	Rose claire	Bâtonnets	Isolé
Ez26	L	Rouge	Cocci	Paire	ME11	M	Crème	Bâtonnets pléomorphes	Isolé
Ez27	L	Orange claire	Cocci	Isolé	ME12	M	Rose claire	Courts bâtonnets	Isolé
Ez28	L	Orange claire	Cocci	Isolé	ME13	L	Orange	Courts bâtonnets	Isolé
Ez29	L	Orange	Cocci	Amas	ME14	L	Orange	Cocci	Isolé
Ez30	L	Rouge	Cocci	Isolé	ME15	L	Orange	Cocci	Isolé
Ez31	L	Orange claire	Cocci	Isolé	ME16	L	Orange	Cocci	Isolé
Ez32	L	Orange claire	Cocci	Isolé	ME17	L	Orange	Bâtonnets	Isolé

AC : aspect des colonies ; MG : mode de groupement ; L : type lisse ; M : type muqueux ; - : Gram négatif.

En étudiant la nature des échantillons à l'origine de ces isolats, il s'avère que 63,64 % proviennent des échantillons de saumure, alors que les échantillons de sel n'ont fourni que 36,36 % des souches. Cette différence peut être due à l'utilisation d'un plus grand nombre d'échantillons de saumure. Néanmoins, il y'a lieu de noter que les sels ne favorisent pas le développement des haloarchaea en raison de leur faible activité d'eau, de leur pauvreté en éléments nutritifs et de leur salinité très élevée. Il a été suggéré que les halorachaea survivent dans les cristaux de sel en état de dormance sous forme de petites particules sphériques sans être capables de croître ou de se multiplier (Fendrihan *et al.*, 2012 ; Legat *et al.*, 2013).

### 2.1. Étude morphologique des isolats

Les caractères macroscopiques et microscopiques des isolats sont rassemblés dans le tableau 12.

#### 2.1.1. Étude macroscopique

L'observation macroscopique des souches sur milieu solide MGM a permis de dégager deux aspects différents des colonies (Figure 16) :

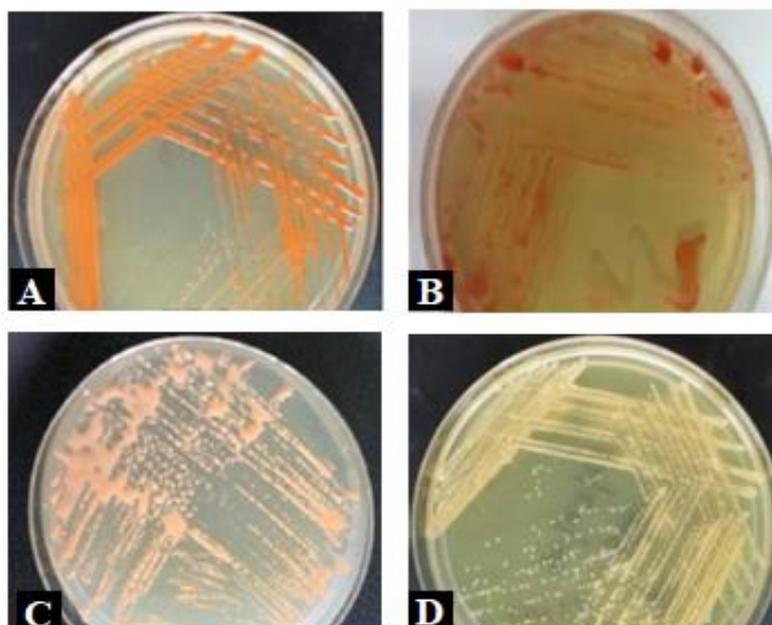
- colonies de type lisse (L) : ce type cultural est le plus rencontré, observé chez 99 isolats. Il est caractérisé par des colonies lisses de forme circulaire, convexe ou plate, à bord régulier, de couleur rouge ou orange. Le diamètre des colonies est compris entre 1 et 2 mm.
- colonies de types muqueux (M) : elles sont muqueuses, brillantes, de forme circulaire, bombée, et à bord régulier, de couleur rose, voire crème (cas de l'isolat ME11). La taille de ces colonies varie de 1 à 2 mm.

La pigmentation est un trait caractéristique des *Archaea* halophiles extrêmes, causée par la présence de pigments membranaires de type caroténoïde C<sub>50</sub> (bactériorubérine et ses dérivés) (Abrevaya, 2012). L'aspect muqueux des colonies est dû selon de nombreux auteurs à la présence des exopolysaccharides, fréquents chez certains genres d'haloarchaea tels que *Haloferax*, *Haloterrigena*, *Haloarcula* et *Halobacterium* (Squillaci *et al.*, 2016 ; Biswas et Paul, 2017 ; Singh et Singh, 2017).

Tableau 12. Caractères macroscopiques et microscopiques des isolats (suite).

Isolat	Caractères macroscopiques		Caractères microscopiques		Isolat	Caractères macroscopiques		Caractères microscopiques	
	AC	Couleur	Forme	MG		AC	Couleur	Forme	MG
ME18	L	Orange	Cocci	Isolé	AW15	L	Orange claire	Bâtonnets	Isolé
ME19	M	Rose claire	Bâtonnets	Isolé	AW16	L	Orange	Cocci	Isolé
ME20	L	Orange	Cocci	Isolé	AW17	L	Orange	Cocci	Isolé
ME21	L	Orange	Bâtonnets pléomorphes	Isolé	AW18	L	Orange	Cocci	Isolé
F1	L	Orange claire	Bâtonnets	Chaînette	AW19	L	Rouge	Cocci	Isolé
F2	L	Orange claire	Bâtonnets	Chaînette	AW20	L	Orange	Bâtonnets	Paire
F3	M	Rose claire	Bâtonnets pléomorphes	Isolé	AW21	L	Rouge	Cocci	Isolé
F4	L	Orange	Bâtonnets pléomorphes	Isolé	AW22	L	Orange	Cocci	Isolé
F5	M	Rose claire	Bâtonnets pléomorphes	Isolé	AW23	L	Orange claire	Cocci	Isolé
AW1	L	Orange	Cocci	Isolé	BT1	L	Orange claire	Pléomorphes	Isolé
AW2	L	Orange	Bâtonnets pléomorphes	Isolé	BT2	L	Orange claire	Pléomorphes	Isolé
AW3	L	Rouge	Cocci	Isolé	BT3	L	Orange	Cocci	Isolé
AW4	L	Orange foncée	Cocci	Isolé	BT4	L	Orange	Courts bâtonnets	Isolé
AW5	L	Orange claire	Cocci	Isolé	BT5	L	Orange	Cocci	Isolé
AW6	L	Orange	Cocci	Isolé	BT6	L	Orange	Cocci	Isolé
AW7	L	Orange	Cocci	Isolé	BT7	L	Orange	Bâtonnets pléomorphes	Isolé
AW8	L	Orange	Cocci	Isolé	BT8	L	Orange	Bâtonnets pléomorphes	Isolé
AW9	L	Orange claire	Cocci	Isolé	BT9	L	Orange claire	Pléomorphes	Isolé
AW10	L	Orange	Cocci	Isolé	BT10	L	Orange	Cocci	Isolé
AW11	L	Orange	Cocci	Isolé	SB1	L	Orange	Bâtonnets pléomorphes	Isolé
AW12	L	Orange claire	Bâtonnets	Chaînette	SB2	L	Rouge	Cocci	Isolé
AW13	L	Orange claire	Bâtonnets	Isolé	SB3	L	Orange	Bâtonnets pléomorphes	Isolé
AW14	M	Rose	Courts bâtonnets	Isolé	SB4	L	Orange claire	Bâtonnets	Isolé

AC : aspect des colonies ; MG : mode de groupement ; L : type lisse ; M : type muqueux ; - : Gram négatif.



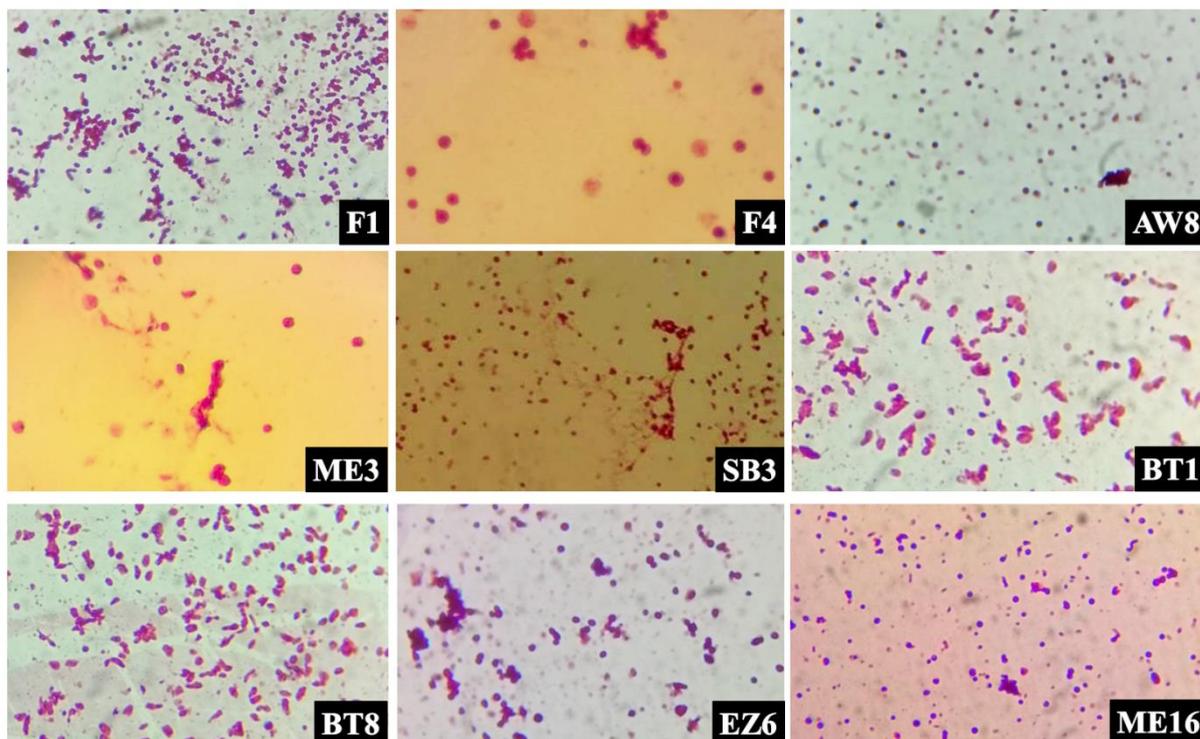
**Figure 16.** Aspects macroscopiques de quelques souches de l'étude sur milieu MGM. Type L : A. souche EZ34 ; B. souche AW23. Type M : C. souche F3 ; D. souche ME11.

### 2.1.2. Étude microscopique

La coloration de Gram effectuée sur des cultures jeunes a révélé que tous les isolats sont à Gram négatif pareillement à la grande majorité des haloarchaea (Figure 17). Ceci est en raison de la structure de leur paroi dépourvue de peptidoglycane qui est formée par un assemblage de sous unités hexagonales de glycoprotéines liées à des groupes sulfates (Oren, 2006). L'absence du peptidoglycane est responsable de la lyse des cellules lorsqu'elles sont exposées à des solutions salines de plus en plus diluées (Oren, 2014b).

Toutefois, certains membres présentent une coloration de Gram variable, c'est le cas des genres *Natronococcus* et *Halococcus* dont la paroi est composée d'un polymère glutaminylglycane et d'hétéropolysaccharides hautement sulfatés, respectivement (Abrevaya, 2012 ; Oren, 2014b).

Les formes cellulaires observées sous microscope photonique sont variables, allant de cocci ou bâtonnets aux formes sphériques ou pléomorphes, isolés, en paires, ou arrangés en chainettes. Le polymorphisme est une autre propriété caractéristique des *Archaea* halophiles extrêmes dû à l'absence du peptidoglycane, à l'opposé des bactéries qui sont généralement monomorphes. (Oren, 2014b).



**Figure 17.** Aspects microscopiques de quelques souches de l'étude sous agrandissement 1000 x après coloration de Gram.

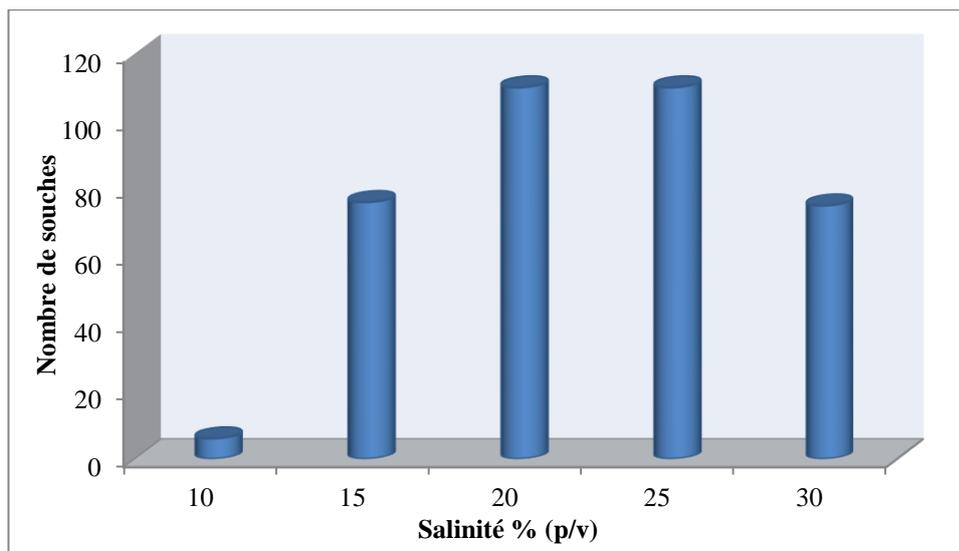
### 3. Étude physiologique des isolats

Les résultats de la caractérisation physiologique de de l'ensemble des isolats sont rassemblés dans le tableau 13 en annexe 2.

#### 3.1. Salinité

La majorité des souches testées sont capables de croître sur milieu MGM dont la concentration saline est comprise entre 15 et 30 % (p/v) (1,7 et 5,2M), avec un optimum de croissance à 20 ou 25 % (p/v) (3,4 et 4,3 M) selon les souches. Cependant, aucune croissance n'a été observée au-dessous de 10 % (p/v) de sel (Figure 18). Ce comportement est similaire à celui des haloarchaea déjà décrites (Lui *et al.*, 2015 ; Cui *et al.*, 2017 ; Chen *et al.*, 2019 ; Myers et King, 2020 ; Verma *et al.*, 2020). Ainsi, en se basant sur la classification de Kushner (1978), et au vu des caractéristiques macroscopiques et microscopiques de la section 2.1., nos souches peuvent, fort probablement, être définies comme des microorganismes halophiles extrêmes. Les cellules des halophiles extrêmes exigent des concentrations élevées en sel pour maintenir l'intégrité de leur machinerie cellulaire et enzymatique. L'exposition des cellules à des concentrations salines inférieures à 1 M provoque des dommages irréversibles et parfois même une lyse cellulaire (Ventosa, 2006 ; Edbeib *et al.*, 2016).

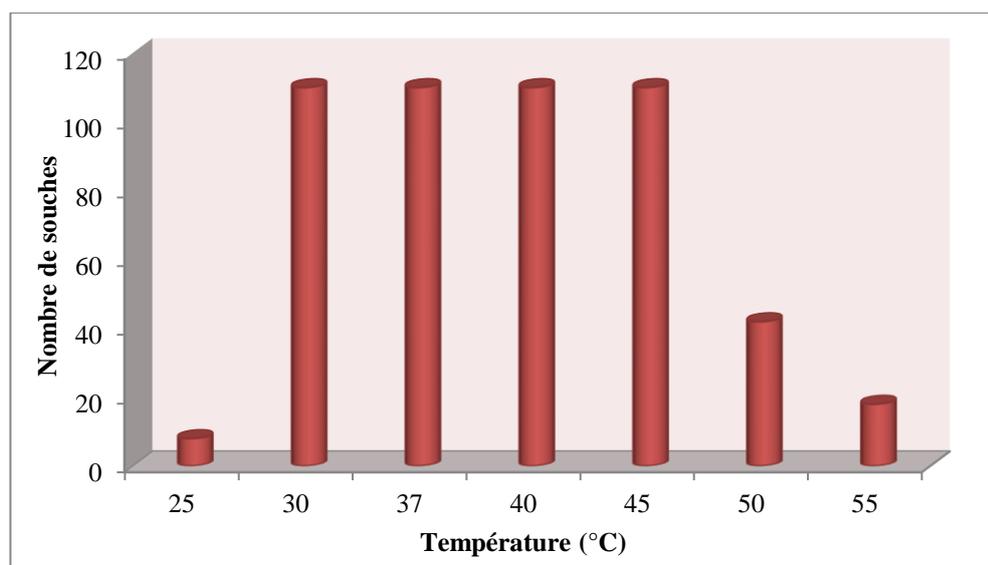
Par ailleurs, il est important de noter que les besoins en sels de ces microorganismes peuvent être influencés par certains facteurs environnementaux. Il a été rapporté que l'augmentation de la température conduit à l'augmentation de l'exigence au sel (Oren, 2013a). C'est le cas par exemple de l'espèce *Haloferax volcanii* qui, à une température de 30 °C, croît sur des concentrations en NaCl allant de 1-4 M avec un optimum de croissance à 1,7 M. Alors qu'à 40 °C, elle est capable de croître entre 1,1 et 5,4 M NaCl, avec un optimum de croissance observé à 2,5 M (Mullakhanbhai et Larsen, 1975).



**Figure 18.** Représentation de la croissance des souches à différentes salinités.

### 3.2. Température

La gamme de température explorée varie de 25 à 60 °C. Toutes les souches étudiées poussent entre 30 et 45 °C, tandis que 42 d'entre elles sont capables de croître à 50 °C et 21 tolèrent aussi une température de 55 °C (Figure 19). La tolérance des températures relativement élevées a été rapportée chez plusieurs espèces d'*Archaea* halophiles extrêmes (Lui *et al.*, 2015 ; Minegishi *et al.*, 2016 ; Barreteau *et al.*, 2019 ; Han et Cui, 2020 ; Kajale *et al.*, 2020 ; Zhao *et al.*, 2020). La croissance de la plupart des souches est optimale entre 37 à 40 °C. Toutefois sept souches se multiplient de manière optimale à 45 °C. Il s'agit donc de souches mésophiles à thermotolérantes (López-García, 2005). D'après la littérature, toutes les espèces d'haloarchaea, à l'exception de l'espèce psychrotrophe *Halorubrum lacusprofundi*, sont mésophiles ou thermophiles modérées présentant des optima de croissance situées entre 35 et 50 °C (Bowers et Wiegel, 2011 ; Oren *et al.*, 2017). L'adaptation à de hautes températures pourrait être due au fait que la majorité des environnements hypersalins est localisée dans des régions arides et semi-arides (Oren, 2014b).



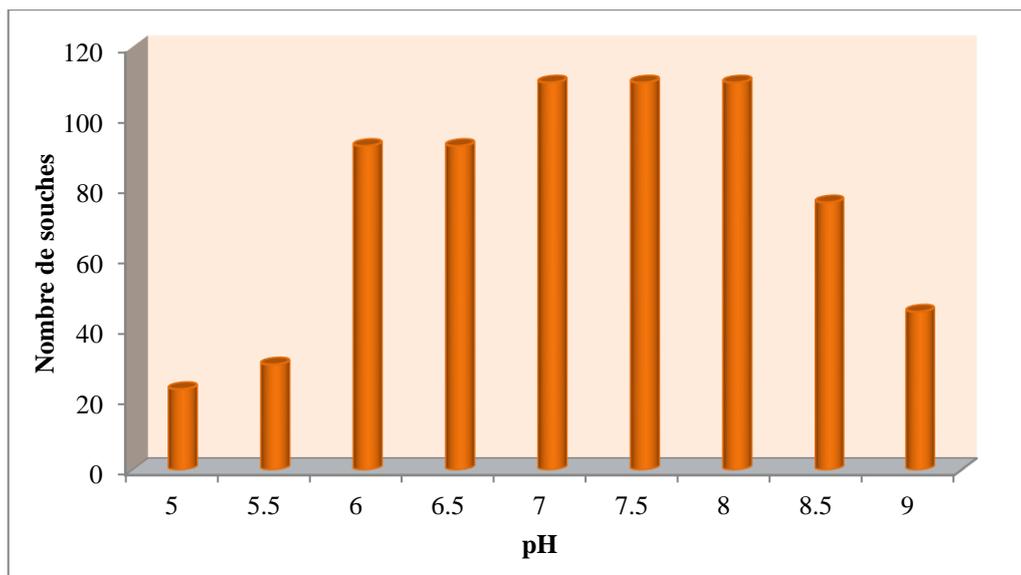
**Figure 19.** Représentation de la croissance des souches à différentes températures.

### 3.3. pH

La plupart des souches testées présentent des gammes de pH de croissance allant de 6,0 à 8,5 et quelques-unes sont aussi capables de croître à pH 5,0. Cependant, un groupe formé de 14 souches possède un intervalle de pH plus large et tolère ainsi des variations de pH de 5,0 à 9,0 (Figure 20). La capacité de croître sur une large gamme de pH est peu rencontrée chez les souches d'haloarchaea (Mori *et al.*, 2016 ; Cui *et al.*, 2017 ; Barreteau *et al.*, 2019 ; Han et Cui, 2020 ).

L'optimum de croissance de l'ensemble des souches varie entre pH 7,0 et 7,5. On peut donc les considérer comme souches neutrophiles (Horikoshi, 2008).

Les valeurs obtenues peuvent être liées au pH du milieu d'isolement utilisé qui a probablement favorisé la multiplication des neutrophiles. Elles peuvent également être expliquées par les caractéristiques des environnements à l'origine de ces souches. En reprenant les résultats des paramètres physico-chimiques étudiés préalablement, nous relevons que les sites étudiés sont neutres à alcalins. En outre, les haloarchaea sont en général neutrophiles avec quelques espèces qui sont décrites comme alcalophiles. Ces dernières ont été isolées uniquement à partir des lacs de soude (Horikoshi *et al.*, 2011 ; Oren *et al.*, 2017).



**Figure 20.** Représentation de la croissance des souches à différents pH.

L'étude de la capacité de nos souches à se développer sous différentes conditions de salinité, de température et de pH et la détermination des optima de croissance nous ont permis de repérer celles qui combinent plus d'un caractère d'extrémophilie.

La souche ME16 présente un optimum de croissance à pH 8,0, et tolère une température de 55 °C avec une croissance optimale à 40 °C. Elle est halophile extrême, et peut être qualifiée également de légèrement alcalophile et de thermotolérante selon Horikoshi (2008) et López-García (2005), respectivement. Alors que les souches F3 et F5 se développent de façon optimale à 45 °C et tolèrent un pH de 9,0. Elles peuvent donc être considérées comme thermotolérantes et alcalotolérantes. Quant aux souches BS5, BS7, BS8, EZ38, elles présentent une croissance optimale à 45 °C, et peuvent être assimilées à des halothermotolérants.

D'après la littérature, les halophiles extrêmes peuvent être qualifiés de polyextremophiles montrant la capacité de s'adapter non seulement aux fortes salinités, mais aussi à d'autres formes de stress tels que les températures élevées, les pH alcalins, les faibles concentrations en oxygène, le rayonnement solaire, etc. (Ventosa, 2006 ; De la Haba *et al.*, 2011 ; Stan-Lotter et Fendrihan, 2013). À titre d'exemple, l'espèce *Natronolimnobius aegyptiacus* est décrite comme halophile extrême, alcalophile et thermophile présentant une croissance optimale à 26 % (p/v) de NaCl, à pH 9,5 et à une température de 55 °C (Bowers et Wiegel, 2011).

## Résultats et Discussion

**Tableau 14.** Taux de production des caroténoïdes par les isolats (mg/L).

Souche	Taux de production ± ET	Souche	Taux de production ± ET	Souche	Taux de production ± ET
AW1	0,65 ± 0,06	BT7	0,70 ± 0,05	EZ34	2,07 ± 0,05
AW2	2,83 ± 0,10	BT8	0,77 ± 0,04	EZ35	1,29 ± 0,07
AW3	2,16 ± 0,05	BT9	1,30 ± 0,01	EZ36	2,23 ± 0,14
AW4	2,50 ± 0,10	BT10	1,67 ± 0,07	EZ37	0,71 ± 0,04
AW5	3,22 ± 0,10	EZ1	1,49 ± 0,04	EZ38	0,55 ± 0,10
AW6	2,25 ± 0,05	EZ2	0,98 ± 0,03	EZ39	0,34 ± 0,10
AW7	1,70 ± 0,04	EZ3	1,80 ± 0,01	F1	0,21 ± 0,01
AW8	2,46 ± 0,01	EZ4	1,39 ± 0,05	F2	0,64 ± 0,02
AW9	2,21 ± 0,10	EZ5	0,92 ± 0,05	F3	0,20 ± 0,01
AW10	2,28 ± 0,01	EZ6	2,53 ± 0,06	F4	0,79 ± 0,09
AW11	0,08 ± 0,08	EZ7	1,15 ± 0,05	F5	0,20 ± 0,01
AW12	0,27 ± 0,10	EZ8	2,49 ± 0,19	ME1	2,06 ± 0,07
AW13	0,90 ± 0,01	EZ9	0,41 ± 0,00	ME2	1,12 ± 0,08
AW14	0,80 ± 0,01	EZ10	0,90 ± 0,03	ME3	1,91 ± 0,03
AW15	1,99 ± 0,01	EZ11	0,53 ± 0,04	ME4	1,49 ± 0,02
AW16	1,31 ± 0,02	EZ12	1,19 ± 0,01	ME5	0,72 ± 0,03
AW17	0,99 ± 0,01	EZ13	1,47 ± 0,04	ME6	0,54 ± 0,04
AW18	2,64 ± 0,04	EZ14	2,11 ± 0,10	ME7	1,36 ± 0,01
AW19	2,75 ± 0,05	EZ15	1,93 ± 0,09	ME8	1,25 ± 0,03
AW20	2,76 ± 0,05	EZ16	0,63 ± 0,01	ME9	0,20 ± 0,01
AW21	3,20 ± 0,01	EZ17	1,70 ± 0,01	ME10	1,29 ± 0,01
AW22	2,58 ± 0,01	EZ18	1,87 ± 0,02	ME11	0,25 ± 0,03
AW23	0,10 ± 0,02	EZ19	1,38 ± 0,16	ME12	0,46 ± 0,04
BS1	0,52 ± 0,02	EZ20	0,92 ± 0,01	ME13	1,27 ± 0,02
BS2	3,68 ± 0,05	EZ21	0,83 ± 0,02	ME14	0,25 ± 0,01
BS3	2,01 ± 0,01	EZ22	1,66 ± 0,03	ME15	2,36 ± 0,07
BS4	2,64 ± 0,01	EZ23	1,22 ± 0,08	ME16	1,68 ± 0,08
BS5	0,40 ± 0,00	EZ24	1,13 ± 0,04	ME17	1,61 ± 0,01
BS6	2,13 ± 0,01	EZ25	1,86 ± 0,03	ME18	1,68 ± 0,00
BS7	0,74 ± 0,04	EZ26	1,48 ± 0,10	ME19	1,63 ± 0,04
BS8	0,67 ± 0,01	EZ27	0,54 ± 0,01	ME20	0,88 ± 0,08
BT1	0,35 ± 0,02	EZ28	2,16 ± 0,00	ME21	1,39 ± 0,01
BT2	1,50 ± 0,04	EZ29	1,70 ± 0,02	ME22	1,42 ± 0,04
BT3	2,07 ± 0,04	EZ30	0,47 ± 0,03	SB1	2,57 ± 0,06
BT4	2,97 ± 0,05	EZ31	2,27 ± 0,02	SB2	2,95 ± 0,01
BT5	0,84 ± 0,04	EZ32	1,63 ± 0,01	SB3	0,96 ± 0,03
BT6	1,00 ± 0,10	EZ33	0,88 ± 0,02	SB4	0,53 ± 0,01

ET : écart type.

### 4. Quantification des caroténoïdes produits par les isolats

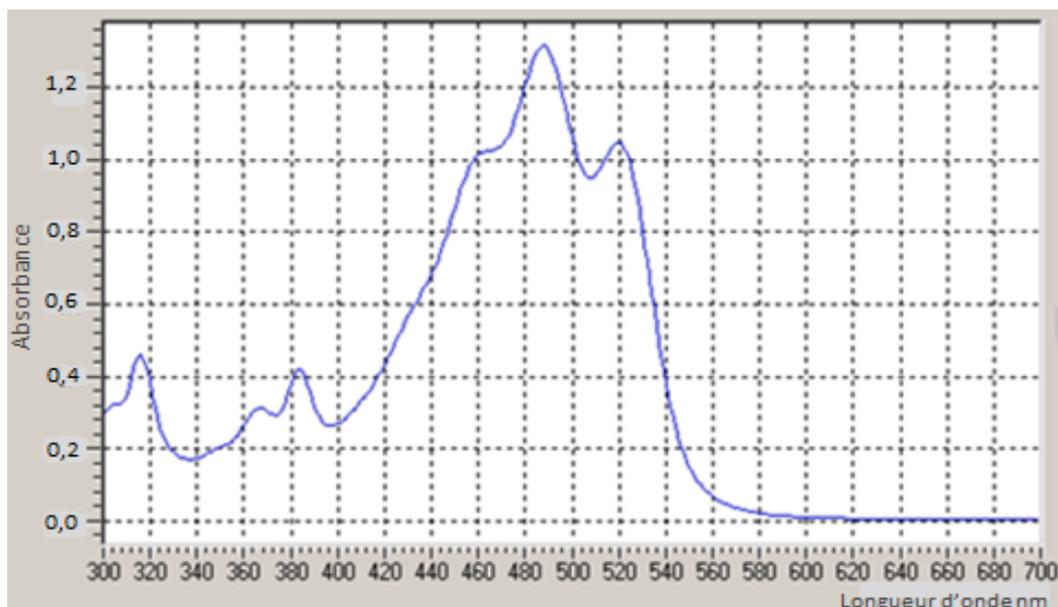
Les souches étudiées ont été cultivées sur milieu MGM dans les conditions physico-chimiques (pH, température et salinité) optimales pendant 7 jours.

La teneur en caroténoïdes produits par les souches a été estimée en mesurant l'absorbance de chaque culture à  $\lambda_{\max}$  ( $488 \pm 2$  nm). Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 14. Le taux de production des caroténoïdes varie d'une souche à une autre avec des valeurs comprises entre 0,1 et 3,68 mg/L. La souche BS2 présente le taux de production le plus élevé suivie par les souches AW5, AW21, BT4 et SB2 avec des taux de production de  $3,22 \pm 0,1$ ,  $3,20 \pm 0,01$  ;  $2,97 \pm 0,01$  et  $2,95 \pm 0,05$  mg/L, respectivement. Ces résultats sont proches de ceux trouvés par Yachai (2009) qui a rapporté des taux de production variant de 3,22 à 6,90 mg/L pour des haloarchaea isolées à partir d'aliments fermentés. Une étude similaire menée par Calo *et al.* (1995) a montré que les souches *Halobacterium salinarum* NRC-1, *Haloarcula hispanica* ATCC 33960 et *Haloferax mediterranei* ATCC 33500 produisaient des caroténoïdes à des concentrations de 2,40 ; 1,35 et 0,7 mg/L, respectivement. Une autre étude plus récente a rapporté que la souche *Haloferax mediterranei* ATCC 33500 produisait 3,74 mg/L de caroténoïdes dans des conditions de culture optimisées (Montero-Lobato *et al.*, 2018).

En comparant les valeurs obtenues avec celles rapportées dans la littérature, nous pouvons suggérer que plusieurs souches de notre collection disposent d'un potentiel intéressant pour la production des caroténoïdes.

Les extraits caroténoïdiques des souches étudiées ont été analysés par un spectrophotomètre à balayage sur une longueur d'onde de 300 à 700 nm. Tous les extraits ont donné un spectre d'absorption identique caractérisé par trois pics majeurs avec des maxima d'absorption à environ 460, 490 et 520 nm et deux pics mineurs à environ 317 et 388 nm (Figure 21). Ces observations rejoignent celles rapportées par Asker et Ohta (1999) et Yachai (2009). Selon Britton *et al.* (1995), ces pics correspondent à la bactériorubérine et à ses dérivés.

À l'exception des espèces *Natrialba asiatica*, *Halorhabdus tiamatea* et *Halanaeroarchaeum sulfurireducens*, tous les membres de la classe *Halobacteria* produisent des caroténoïdes de type C<sub>50</sub>, principalement la bactériorubérine et ses dérivés. Ces caroténoïdes localisés dans la membrane cellulaire assurent la protection des cellules contre les intensités nuisibles de la lumière solaire à laquelle les environnements hypersalins sont exposés (Rodrigo-Baños *et al.*, 2015 ; Oren *et al.*, 2017).



**Figure 21.** Spectre d'absorption des caroténoïdes produits par la souche BT4.

### 5. Caractérisation phénotypique des isolats

Sur la base de leurs caractères physiologiques et de leur potentiel de production de caroténoïdes, 43 isolats ont été sélectionnés pour une identification polyphasique alliant une caractérisation phénotypique et moléculaire. L'ensemble des résultats portant sur la caractérisation phénotypique des souches sélectionnées est présenté dans le tableau 15.

#### 5.1. Utilisation des substrats carbonés

L'utilisation des substrats carbonés comme unique source de carbone, d'énergie et/ou d'azote varie d'une souche à une autre. Bien que les halorachaea partagent plusieurs caractéristiques communes pour s'adapter à leurs environnements, leurs demandes nutritionnelles et leurs voies métaboliques sont considérablement différentes les unes des autres (Falb *et al.*, 2008).

Le glucose est le sucre le plus utilisé par l'ensemble des souches testées. La plupart d'entre elles utilisent au maximum deux sucres et 5 souches n'assimilent aucun sucre. La croissance sur les sucres a été observée chez quelques espèces d'haloarchaea, principalement *Haloferax mediterranei*, *Haloarcula marismortui*, *Halococcus saccharolyticus*, *Haloparvum sedimenti*, *Halopiger thermotolerans* et *Halobaculum roseum*. Ces espèces sont capables de métaboliser des pentoses (arabinose, xylulose), des hexoses (glucose, fructose) et des disaccharides (saccharose, lactose) (Falb *et al.*, 2008 ; Chen *et al.*, 2016 ; Minegishi *et al.*, 2016 ; Chen *et al.*, 2017). L'espèce *Halobacterium salinarum* possède tous les gènes responsables du catabolisme des sucres, cependant elle est incapable de les dégrader (Falb *et al.*, 2008).

## Résultats et Discussion

**Tableau 15.** Caractères physiologiques et biochimiques des souches sélectionnées.

<b>Caractère</b> \ <b>Souche</b>	<b>Aw3</b>	<b>Aw5</b>	<b>Aw8</b>	<b>Aw13</b>	<b>Aw15</b>	<b>Aw19</b>	<b>Aw21</b>	<b>Aw23</b>	<b>BS2</b>	<b>BS3</b>	<b>BS4</b>
<b>Salinité (% p/v)</b>	20–30	20–30	20–30	15–30	15–30	20–30	20–30	20–30	15–30	15–25	20–25
<b>Salinité optimale (% p/v)</b>	25	25	25	20	20	25	25	20	25	20	20
<b>Température (°C)</b>	30–45	30–50	30–50	30–55	25–50	30–50	30–50	30–45	30–45	30–50	30–45
<b>Température optimale (°C)</b>	37	40	37	37	37	37	37	37	37	40	37
<b>pH</b>	5,0–9,0	7,0–9,0	6,0–9,0	7,0–9,0	5,0–9,0	5,5–9,0	5,5–9,0	5,5–8,5	6,5–8,0	6,5–8,5	6,5–9,0
<b>pH optimal</b>	7,0	7,5	7,0	7,5	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
<b>Catalase</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Oxydase</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Production de :</b>											
<b>Indole</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>H<sub>2</sub>S</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Gaz à partir des nitrates</b>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<b>Réduction des nitrates en nitrites</b>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<b>Fermentation de L-arginine</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Utilisation de:</b>											
<b>D(+)-Glucose</b>	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+
<b>D(+)-Galactose</b>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
<b>D(+)-Fructose</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>D(+)-Lactose</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<b>D(+)-Saccharose</b>	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<b>D(+)-Maltose</b>	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
<b>D(+)-Mannose</b>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>Cellulose</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Amidon</b>	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<b>L-Arginine</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>L-Alanine</b>	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>L-Méthionine</b>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>L-Histidine</b>	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<b>L-Tyrosine</b>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<b>L-Isoleucine</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>L-Thréonine</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: résultat positif ; - : résultat négatif.

À noter que même si les sucres soient peu métabolisés par ces microorganismes, ils stimulent leur croissance (Andrei *et al.*, 2012).

Le glycérol et le mannitol sont largement assimilés par les souches testées, en accord avec ce qui a été déjà rapporté dans des études antérieures (Kharroub, 2009 ; Luque *et al.*, 2012 ; Baricz *et al.*, 2015). En effet, le glycérol est considéré comme l'un des principaux substrats favorisant la croissance des archées halophiles dans les lacs hypersalins, en raison de sa présence abondante dans ces environnements. Il est produit comme soluté compatible par l'algue verte *Dunaliella* (Oren, 2006 ; Andrei *et al.*, 2012). Quant au mannitol, il est dégradé par une mannitol déshydrogénase présente chez de nombreuses haloarchaea, notamment *Haloarcula vallismortis*, *Halopiger thermotolerans*, *Halostella pelagica* et *Halorussus litoreus* (Oren, 2002b ; Minegishi *et al.*, 2016 ; Han *et al.*, 2019 ; Han et Cui, 2020).

Bien qu'il soit connu que la plupart des haloarchaea utilisent préférentiellement les acides aminés comme source de carbone, d'énergie et d'azote, il semblerait qu'ils soient peu utilisés par nos souches. Des observations similaires ont été rapportées par Kharroub (2007), Luque *et al.* (2012) et Quadri *et al.* (2016). En effet, ces auteurs ont noté une faible utilisation de ces substrats par les souches testées. D'après nos résultats, l'histidine est l'acide aminé le plus assimilé par l'ensemble des souches. Cependant, aucune d'entre elles n'a été capable de croître sur des milieux de culture à l'arginine et à l'isoleucine. Falb *et al.* (2008), ont rapporté la présence des gènes codant les dioxygénases responsables de la dégradation des acides aminés aromatiques tels que l'histidine dans les génomes haloarchéens étudiés, alors que ceux responsables du catabolisme de l'arginine ont été uniquement identifiés chez *Halobacterium salinarum*. Quant à l'isoleucine, c'est un acide aminé à chaîne latérale ramifiée dont la structure est complexe. La dégradation de ce type d'acide aminé nécessite l'action combinée de plusieurs enzymes, d'où la difficulté de son assimilation (Falb *et al.*, 2008).

Tableau 15. Caractères physiologiques et biochimiques des souches sélectionnées (suite).

Caractère \ Souche	Aw3	Aw5	Aw8	Aw13	Aw15	Aw19	Aw21	Aw23	BS2	BS3	BS4
<b>Utilisation de :</b>											
L-Glutamine	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
Citrate	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Oxalate	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Lactate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acétate	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Formiate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acide ascorbique	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
Glycérol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<b>Production d'acides à partir de :</b>											
D(+)-Glucose	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+
D(+)-Galactose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
D(+)-Fructose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D(+)-Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
D(+)-Saccharose	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
D(+)-Mannose	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycérol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Hydrolyse de :</b>											
Amidon	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gélatine	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Caséine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tween 80	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+
<b>Sensibilité ou résistance à:</b>											
Pénicilline G	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Chloramphénicol	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S
Vancomycine	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Gentamicine	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Acide nalidixique	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Érythromycine	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
Céfoxitine	S	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R

+: résultat positif ; - : résultat négatif, S : sensible ; R : résistant.

L'utilisation des acides organiques, particulièrement le citrate et l'acétate a été observée chez plusieurs souches. Ces résultats concordent avec ceux trouvés dans des études précédentes qui ont rapporté une utilisation fréquente de ces substrats parmi les souches d'haloarchaea isolées (Kharroub, 2007 ; Luque *et al.*, 2012 ; Baricz *et al.*, 2015). De nombreuses *Archaea* halophiles extrêmes décrites dans la littérature sont capables d'utiliser les acides organiques (Chen *et al.*, 2017 ; Han *et al.*, 2019 ; Xu *et al.*, 2019 ; Han et Cui, 2020), et certaines exigent même la présence de ces composés pour leur croissance. C'est le cas de l'espèce *Halosimplex carlsbadense* qui ne pousse que sur un milieu de culture contenant l'acétate et/ou le pyruvate comme source de carbone et d'énergie (Vreeland *et al.*, 2002). Des études ont suggéré que les intermédiaires du cycle de Krebs (citrate, succinate, etc.) excrétés par l'algue halophile *Microcoleus chthonoplastes* constituent une principale source de carbone et d'énergie pour les populations d'*Archaea* halophiles extrêmes dans les lacs hypersalins (Zvyagintseva *et al.*, 1995; Andrei *et al.*, 2012).

### 5.2. Production d'acides à partir de substrats carbonés

Les résultats obtenus montrent que la croissance de nos souches sur les sucres et les alcools notamment le glucose, le saccharose et le mannitol, est parfois accompagnée d'une production d'acides responsable d'une baisse de pH. Ce résultat a été également rapporté par plusieurs auteurs (Birbir *et al.*, 2007 ; Kharroub, 2007 ; Zhang *et al.*, 2013 ; Chen *et al.*, 2017 ; Han et Cui, 2020 ; Zhao *et al.*, 2020). D'après la littérature, l'utilisation des glucides par les haloarchaea est souvent associée à une production d'acides, car l'oxydation de ces substrats est incomplète (Abrevaya, 2012 ; Andrei *et al.*, 2012). Une production d'acétate et de pyruvate, à partir du glucose a été observée chez *Halorubrum saccharovorum*. Cette même espèce produit l'acide galactonique et l'acide lactobionique à partir du galactose et du lactose, respectivement. D'autres espèces appartenant aux genres *Haloferax* et *Haloarcula* produisent l'acétate, le pyruvate et le D-lactate à partir du glycérol (Oren, 2006 ; Andrei *et al.*, 2012).

Tableau 15. Caractères physiologiques et biochimiques des souches sélectionnées (Suite).

Caractère \ Souche	BS5	BS7	BS8	BT1	BT2	BT4	BT7	BT8	BT9	EZ2	EZ5
Salinité (% p/v)	15–25	15–25	15–25	15–30	15–30	20–30	15–25	20–30	15–30	15–25	10–30
Salinité optimale (% p/v)	20	20	25	25	25	25	20	25	25	25	25
Température (°C)	30–55	30–55	30–55	30–55	25–45	30–45	30–45	30–45	30–55	30–50	30–55
Température optimale (°C)	45	45	45	37	37	37	37	37	37	40	40
pH	6,0–9,0	6,5–9,0	6,0–9,0	6,5–8,0	6,5–9,0	6,5–8,5	6,0–9,0	6,5–8,0	6,5–8,5	6,0–8,0	6,0–8,0
pH optimal	7,5	7,5	7,0	7,5	7,5	7,0	7,5	7,0	7,5	7,0	7,0
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxydase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Production de :											
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gaz à partir des nitrates	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Réduction des nitrates en nitrites	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Fermentation de L-arginine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Utilisation de:											
D(+)-Glucose	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
D(+)-Galactose	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-
D(+)-Fructose	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+
D(+)-Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
D(+)-Saccharose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D(+)-Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D(+)-Mannose	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
Cellulose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Amidon	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
L-Arginine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Alanine	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
L-Méthionine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Histidine	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
L-Tyrosine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Isoleucine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Thréonine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Glutamine	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+

+ : résultat positif, - : résultat négatif.

### 5.3. Caractérisation biochimique

L'ensemble des souches étudiées possèdent une catalase et une cytochrome oxydase, pareillement à toutes les espèces d'haloarchaea décrites (Oren *et al.*, 2017). Aucune des souches ne produit l'indole à partir du tryptophane, l'absence de la tryptophanase est un caractère fréquent chez ce groupe de procaryotes (Abrevaya, 2012).

La capacité de réduire les nitrates en anaérobiose a été observée chez la moitié des souches testées. En effet, les *Archaea* halophiles extrêmes mènent une vie hétérotrophe aérobie. Cependant, l'oxygène a une faible solubilité dans les saumures saturées en sel, en particulier à température élevée. Pour survivre, ces microorganismes adoptent différentes stratégies. La respiration anaérobie en utilisant le nitrate comme accepteur final d'électrons est l'une de ces stratégies. Elle est utilisée par de nombreuses espèces telles que *Natrinema altunense*, *Haloarcula sebkhae*, *Halobaculum saliterra*, *Halobacterium bonnevilliei* et *Natrialba swarupiae* (Minegishi et Kamekura, 2015 ; Barreteau *et al.*, 2019; Kajale *et al.*, 2020 ; Myers et King, 2020).

La production du sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S) à partir du thiosulfate a été détectée chez une seule souche. Également, peu d'espèces d'halobactéries sont décrites dans la littérature comme productrices d'H<sub>2</sub>S (Zhang *et al.*, 2013 ; Liu *et al.*, 2015 ; Han et Cui, 2020 ; Zhao *et al.*, 2020). Aucune souche n'est capable de croître en anaérobiose sur la L-arginine. En effet, la fermentation de la L-arginine n'est pas répandue parmi les membres des *Halobacteria*. Elle n'a été rapportée que pour quelques souches de l'espèce *Halobacterium salinarum*, et peu d'informations existent sur son importance écologique (Oren et Litchfeld, 1999 ; Oren, 2006).

### 5.4. Mise en évidence des activités hydrolytiques extracellulaires

La présence des activités amylolytiques, lipolytiques et protéolytiques a été qualitativement recherchée parmi les 43 isolats étudiés. Des exemples d'hydrolyse des polymères-tests utilisés sont représentés dans la figure 22.

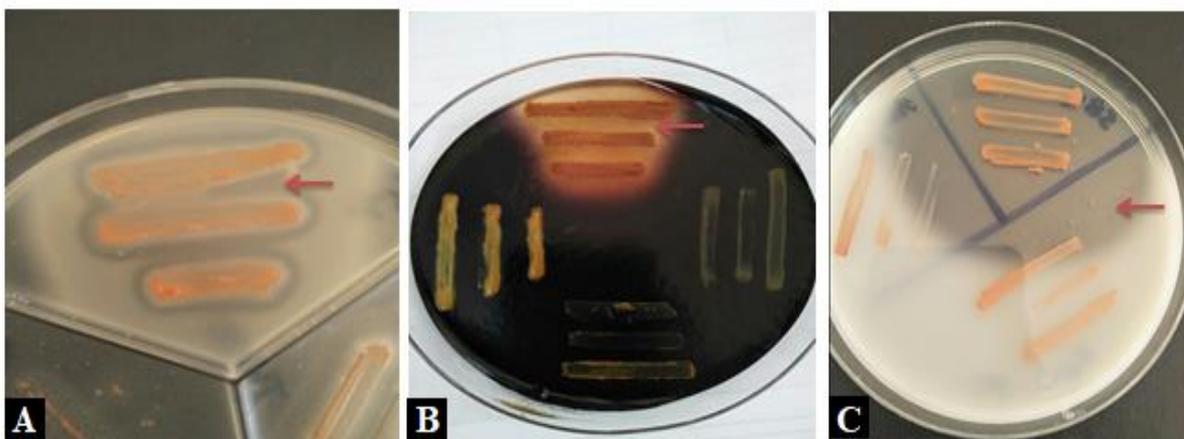
Les résultats obtenus nous ont permis de mettre en évidence une partie du potentiel enzymatique de nos isolats. À l'exception de 10 souches qui n'ont présenté aucune activité hydrolytique, le reste des souches, soit environ 76 % des souches étudiées montrent au moins une activité hydrolytique extracellulaire.

## Résultats et Discussion

**Tableau 15.** Caractères physiologiques et biochimiques des souches sélectionnées (Suite).

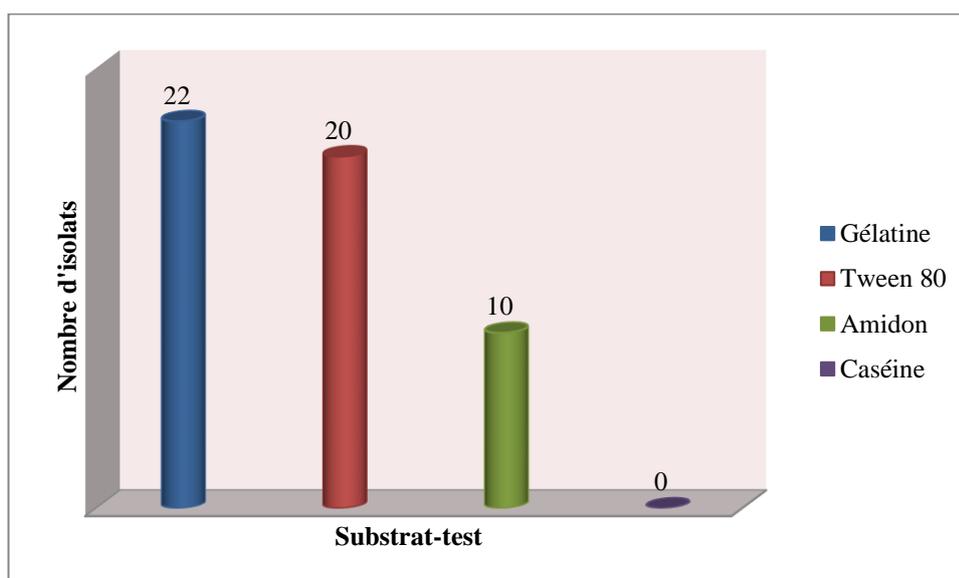
Caractère \ Souche	BS5	BS7	BS8	BT1	BT2	BT4	BT7	BT8	BT9	EZ2	EZ5
<b>Utilisation de :</b>											
<b>Citrate</b>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Oxalate</b>	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
<b>Lactate</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Acétate</b>	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+
<b>Formiate</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Acide ascorbique</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Mannitol</b>	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
<b>Glycérol</b>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
<b>Production d'acides à partir de :</b>											
<b>D(+)-Glucose</b>	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
<b>D(+)-Galactose</b>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<b>D(+)-Fructose</b>	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+
<b>D(+)-Lactose</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<b>D(+)-Saccharose</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>D(+)-Mannose</b>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
<b>Mannitol</b>	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+
<b>Glycérol</b>	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
<b>Hydrolyse de :</b>											
<b>Amidon</b>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Gélatine</b>	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
<b>Caséine</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Tween 80</b>	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-
<b>Sensibilité ou résistance à:</b>											
<b>Pénicilline G</b>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<b>Chloramphénicol</b>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>Vancomycine</b>	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R
<b>Gentamicine</b>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<b>Acide nalidixique</b>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<b>Érythromycine</b>	S	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R
<b>Céfoxitine</b>	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R

+: résultat positif ; - : résultat négatif ; S : sensible ; R : résistant.



**Figure 22.** Exemples d'activités hydrolytiques détectées. A. Hydrolyse du Tween 80 par la souche BT4 ; B. Hydrolyse de l'amidon par la souche ME13 ; C. Hydrolyse de la gélatine par la souche SB4. Les flèches montrent les zones d'hydrolyse.

Sur l'ensemble des souches testées, 22 hydrolysent la gélatine, 20 le Tween 80 et 10 sont capables de dégrader l'amidon. Cependant aucune souche n'a été capable d'utiliser la caséine (Figure 23). L'incapacité de dégrader la caséine serait due à la forte concentration en sel du milieu de culture utilisé qui provoquerait une précipitation de ce substrat (Zittle *et al.*, 1957 ; Rose et Tessier, 1958). En outre, il a été rapporté que la dégradation de la caséine est meilleure à pH acide, contrairement à la gélatine qui est mieux dégradée à pH neutre (Loeb et Loeb, 1921).



**Figure 23.** Effectifs des souches ayant pu hydrolyser les substrats testés.

Tableau 15. Caractères physiologiques et biochimiques des souches sélectionnées (Suite).

Souche	EZ6	EZ37	EZ38	F1	F2	F3	F4	F5	ME1	ME3	ME6
Caractères											
Salinité (% p/v)	15–30	15–25	10–30	15–30	20–30	10–30	15–30	10–30	20–30	15–25	15–30
Salinité optimale (% p/v)	25	20	15	20	20	15	25	15	25	20	25
Température (°C)	30–45	30–55	30–55	25–50	25–50	30–55	30–50	25–55	30–45	30–50	30–55
Température optimale (°C)	37	40	45	37	37	45	40	45	37	40	40
pH	6,5–9,0	5,0–8,0	5,0–9,0	5,0–9,0	5,0–9,0	5,0–9,0	5,0–9,0	5,0–9,0	5,5–8,5	5,0–9,0	5,0–9,0
pH optimal	7,0	6,5	7,0	7,0	7,0	7,0	7,5	7,0	7,0	7,5	7,0
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxydase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Production de :											
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gaz à partir des nitrates	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+
Réduction des nitrates en nitrites	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
Fermentation de L-arginine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Utilisation de :											
D(+)-Glucose	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
D(+)-Galactose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D(+)-Fructose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D(+)-Lactose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D(+)-Saccharose	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+
D(+)-Maltose	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-
D(+)-Mannose	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Cellulose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amidon	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Arginine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Alanine	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
L-Méthionine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Histidine	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Tyrosine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Isoleucine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Thréonine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Glutamine	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+

+: résultat positif ; - : résultat négatif.

Au vu de ces résultats, il est clair que l'activité protéolytique représentée par l'hydrolyse de la gélatine est prédominante suivie par l'activité lipolytique. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Hassani (2015) qui a rapporté que sur 162 souches achéennes testées, le polymère le plus dégradé était la gélatine suivie par le Tween 80. La dominance des souches à gélatinase positive a été également trouvée par Bibir *et al.* (2006) et Ozcan *et al.* (2006 ; 2007). En revanche, certains auteurs ont rapporté que l'activité amylolytique était prédominante (Makhdoumi Kakhki *et al.*, 2011; Kharroub *et al.*, 2014; Menasria *et al.*, 2018), alors que d'autres ont révélé la dominance de l'activité lipolytiques (Quadri *et al.*, 2016; Rasooli *et al.*, 2016).

Il est intéressant de noter qu'une combinaison de deux à trois activités hydrolytiques a été détectée chez plusieurs souches. La présence de telle combinaison a été rapportée par de nombreuses études antérieures réalisées sur la diversité des *Archaea* halophiles extrêmes productrices d'enzymes (Makhdoumi Kakhki *et al.*, 2011; Kharroub *et al.*, 2014 ; Quadri *et al.*, 2016 ; Menasria *et al.*, 2018).

La production d'enzymes hydrolytiques extracellulaires, en particulier les protéases, les amylases et les lipases a été observée chez de nombreux représentants des *Halobacteria* (Ventosa *et al.*, 2005 ; Bonete et Martinez-Espinosa, 2011 ; Torregrosa-Crespo *et al.*, 2016 ; Cui *et al.*, 2017 ; Barreteau *et al.*, 2019 ; Han et Cui, 2020). Ces enzymes permettent aux haloarchaea de dégrader la matière organique disponible dans leur environnement et l'utiliser comme source de carbone et d'énergie, contribuant ainsi à l'adaptation de ces microorganismes à leur milieu naturel (Andrei *et al.*, 2012).

De nombreuses études ont montré que les enzymes d'*Archaea* halophiles ou haloenzymes se caractérisaient par un excès d'acides aminés acides et de charges extérieures négatives, ce qui leur confère la capacité de fonctionner dans des conditions d'extrême salinité responsables généralement de la dénaturation de la plupart des protéines. Ces enzymes tolèrent également des températures supérieures à 50 °C, des variations de pH et la présence de solvants organiques (Bonete et Martinez-Espinosa, 2011 ; Delgado-García *et al.*, 2018). À titre d'exemple, on peut citer la protéase produite par la souche *Natrialba asiatica* 172P1 qui présente une activité optimale à 25 % (p/v) NaCl, à 75-80 °C et à pH 10,7 (Ventosa *et al.*, 2005). L'amylase produite par *Haloarcula hispanica* fonctionne de façon optimale à une salinité de 25 % (p/v) et une température de 50 °C, elle est aussi stable en présence du benzène, du toluène et du chloroforme (Torregrosa-Crespo *et al.*, 2016).

## Résultats et Discussion

**Tableau 15.** Caractères physiologiques et biochimiques des souches sélectionnées (Suite).

Souche	EZ6	EZ37	EZ38	F1	F2	F3	F4	F5	ME1	ME3	ME6
<b>Utilisation de :</b>											
<b>Citrate</b>	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
<b>Oxalate</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Lactate</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Acétate</b>	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+
<b>Formiate</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Acide ascorbique</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Mannitol</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Glycérol</b>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Production d'acides à partir de</b>											
<b>D(+)-Glucose</b>	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+
<b>D(+)-Galactose</b>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>D(+)-Fructose</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>D(+)-Lactose</b>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>D(+)-Saccharose</b>	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
<b>D(+)-Mannose</b>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Mannitol</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<b>Glycérol</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Hydrolyse de :</b>											
<b>Amidon</b>	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-
<b>Gélatine</b>	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+
<b>Caséine</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Tween 80</b>	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<b>Sensibilité ou résistance à :</b>											
<b>Pénicilline G</b>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<b>Chloramphénicol</b>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>Vancomycine</b>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<b>Gentamicine</b>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<b>Acide nalidixique</b>	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R
<b>Érythromycine</b>	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S
<b>Céfoxitine</b>	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S

+: résultat positif ; - : résultat négatif ; S : sensible ; R : résistant.

Ces propriétés rendraient les haloenzymes des candidats idéaux dans les processus de biocatalyse industriels. Néanmoins, peu d'*Archaea* halophiles extrêmes ont franchi le pas de l'exploitation industrielle, et très peu d'enzymes halophiles ont trouvé des applications en biotechnologie, en comparaison avec les enzymes des autres extrêmophiles (Torregrosa-Crespo *et al.*, 2017 ; Ghosh *et al.*, 2019).

### 5.5. Sensibilité aux antibiotiques

Les résultats de l'étude de la sensibilité aux antibiotiques sont donnés dans le tableau 15. La majorité des souches sont résistantes aux antibiotiques inhibant la croissance des bactéries tels que la pénicilline G (1 IU), la gentamicine (10 µg), la vancomycine (5 µg), l'acide nalidixique (30 µg), l'érythromycine (2 µg) et la cefoxitine (30 µg). Ces résultats concordent en général avec des études antérieures réalisées sur les haloarchaea (Elvi *et al.*, 2004 ; Ozcan *et al.*, 2007 ; Luque *et al.*, 2012 ; Baricz *et al.*, 2015). En effet, l'absence du peptidoglycane chez les archaées les rend insensibles à la plupart des antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi cellulaire.

La majorité des souches se sont montrées sensibles au chloramphénicol. Ce qui est en accord avec les résultats obtenus par Elvi Bardavid et Oren (2008), qui ont rapporté une inhibition de la croissance à des concentrations de cet antibiotique allant de 10 à 50 µg/mL. Selon ces auteurs, le chloramphénicol ralentissait l'incorporation des acides aminés. Le degré et l'effet inhibiteur de ce dernier dépendaient de la concentration en sel du milieu.

## Résultats et Discussion

**Tableau 15.** Caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques des souches sélectionnées (Suite).

Souche	ME11	ME13	ME15	ME16	ME17	ME21	ME22	SB1	SB3	SB4
<b>Caractères</b>										
<b>Salinité (% p/v)</b>	15–25	15–30	20–30	15–25	15–30	20–30	15–25	20–30	20–30	15–30
<b>Salinité optimale (% p/v)</b>	20	20	20	20	25	20	20	25	25	25
<b>Température (°C)</b>	30–50	30–55	30–50	30–55	30–55	30–45	30–50	30–45	30–45	30–55
<b>Température optimale (°C)</b>	40	40	37	40	40	37	40	37	37	40
<b>pH</b>	5,0–8,0	6,0–8,0	5,5–9,0	5,0–9,0	5,0–8,0	6,5–9,0	5,0–9,0	6,5–9,0	6,5–9,0	5,0–9,0
<b>pH optimal</b>	7,0	7,0	7,5	7,0	6,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,0
<b>Catalase</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Oxydase</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Production de :</b>										
<b>Indole</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>H<sub>2</sub>S</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Gaz à partir des nitrates</b>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
<b>Réduction des nitrates en nitrites</b>	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
<b>Fermentation de la L-arginine</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Utilisation de :</b>										
<b>D(+)-Glucose</b>	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
<b>D(+)-Galactose</b>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
<b>D(+)-Fructose</b>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<b>D(+)-Lactose</b>	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
<b>D(+)-Saccharose</b>	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+
<b>D(+)-Maltose</b>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
<b>D(+)-Mannose</b>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<b>Cellulose</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Amidon</b>	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
<b>L-Arginine</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>L-Alanine</b>	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
<b>L-Méthionine</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>L-Histidine</b>	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-
<b>L-Tyrosine</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>L-Isoleucine</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>L-Thréonine</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>L-Glutamine</b>	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+

+ : résultat positif ; - : résultat négatif.

Tableau 15. Caractères physiologiques et biochimiques des souches sélectionnées (Suite).

Souche	ME11	ME13	ME15	ME16	ME17	ME21	ME22	SB1	SB3	SB4
<b>Caractères</b>										
<b>Utilisation de :</b>										
<b>Citrate</b>	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+
<b>Oxalate</b>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<b>Lactate</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Acétate</b>	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-
<b>Formiate</b>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Acide ascorbique</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Mannitol</b>	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
<b>Glycérol</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<b>Production d'acides à partir de</b>										
<b>D(+)-Glucose</b>	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+
<b>D(+)-Galactose</b>	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
<b>D(+)-Fructose</b>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<b>D(+)-Lactose</b>	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
<b>D(+)-Saccharose</b>	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-
<b>D(+)-Mannose</b>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<b>Mannitol</b>	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
<b>Glycérol</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<b>Hydrolyse de :</b>										
<b>Amidon</b>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
<b>Gélatine</b>	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+
<b>Caséine</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Tween 80</b>	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
<b>Sensibilité ou résistance à :</b>										
<b>Pénicilline G</b>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<b>Chloramphénicol</b>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>Vancomycine</b>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<b>Gentamicine</b>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<b>Acide nalidixique</b>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<b>Érythromycine</b>	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S
<b>Céfoxitine</b>	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R

+: résultat positif ; - : résultat négatif ; S : sensible ; R : résistant

### 5.6. Phénogramme

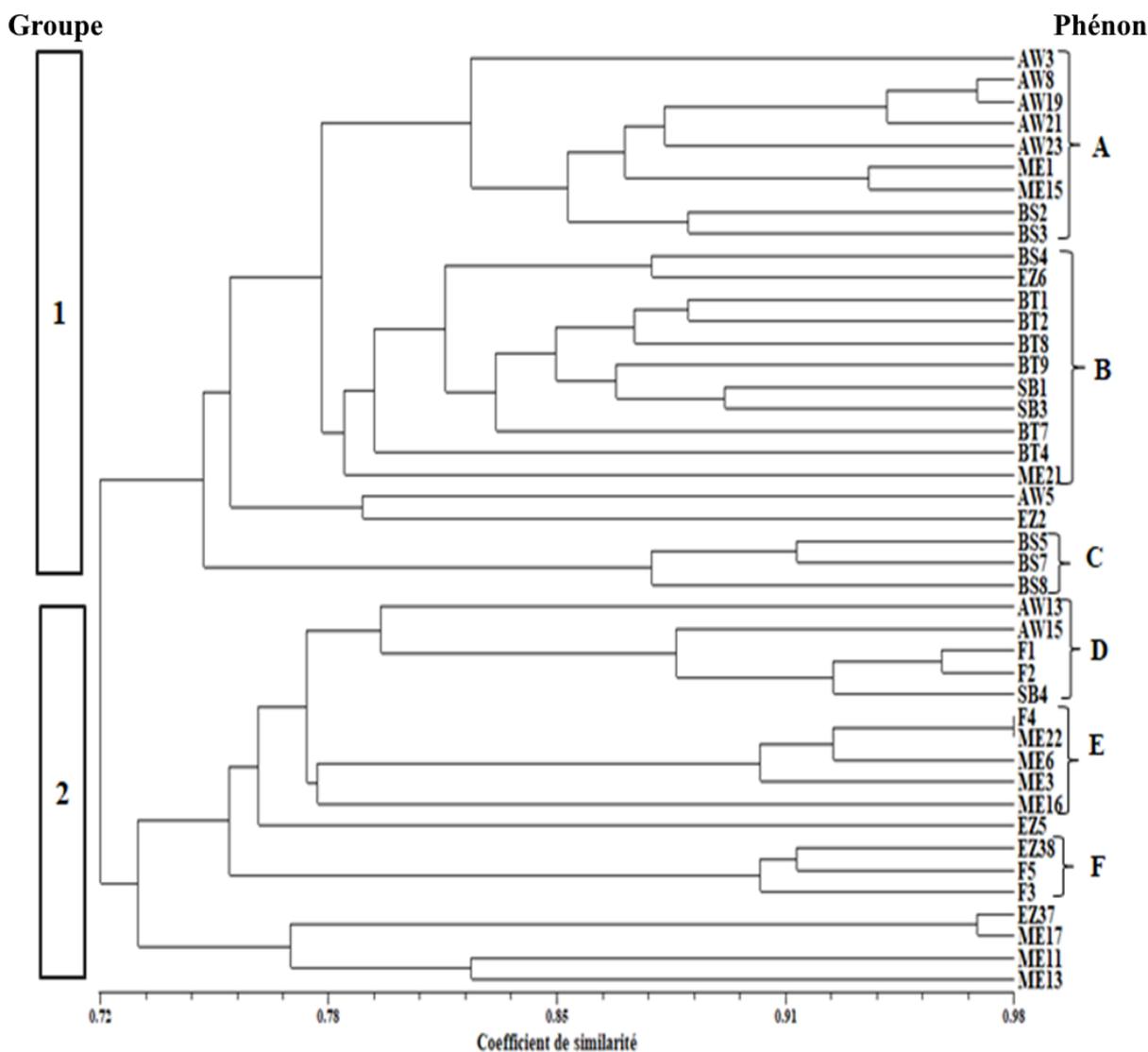
Les liens de parenté phénotypique entre les 43 souches sélectionnées ont été étudiés en construisant un phénogramme par la méthode UPGMA. Cette analyse est basée sur le calcul du coefficient d'appariement simple (*simple matching coefficient*) de 97 caractères phénotypiques des isolats (Tableau 16-Annexe 2). Le résultat de l'analyse est représenté dans la figure 24.

Il ressort de l'arbre obtenu que les clades sont formés à des pourcentages de similarité allant de 72 à 98 %, ce qui indique une variabilité phénotypique relativement faible. Cela est en partie dû au fait que les membres de la classe *Halobacteria* partagent plusieurs caractéristiques communes telles que l'exigence en sel, le Gram négatif, le polymorphisme cellulaire, la pigmentation, le métabolisme respiratoire aérobie et la sensibilité aux antibiotiques (Oren, 2014).

Deux principaux groupes ont émergé depuis le phénogramme obtenu. Le premier est composé de 3 phénons (A, B et C) liés à ~75 % de similarité et le second groupe, formé à ~73 % de similarité, est composé de 3 phénons (D, E et F) :

- Phénon A : formé à 83 % de similarité, il contient 9 isolats dont 5 proviennent d'Ain Oulmene, 2 de chott Melghir et 2 de Bazer Sakra. Ses souches se présentent sous forme de cocci à courts bâtonnets, elles sont neutrophiles, mésophiles et se développent entre 20 et 30 % (p/v) de sel avec des optima à 20 ou 25 % (p/v) selon les souches. Elles utilisent peu les substrats testés comme source d'énergie, de carbone et/ou d'azote. Parmi les 9 souches, 3 réduisent les nitrates avec production d'azote gazeux, 3 sont capables de dégrader le Tween 80 et une seule souche hydrolyse la gélatine. La sensibilité aux antibiotiques est variable parmi les membres de ce groupe ;

- Phénon B : formé à 79 % de similarité, il est composé de 11 isolats dont la plupart proviennent de Bethioua. Les cellules sont pléomorphes, neutrophiles, mésophiles et capables de se développer sur un intervalle de salinité allant de 15 à 30 % (p/v) avec des optima à 20 ou 25 % (p/v) selon les souches. Ce groupe est assez variable physiologiquement et biochimiquement. Toutefois, toutes les souches utilisent le glucose en produisant souvent des acides, et la majorité d'entre elles réduisent les nitrates avec production d'azote gazeux. Aucune souche n'est capable d'hydrolyser l'amidon et certaines dégradent la gélatine et le Tween 80. Les souches sont résistantes à tous les antibiotiques testés à l'exception du chloramphénicol ;



**Figure 24.** Phénogramme basé sur la similarité de 97 caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques des 43 souches étudiées.

- Phénon C : formé à 87 % de similarité, c'est un groupe homogène qui comprend 3 isolats des saumures de Bazer Sakra. Ces souches sont des bâtonnets neutrophiles, thermotolérantes et se développent de manière optimale à 20 ou 25 % (p/v) de sel selon les souches. Elles sont capables de réduire les nitrates en nitrites et d'utiliser l'acétate et le mannitol comme unique source de carbone et d'énergie. L'amidon est hydrolysé par une seule souche alors que deux souches sont capables de dégrader la gélatine et le Tween 80. Les trois souches sont sensibles au chloramphénicol, à la vancomycine et à l'érythromycine, et résistantes aux autres antibiotiques testés ;

## Résultats et Discussion

---

- Phénon D : clusterisé à ~ 79 % de similarité, il inclut 5 souches neutrophiles, mésophiles et capables de croître sur un intervalle de salinité allant de 15 à 30 % (p/v) avec un optimum à 20 % (p/v). Ces souches sont des bâtonnets arrangés parfois en chainettes, elles sont capables d'utiliser plusieurs sucres comme source de carbone et d'énergie, mais dégradent peu les polymères testés. Aucune souche n'est capable de réduire les nitrates. Parmi les 5 souches, 4 sont sensibles au chloramphénicol et résistantes aux autres antibiotiques étudiés ;

- Phénon E : clusterisé à ~ 78 % de similarité, ce groupe est composé de 5 souches pléomorphes, neutrophiles et légèrement thermotolérantes. Elles se développent entre 15 et 30 % (p/v) de sel, avec des optima de croissance à 20 ou 25 % (p/v) selon la souche. Ces souches utilisent plusieurs substrats comme source de carbones et d'énergie, elles sont capables de réduire les nitrates et d'hydrolyser la gélatine, mais non l'amidon et le Tween 80. Elles sont résistantes à la pénicilline, à la vancomycine et à l'acide nalidixique et sensibles aux autres antibiotiques testés ;

- Phénon F : formé à ~ 90 % de similarité, c'est le groupe le plus homogène, composé de trois souches qui peuvent croître sur un large intervalle de salinité avec un optimum à 15 % (p/v) de sel. Ces souches sont pléomorphes, neutrophiles et thermotolérantes. Elles réduisent les nitrates en azote gazeux et utilisent une grande variété de substrats-tests en produisant souvent des acides à partir des sucres. Les trois souches sont gélatinase, amylase et estérase positive, elles sont résistantes à tous les antibiotiques testés, à l'exception du chloramphénicol.

En plus des phénons cités précédemment, des clades sont formés par les paires de souches : AW5-EZ2, EZ37-ME17 et ME11-ME13.

En comparant la diversité phénotypique des souches isolées, nous remarquons une homogénéité au sein des isolats d'Ain Oulmene. En revanche, il existe un certain nombre de variations entre les souches provenant des autres sites.

En effet, la salinité n'est pas l'unique facteur qui joue sur la variation des caractères phénotypiques des *Archaea* halophiles extrêmes. D'autres facteurs liés à leur milieu naturel tels que la température, l'exposition à la lumière, le pH et la disponibilité des nutriments entrent également en jeu (Oren, 2002b).

Selon Lefevre *et al.* (2016), les variations phénotypiques sont reconnues comme une réponse à une variation de l'environnement, elles permettent d'avoir une tolérance plus large aux conditions environnementales. Ces variations ne résultent pas de changements génotypiques et sont donc réversibles et non transmissibles à la descendance.

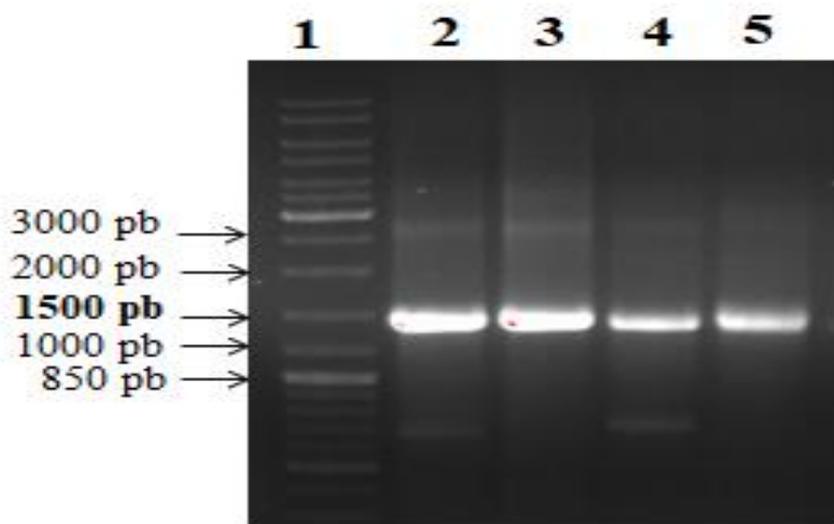
En raison de la grande plasticité génétique observée chez les haloarchaea, les propriétés phénotypiques ne se sont pas avérées utiles pour évaluer toute relation fiable au sein de la classe des *Halobacteria*. Toutefois, ces propriétés ne peuvent être ignorées (Oren *et al.*, 1997 ; Gupta *et al.*, 2015).

### 6. Caractérisation moléculaire des isolats

Afin de compléter leur identification et de déterminer leur position taxonomique, les 43 isolats ont fait l'objet d'une caractérisation moléculaire basée sur l'amplification et l'analyse de la séquence du gène codant l'ARNr 16S.

#### 6.1. Amplification des gènes de l'ARNr 16S

L'ADN des souches étudiées a été d'abord extrait puis le gène codant l'ARNr 16S mesurant environ 1500 pb a été amplifié par PCR. Les fragments amplifiés obtenus sont séparés selon leur poids moléculaire par électrophorèse sur gel d'agarose. Après migration, la présence de bandes électrophorétiques correspondant à la taille du gène (environ 1500 pb) est visualisée sous lumière UV (Figure 25).



**Figure 25.** Produits d'amplification PCR du gène d'ARNr 16S de quelques souches sur gel d'agarose à 1 % (p/v). Puits 1 : marqueur moléculaire *Gene Ruler* 1 kb plus ; puits 2 : souche AW21 ; puits 3 : souche BT4 ; puits 4 : souche SB3 ; puits 5 : souche BS2.

#### 6.2. Séquençage et analyse des séquences du gène de l'ARNr 16S

Les amplicons du gène de l'ARNr 16S des 43 souches étudiées ont été séquencés selon une modification de la méthode de Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Les séquences obtenues ayant une taille comprise entre 1200 et 1300 pb ont été déposées dans les banques ENA/Genbank/DDBJ.

Résultats et Discussion

Tableau 17. Résultats des alignements des séquences des gènes de l'ARNr 16S des souches étudiées avec les banques ENA/Genbank/DDBJ (version 09-2020) et EzBioCloud (version 05-2020).

Souche	NA	TS (pb)	Résultat le plus proche sur ENA/Genbank/DDBJ	NA	% sim.	% de couv.	Résultat le plus proche sur EzBioCloud	NA	% sim.	% de couv.
AW15	MN134037	1373	<i>Natrinema altunense</i> CEJGTEA101	KY129977	99	99	<i>Natrinema altunense</i> AJ2 <sup>T</sup>	JNCS01000019	99	100
BS2	MN134038	1371	<i>Halorubrum chaoviator</i> DSM 19316 <sup>T</sup>	NR_113472	99	100	<i>Halorubrum sodomense</i> DSM 3755 <sup>T</sup>	jgi.1055354	99	100
BS3	MN134039	1362	<i>Halorubrum sodomense</i> JCM 8880 <sup>T</sup>	NR_113485	99	100	<i>Halorubrum sodomense</i> DSM 3755 <sup>T</sup>	jgi.1055354	99	100
BS4	MN134040	1371	<i>Halorubrum terrestre</i> CEJTA9	KY129959	99	99	<i>Halorubrum trapanicum</i> NRC 34021 <sup>T</sup>	X82168	98	100
EZ5	MN134041	1365	<i>Haloarcula hispanica</i> N601	CP006884	98	99	<i>Haloarcula hispanica</i> ATCC 33960 <sup>T</sup>	CP002921	98	100
EZ6	MN134042	1359	<i>Halorubrum terrestre</i> CEJTA9	KY129959	99	99	<i>Halorubrum trapanicum</i> NRC 34021 <sup>T</sup>	X82168	99	100
EZ37	MN134043	1376	<i>Haloferax lucentense</i> JCM 9276 <sup>T</sup>	NR_113443	99	99	<i>Haloferax alexandrinus</i> TM <sup>T</sup>	AB037474	99	100
ME11	MN134044	1375	<i>Halopiger salifodinae</i> KCY07-B2	NR_109660	96	99	<i>Halopiger salifodinae</i> KCY07-B2 <sup>T</sup>	JX014296	96	100
ME16	MN134045	1377	<i>Haloferax alexandrinus</i> JCM 10717 <sup>T</sup>	NR_113438	100	99	<i>Haloferax volcanii</i> DS2 <sup>T</sup>	CP001956	99	100
ME17	MN134046	1354	<i>Haloferax lucentense</i> JCM 9276 <sup>T</sup>	NR_113443	100	99	<i>Haloferax alexandrinus</i> TM <sup>T</sup>	AB037474	99	100
F3	MN134047	1287	<i>Haloferax mediterranei</i> ATCC 33500 <sup>T</sup>	CP039139	99	98	<i>Haloferax mediterranei</i> CGMCC 1.2087 <sup>T</sup>	CP001868	98	100
AW3	MN134048	1240	<i>Halorubrum ezzemoulense</i> Fb21	CP034940	99	95	<i>Halorubrum ezzemoulense</i> 5.1 <sup>T</sup>	DQ118426	97	97
BT9	MN134049	1314	<i>Haloarcula marismortui</i> ATCC 43049 <sup>T</sup>	CP039138	98	99	<i>Haloarcula marismortui</i> ATCC 43049 <sup>T</sup>	AY596297b	98	100
EZ2	MN134050	1303	<i>Halorubrum ezzemoulense</i> Fb21	CP034940	99	99	<i>Halorubrum californiense</i> SF3 213 <sup>T</sup>	EF139654	98	100
EZ38	MN134051	1322	<i>Haloferax mediterranei</i> ATCC 33500 <sup>T</sup>	CP039139	99	98	<i>Haloferax mediterranei</i> CGMCC 1.2087 <sup>T</sup>	CP001868	98	100
BS5	MN134052	1250	<i>Haloterrigena thermotolerans</i> PR5 <sup>T</sup>	NR_028173	99	100	<i>Haloterrigena thermotolerans</i> PR 5 <sup>T</sup>	AF115478	99	100
ME6	MN134053	1288	<i>Halogeometricum borinquense</i> DSM 11551 <sup>T</sup>	CP001690	99	98	<i>Halogeometricum borinquense</i> DSM 11551 <sup>T</sup>	ABTX01000001	98	100
F4	MN134054	1290	<i>Halogeometricum borinquense</i> DSM 11551 <sup>T</sup>	CP001690	100	99	<i>Halogeometricum borinquense</i> DSM 11551 <sup>T</sup>	ABTX01000001	98	100
BT4	MN134055	1358	<i>Halorubrum ezzemoulense</i> Fb21	CP034940	99	99	<i>Halorubrum californiense</i> SF3 213 <sup>T</sup>	EF139654	99	100
AW21	MN134056	1376	<i>Halorubrum ezzemoulense</i> Fb21	CP034940	99	99	<i>Halorubrum californiense</i> SF3 213 <sup>T</sup>	EF139654	98	100
SB3	MN134057	1359	<i>Haloarcula argentinensis</i> arg-1	NR_028218	98	100	<i>Haloarcula salaria</i> HST01-2R <sup>T</sup>	FJ429317	98	100
AW13	MN134058	1375	<i>Natrinema pellirubrum</i> DSM 15624 <sup>T</sup>	NR_113528	99	99	<i>Natrinema pellirubrum</i> DSM 15624 <sup>T</sup>	AGIN01000009	99	100
SB1	MN134059	1360	<i>Haloarcula marismortui</i> JCM 8966 <sup>T</sup>	NR_112711	99	100	<i>Haloarcula marismortui</i> ATCC 43049 <sup>T</sup>	AY596297	99	100
ME21	MN134060	1337	<i>Haloarcula argentinensis</i> JCM 9737 <sup>T</sup>	LC198789	99	100	<i>Haloarcula marismortui</i> ATCC 43049 <sup>T</sup>	AY596297	99	100
ME1	MN134061	1357	<i>Halorubrum ezzemoulense</i> Fb21	CP034940	100	100	<i>Halorubrum californiense</i> SF3 213 <sup>T</sup>	EF139654	99	100
BT8	MN13463	1361	<i>Haloarcula argentinensis</i> JCM 9737 <sup>T</sup>	LC198789	99	100	<i>Haloarcula hispanica</i> ATCC 33960 <sup>T</sup>	CP002921	99	100
BT7	MN13464	1357	<i>Haloarcula marismortui</i> ATCC 43049 <sup>T</sup>	CP039138	99	100	<i>Haloarcula marismortui</i> ATCC 43049 <sup>T</sup>	AY596297	99	100
BT2	MN13465	1350	<i>Haloarcula marismortui</i> ATCC 43049 <sup>T</sup>	CP039138	99	100	<i>Haloarcula marismortui</i> ATCC 43049 <sup>T</sup>	AY596297	99	100
BT1	MN13466	1367	<i>Haloarcula marismortui</i> ATCC 43049 <sup>T</sup>	CP039138	99	99	<i>Haloarcula marismortui</i> ATCC 43049 <sup>T</sup>	AY596297	99	100
BS8	MN13467	1360	<i>Haloterrigena thermotolerans</i> PR5 <sup>T</sup>	NR_028173	99	100	<i>Haloterrigena thermotolerans</i> PR 5 <sup>T</sup>	AF115478	99	100
BS7	MN13468	1381	<i>Haloterrigena thermotolerans</i> PR5 <sup>T</sup>	NR_028173	99	99	<i>Haloterrigena thermotolerans</i> PR 5 <sup>T</sup>	AF115478	99	100
AW9	MN13469	1358	<i>Halorubrum ezzemoulense</i> Fb21	CP034940	99	100	<i>Halorubrum californiense</i> SF3 213 <sup>T</sup>	EF139654	99	100
AW19	MN13470	1358	<i>Halorubrum ezzemoulense</i> Fb21	CP034940	99	100	<i>Halorubrum californiense</i> SF3 213 <sup>T</sup>	EF139654	99	100
AW8	MN13471	1357	<i>Halorubrum ezzemoulense</i> Fb21	CP034940	99	100	<i>Halorubrum californiense</i> SF3 213 <sup>T</sup>	EF139654	99	100
ME13	MN13472	1354	<i>Haloarcula hispanica</i> JCM 891 <sup>T</sup>	LC085245	99	100	<i>Haloarcula hispanica</i> ATCC 33960 <sup>T</sup>	CP002921	99	100
ME22	MN13473	1366	<i>Halogeometricum borinquense</i> DSM 11551 <sup>T</sup>	CP050274	99	99	<i>Halogeometricum borinquense</i> DSM 11551 <sup>T</sup>	ABTX01000001	99	100
ME15	MN13462	1351	<i>Halorubrum ezzemoulense</i> Fb21	CP034940	100	100	<i>Halorubrum californiense</i> SF3 213 <sup>T</sup>	EF139654	99	100
AW5	MN241524	1285	<i>Halorubrum rubrum</i> YC87 <sup>T</sup>	NR125609	97	95	<i>Halorubrum rubrum</i> YC87 <sup>T</sup>	JQ237124	97	100
AW23	MN241529	1358	<i>Halorubrum ezzemoulense</i> Fb21	CP034940	99	100	<i>Halorubrum californiense</i> SF3 213 <sup>T</sup>	EF139654	99	100
F1	MN241525	1358	<i>Natrinema altunense</i> CEJGTEA101	KY129977	99	100	<i>Natrinema altunense</i> AJ2 <sup>T</sup>	JNCS01000019	99	100
F2	MN241527	1366	<i>Natrinema altunense</i> JCM 12890 <sup>T</sup>	NR_113524	99	99	<i>Natrinema altunense</i> AJ2 <sup>T</sup>	JNCS01000019	99	100
ME3	MN241530	1049	<i>Halogeometricum borinquense</i> DSM 11551 <sup>T</sup>	CP001690	99	99	<i>Halogeometricum borinquense</i> DSM 11551 <sup>T</sup>	ABTX01000001	98	100
SB4	MN241528	1295	<i>Natrinema altunense</i> CEJGTEA101	KY129977	99	99	<i>Natrinema altunense</i> AJ2 <sup>T</sup>	JNCS01000019	99	100

NA: numéro d'accèsion ; TS : taille des séquences ; pb : paire de bases ; sim.: similarité ; couv.: couverture ; ENA : European Nucleotide Archive ; DDBJ : DNA Data Bank of Japan ; DSM : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen ; ATCC : American Type Culture Collection ; JCM : Japan Collection of Microorganisms ; CGMCC : China General Microbiological Culture Collection Center ; T : souche type

### 6.2.1. Alignement avec les séquences nucléotidiques des banques de données biologiques

Les séquences obtenues ont été alignées avec celles des souches de référence présentes dans les banques de données biologiques ENA/Genbank/DDBJ version 09-2020 et EzBioCloud version 05-2020. Les résultats d'alignement sont représentés dans le tableau 17, et sont exprimés en pourcentage de similarité de la souche à identifier avec la souche la plus proche sur chaque base de données.

Le résultat sur ENA/Genbank/DDBJ correspond à la souche cultivée présentant le taux de similarité le plus élevé avec la séquence requête. Quant au résultat sur EzBioCloud, il représente la souche type de l'espèce ayant le maximum de similarité.

Les taux de couverture des séquences requêtes par les alignements sont compris entre 95 et 100 %, ce qui indique selon Benson *et al.* (2018) une bonne qualité des séquences obtenues. Les taux de similarité entre nos souches et celles des banques de données biologiques vont de 96 % à 100 %. Les souches ayant des taux de similarité inférieurs à 98,7 % pourraient représenter selon Yarza *et al.* (2014) de nouvelles espèces. Cependant, il est aussi possible que le fragment d'ADN amplifié n'ait pas une taille suffisante pour une identification précise. Il serait donc nécessaire d'effectuer une étude d'homologie ADN-ADN afin de confirmer l'identification de ces souches.

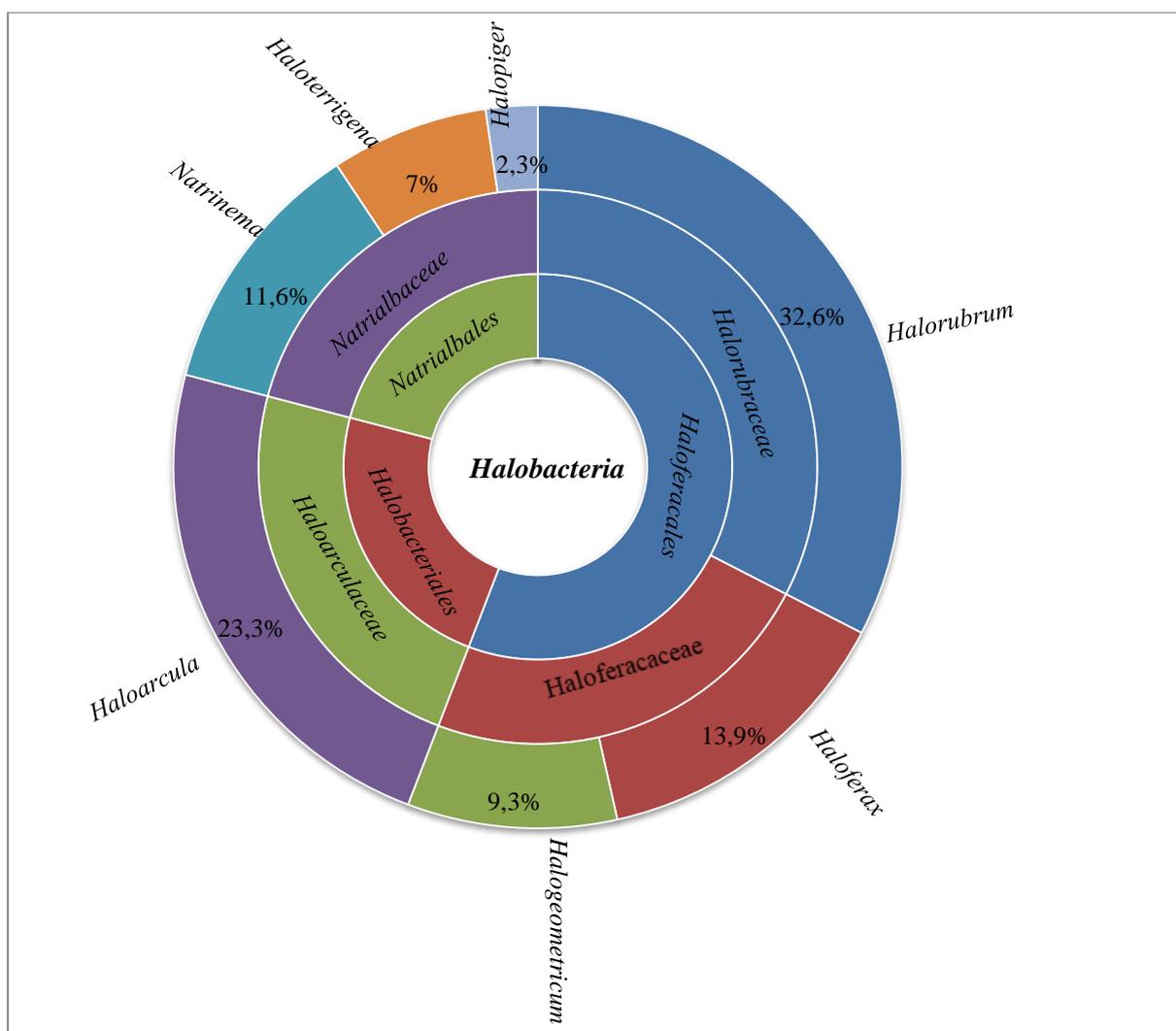
Ainsi, les résultats du séquençage ont indiqué que les 43 souches étudiées sont affiliées à sept genres archéens différents appartenant à quatre familles de la classe *Halobacteria*: *Halorubraceae*, *Haloarculaceae*, *Haloferacaceae* et *Natrialbaceae*.

Sur l'ensemble des isolats, *Halorubrum* est le genre dominant (32,6 %), suivi par *Haloracula* (23,3 %), *Haloferax* (13,9 %), *Natrinema* (11,6 %), *Halogeometricum* (9,3 %), *Haloterrigena* (7 %) puis *Halopiger* (2,3 %) (Figure 26).

Les isolats appartenant au genre *Halorubrum* ont été isolés à partir de tous les sites étudiés, à l'exception du chott Frain. Ils sont liés aux espèces *Halorubrum californiense*, *Halorubrum sodomense*, *Halorubrum trapanicum*, *Halorubrum ezzemoulense*, *Halorubrum rubrum*, *Halorubrum chaoviator* et *Halorubrum terrestre*.

Les souches affiliées au genre *Haloarcula* ont été les plus isolées à partir de la sebkha Bethioua. Elles sont affiliées aux espèces *Haloarcula marismortui*, *Haloarcula hispanica*, *Haloarcula salaria* et *Haloarcula argentinensis*.

Les souches incluses dans le genre *Haloferax* proviennent de la sebkha Ezzemoul, du chott Frain et du chott Melghir, elles sont liées aux espèces *Haloferax alexandrinus*, *Haloferax mediterranei*, *Haloferax volcanii* et *Haloferax lucentense*.



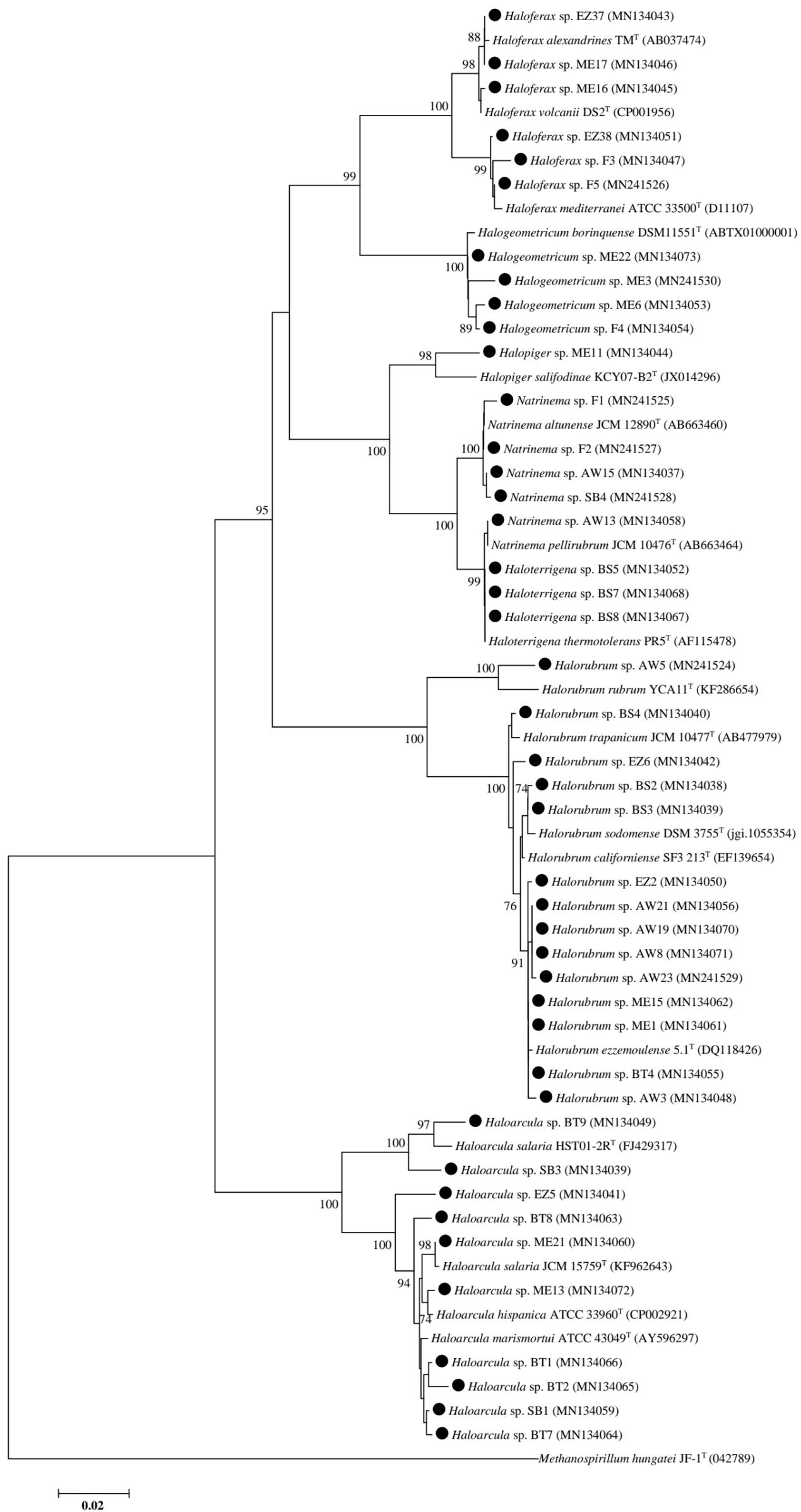
**Figure 26.** Distribution des souches étudiées parmi les différents genres identifiés.

Deux espèces rattachées au genre *Natrinema* ont été détectées : *Natrinema pellirubrum* et *Natrinema altunense*. Tandis que le genre *Halogeometricum* a été représenté par une seule espèce *Halogeometricum borinquense*. Ces souches proviennent du chott Frain, d'Ain Oulmene et du chott Melghir.

Les souches appartenant au genre *Haloterrigena* ont été exclusivement isolées à partir de la sebka Bazer Sakra, elles sont affiliées à l'espèce *Haloterrigena thermotolerans*.

Une seule souche appartenant au genre *Halopiger* a été isolée à partir du chott Melghir, elle est liée à l'espèce *Halopiger salifodinae*.

Toutes ces espèces sont décrites comme étant halophiles extrêmes et aérobies. Elles ont été isolées à partir d'environnements hypersalins très variables: lacs salés, marais salants, sebka, la mer Morte, sols salés, sels marins et aliments fermentés (Ventosa et de la Haba, 2017 ; Oren, 2018, Oren et Montalvo-Rodríguez, 2018 ; Minegishi et Kamekura, 2019a, 2019b ; Ventosa et al., 2019).



**Figure 27.** Arbre phylogénétique construit avec la méthode du *Neighbor Joining* et basé sur les séquences du gène de l'ARNr 16S des 43 souches étudiées (marquées par des cercles noirs) et de 16 souches types proches. Les numéros d'accès des séquences sur ENA/Genbank/DDJB sont indiqués entre parenthèses. Les valeurs du *bootstrap* supérieures à 70 % sont montrées sur les nœuds correspondants. La séquence du gène codant l'ARNr 16S de *Methanospirillum hungatei* JF-1<sup>T</sup> est utilisée comme *out group*.

### 6.2.2. Analyse phylogénétique

Les liens phylogénétiques entre nos isolats et les souches types des espèces les plus proches sont représentés dans la figure 27.

L'arbre phylogénétique basé sur le gène de l'ARNr 16S a été construit par la méthode du *Neighbor Joining* et vérifiée avec un test de *Bootstrap* impliquant 1000 répliques. La séquence du gène de l'ARNr 16S de la souche *Methanospirillum hungatei* JF-1T a été utilisée comme groupe externe. Les valeurs élevées du test *Bootstrap* au niveau des nœuds représentant le genre permettent de confirmer l'appartenance des 43 souches étudiées aux sept genres archéens cités en section 6.2.1.

Afin de confirmer le résultat obtenu avec cette méthode, un deuxième arbre a été construit avec une autre méthode celle du maximum de vraisemblance. Le résultat obtenu représenté dans la figure 28 (Annexe 2) est similaire à celui obtenu avec la première méthode.

En terme général, la variabilité des *Archaea* halophiles extrêmes isolées à partir des sites étudiés est comparable à celle observée lors d'études menées par méthodes culturales dans des lacs hypersalés au Chili (Lizama *et al.*, 2001), en Espagne (Ochsenreiter *et al.*, 2002 ; Luque *et al.*, 2012), en Turquie (Birbir *et al.*, 2006 ; Ozcan *et al.*, 2007 ; Yildiz *et al.*, 2012), en Chine (Xu *et al.*, 2007), en Iran (Rasooli *et al.*, 2016 ; Naghoni *et al.*, 2017), en Roumanie (Baricz *et al.*, 2015) et en Algérie. Une étude menée par Hacène *et al.* (2004) sur la diversité procaryotique du lac d'El Gloea a révélé la présence de sept genres : *Haloferax*, *Haloarcula*, *Natrinema*, *Halobacterium*, *Halococcus*, *Natronobacterium* et *Natronococcus*. En 2007, Kharroub a rapporté l'isolement des genres *Halorubrum*, *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Haloferax*, et *Haloterrigena* à partir de la sebkha d'Ezzemoul. Une autre étude réalisée par Kharroub *et al.* (2014) a indiqué que les isolats récoltés à partir des deux sebkhas Ezzemoul et Bethioua et du chott Melghir sont affiliés à sept genres : *Halorubrum*, *Haloterrigena*, *Halogeometricum*, *Halobacterium*, *Haloferax*, *Halomicrobium* et *Haloarcula*. Quarante-trois souches haloarchéennes ont été isolées par Quadri *et al.* (2016) à partir de sols salés sahariens. Ces souches ont été affiliées aux genres *Halorubrum*, *Haloarcula*, *Haloferax*, *Halogeometricum*, *Natrinema*, *Halopiger*, *Haloterrigena*, *Natrialba*, *Halostagnicola* et *Natronococcus*. Menasria *et al.* (2018), ont isolé à partir de sept chotts et sebkhas situés dans les hauts plateaux sétifiens et le Sahara algérien les genres *Haloarcula*, *Haloferax*, *Halogeometricum*, *Haloterrigena*, *Natrinema*, *Natrialba* et *Halococcus*.

Cependant, les groupes dominants diffèrent d'une étude à l'autre. Dans notre étude, *Halorubrum* est le genre présent. Une telle dominance a été rapportée par plusieurs auteurs (Lizama *et al.*, 2001 ; Ochsenreiter *et al.*, 2002 ; Birbir *et al.*, 2006 ; Kharroub, 2007 ; Ozcan *et*

*al.*, 2007 ; Xu *et al.*, 2007 ; Caton *et al.*, 2009 ; Yildiz *et al.*, 2012 ; Kharroub *et al.*, 2014 ; Rasooli *et al.*, 2016 ; Naghoni *et al.*, 2017). En revanche, d'autres auteurs ont rapporté que *Haloferax* était le genre dominant (Luque *et al.*, 2012 ; Baricz *et al.*, 2015 ; Menasria *et al.*, 2018). Alors que Hacéne *et al.* (2004) et Quadri *et al.* (2016), ont signalé la dominance de *Halobacterium* et de *Natrinema*, respectivement.

L'abondance des souches appartenant au genre *Halorubrum* peut être expliquée par le fait qu'ils soient plus adaptés aux conditions environnementales par rapport à d'autres groupes. En outre, il a été rapporté que de nombreuses espèces possèdent la bactériorhodopsine qui capte la lumière et la convertit en énergie chimique via la photosynthèse, fournissant ainsi de l'énergie supplémentaire pour la croissance et la prolifération des cellules (Oren, 2002b).

En revanche, Elvie Bardavid *et al.* (2008) rapportent que la dominance des souches appartenant aux genres *Halorubrum* est attribuée à la facilité de leur isolement dans les conditions de laboratoire plutôt qu'à leur forte prévalence dans leur milieu naturel. Ce constat a été confirmé par plusieurs études métagénomiques qui ont rapporté que l'espèce *Haloquadratum walsbyi* représente une fraction majoritaire des communautés archéennes dans plusieurs environnements hypersalins. Cette différence pourrait donc être expliquée par la facilité d'isolement de certains genres et la difficulté ou l'impossibilité de cultiver d'autres groupes taxonomiques (Oh *et al.*, 2010 ; Fernández *et al.*, 2014 ; Çinar *et al.*, 2016 ; Gómez-Villegas *et al.*, 2018).

La modification des conditions d'isolement pourrait conduire à une plus grande réussite de la culture. Il a été démontré que la réduction de l'inoculum de l'échantillon et l'utilisation de faibles concentrations en nutriments augmentent le taux de la réussite de culture en raison de la concurrence réduite (Burns et Dyal-Smith, 2006). Aussi, l'ensemencement direct de l'échantillon avec des périodes d'incubation prolongées permet de récupérer des fractions importantes des groupes microbiens dominants dans les sols ou les eaux salins (Dyal-Smith et Oren, 2006).

À noter également que l'abondance de certains genres aux dépens d'autres peut être liée à la capacité de certaines souches à produire les halocines. Il s'agit de peptides antimicrobiens doués d'une activité antagoniste vis-à-vis de souches phylogénétiquement proches des souches productrices, intervenant ainsi dans les phénomènes de compétitions intra- et interspécifiques pour les nutriments ou pour l'espace (Gómez-Villegas *et al.*, 2018 ; Kumar et Tiwari, 2019). Nos résultats ont révélé une variabilité des genres d'un site à un autre. Chott Melghir est le plus diversifié en termes de nombre de genres isolés, tandis que la plus faible diversité a été trouvée dans Bazer Sakra et Bethioua. Ce contraste entre les sites étudiés

pourrait être attribué à la différence de la salinité, l'augmentation de cette dernière a été accompagnée d'une augmentation de la diversité haloarchéenne. Des observations similaires ont été signalées lors d'études menées par méthodes culturales et non culturales dans des lacs hypersalins en Slovénie (Pašić *et al.*, 2005), au Brésil (Clementino *et al.*, 2008), en Tunisie (Baati *et al.*, 2010), en Espagne (Luque *et al.*, 2012) et en Roumanie (Baricz *et al.*, 2015).

Cependant et en dehors de la salinité, d'autres facteurs environnementaux comme le pH, la température, la teneur en O<sub>2</sub> dissous, l'ensoleillement ou la présence de composés toxiques peuvent aussi avoir un fort impact sur la diversité des communautés microbiennes dans un environnement hypersalin (Ventosa, 2006). C'est le cas la sebkha de Bazer Sakra qui, en dépit de sa salinité élevée, a révélé la plus faible diversité culturelle. Ceci pourrait être expliqué par l'effet de la pollution, étant donné que cette sebkha est, principalement alimentée par des eaux usées industrielles hautement polluées, ce qui limitera le nombre d'espèces capables de s'adapter à cet environnement (Baaziz, 2012).

## 7. Caractérisation des caroténoïdes des souches sélectionnées

### 7.1. Analyse des caroténoïdes extraits par méthodes chromatographiques

Quatre souches ayant des taux de production de caroténoïdes élevés et représentant 4 genres différents ont été sélectionnées pour l'étude de leurs caroténoïdes. Il s'agit des souches *Halorubrum* sp. BS2 ; *Halogeometricum* sp. ME3 ; *Haloarcula* sp. BT9 et *Haloferax* sp. ME16. À signaler que les souches appartenant aux genres *Haloterrigena*, *Natrinema* et *Halopiger* n'ont pas été retenues parmi cette sélection en raison de leur production des caroténoïdes, qui est significativement inférieure à celle des souches retenues ( $p < 0,0001$ ).

La production des caroténoïdes par les souches sélectionnées a été réalisée sur milieu de culture MGM liquide dans des conditions de croissance (pH, température et salinité) optimales. Après la période d'incubation, l'extraction a été effectuée par un solvant organique.

En général, le choix du solvant organique à utiliser pour l'extraction dépend de la nature et de la solubilité de la molécule à extraire. Dans notre cas, les solvants choisis doivent avoir un point d'ébullition faible afin de minimiser la température d'extraction et d'être adaptés à la polarité des caroténoïdes (Machmudah et Goto, 2013). Ainsi, nous avons opté pour l'utilisation du méthanol. Ce solvant a été utilisé dans plusieurs études s'intéressant aux caroténoïdes produits par les haloarchaea, et certaines ont rapporté qu'il est le plus efficace parmi d'autres solvants testés en termes de rapidité et d'efficacité de l'extraction (Mandelli *et*

*al.*, 2012 ; Pathak et Sardar, 2012 ; De la Vega *et al.*, 2016 ; Squillaci *et al.*, 2017 ; Oren *et al.*, 2018 ; Flores *et al.*, 2020).

Après extraction, les caroténoïdes présents dans les extraits bruts obtenus ont été séparés par chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC), utilisant une phase inverse C18. Cette technique est la méthode de choix pour la séparation et l'analyse des caroténoïdes extraits à partir de matrices biologiques (Amorim-Carilho *et al.*, 2014). La phase mobile utilisée est composée de deux solvants ; A : acétate d'éthyle et B : acétonitrile/eau (9:1, v/v). Pour avoir une bonne séparation, nous avons réalisé un gradient d'élution en diminuant au cours de l'analyse la polarité de l'éluant. En début d'analyse, la phase mobile est uniquement constituée du solvant B. Ensuite, la polarité de la phase mobile est modifiée par un gradient d'acétate d'éthyle. Dans ces conditions, les molécules sont éluées dans l'ordre décroissant de leur polarité.

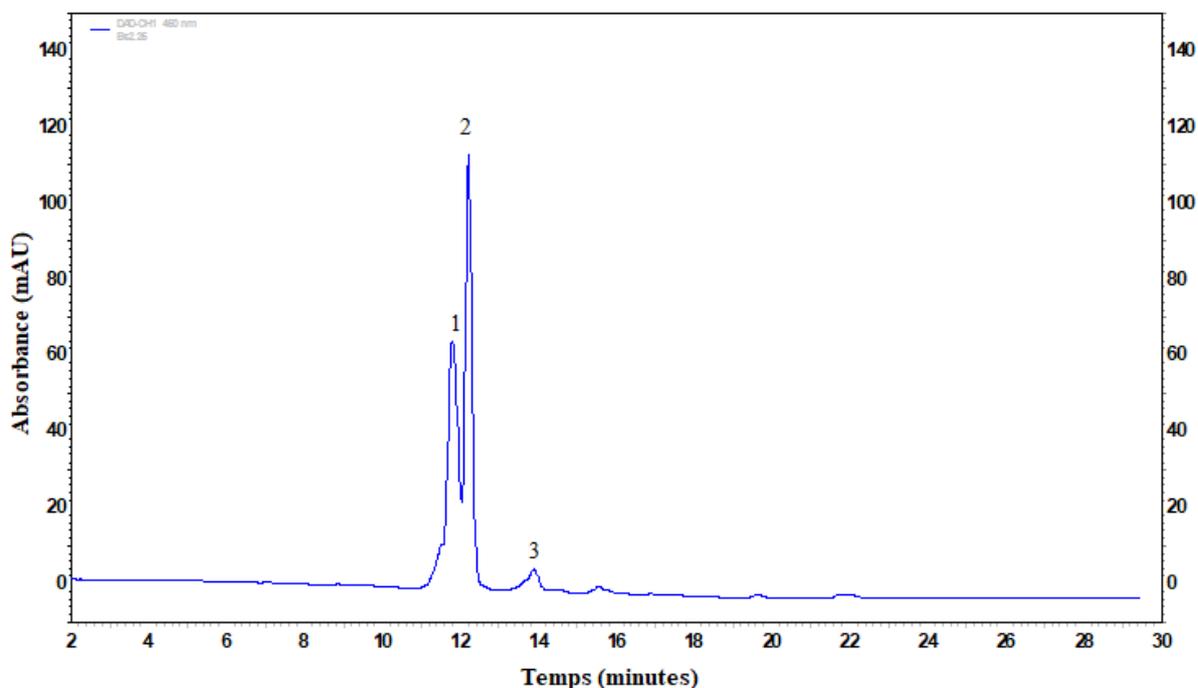
L'identification des caroténoïdes séparés a été réalisée en utilisant deux types de couplage chromatographique. Le premier consiste en une association avec un détecteur à barrettes de diodes (HPLC/DAD), il permet d'obtenir pour chaque pic d'élution, le spectre d'absorption visible, ce qui conduit à une première étape de caractérisation. Quant au deuxième type de couplage utilisé, il s'agit d'une combinaison à la spectrométrie de masse (LC/MS). Cette technique représente un outil efficace pour confirmer l'identité d'un composé caroténoïde en fournissant son spectre de masse.

### 7.1.1. Profil caroténoïdique de la souche *Halorubrum* sp. BS2

L'analyse des extraits de caroténoïdes de la souche *Halorubrum* sp. BS2 a permis l'obtention du chromatogramme présenté dans la figure 29. Les spectres d'absorption visibles et de masse de chacun des pics élués sont présentés dans la figure 30 (Annexe 2).

La comparaison de ces derniers avec ceux disponibles dans la littérature a permis d'attribuer le pic 1 caractérisé par un rapport m/z de 705 Th et des absorbances maximales à 463, 490 et 522 nm à la bisanhydrobactériorubérine. Les pics 2 et 3 possèdent le même rapport m/z (m/z = 741 Th) avec des absorbances maximales à 468, 497, 530 et 466, 494, 525 nm, respectivement. Ainsi, ils ont été attribués à la bactériorubérine (Britton *et al.*, 1995) (Tableau 18). Pareillement, De La Vega *et al.* (2016) ont trouvé que les principaux caroténoïdes produits par la souche *Halorubrum* sp. SH1 sont la bactériorubérine, la bisanhydrobactériorubérine et la trisanhydrobactériorubérine Hamidi *et al.* (2017) ont rapporté de leur côté que l'extrait caroténoïdique de la souche *Halorubrum* sp. TBZ112 était composé de la bactériorubérine, du lycopène et du  $\beta$ -carotène.

Bien que les longueurs d'onde maximales ( $\lambda_{\max}$ ) des deux composés de la bactériorubérine soient différentes, l'allure de leur spectre d'absorption est similaire. En effet, le shift de  $\lambda_{\max}$  de quelques nanomètres peut correspondre à des isomères cis/trans (Britton *et al.*, 1995).



**Figure 29.** Chromatogramme obtenu après séparation, par HPLC, de l'extrait caroténoïdique de la souche *Halorubrum* sp. BS2.

**Tableau 18.** Caractéristiques des caroténoïdes produits par *Halorubrum* sp. BS2 d'après les résultats d'analyse par HPLC/DAD et LC/MS.

Pic	Tentative d'identification	TR (min)	Longueurs d'onde maximales d'absorption (nm)	Rapport m/z (Th)	Profils de fragmentation
1	BABR	12,20	463, 490, 522	705,4	673,5 ; 619,4 ; 579,1 ; 540,3 ; 487,4 ; 457,6 ; 439,1 ; 394,5 ; 315,2
2	BR	12,63	468, 497, 530	741,7	681,1 ; 624,4 ; 577,4 ; 542,1 ; 504,2 ; 444,7 ; 416,4 ; 352,5 ; 322,3
3	BR	14,26	466, 494, 525	741,6	723,3 ; 704,9 ; 683,5 ; 664,3 ; 625,5 ; 558,9 ; 531,2 ; 489,4 ; 457,1 ; 422,4 ; 389,2 ; 368,7 ; 328,1

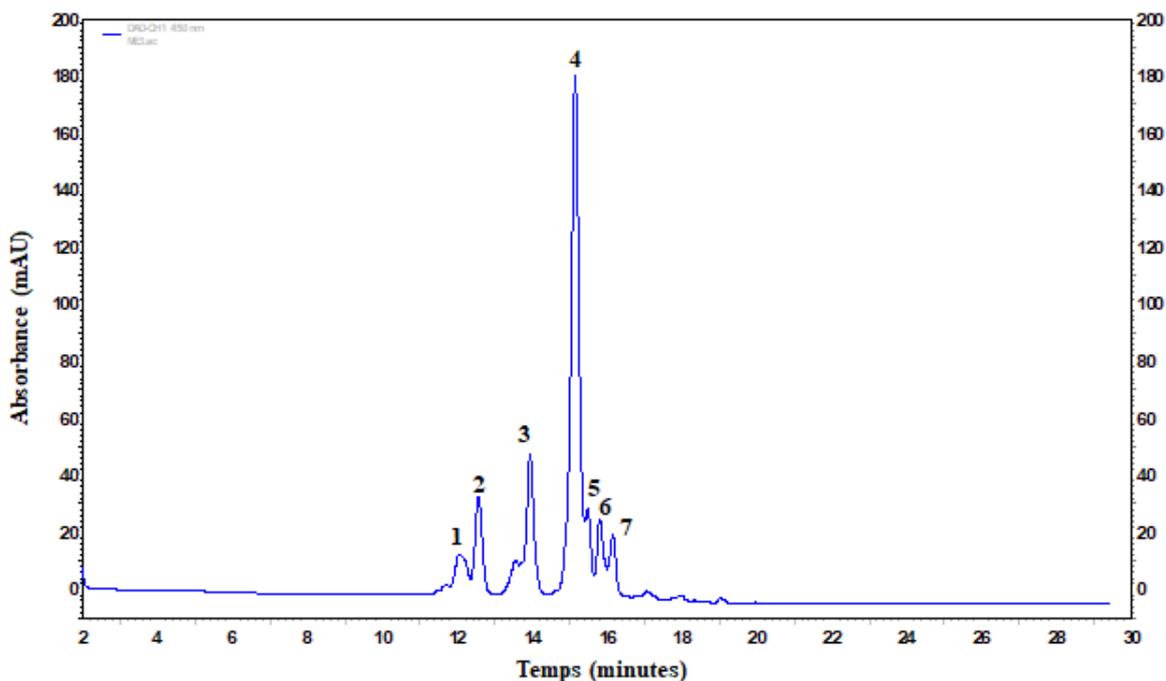
TR : temps de rétention, BR : Bactériorubérine, BABR : Bisanydrobactériorubérine, min : minute, Th : Thomson, nm : nanomètre.

### 7.1.2. Profil caroténoïdique de la souche *Halogeometricum* sp. ME3

L'analyse par HPLC de l'extrait caroténoïdique de la souche *Halogeometricum* sp. ME3 a donné un chromatogramme comportant 7 pics comme le montre la figure 31, reflétant ainsi la présence de divers caroténoïdes.

Les spectres d'absorption visibles et de masse de chacun des pics élués, représentés dans la figure 32 (Annexe 2) montrent que le pic 1 possède un rapport m/z de 705 Th et des absorbances maximales à 464, 490, 523 nm. Quant aux pics 2, 3, 4, 5 et 7, ils sont caractérisés par un rapport m/z situé entre 740 et 741 Th et des maxima d'absorption à environ 466, 495, 528 nm. Alors que le pic 6 possède un rapport m/z de 738 Th et des absorbances maximales à 466, 495, 528 nm (Tableau 19). En comparant nos résultats à ceux de la littérature, nous établissons que le pic 1 correspond à la bisanhydrobactériorubérine, les pics 2, 3, 4, 5 et 7 pourraient être identifiés comme des isomères de la bactériorubérine. Alors que le pic 6 est attribué à l'haloxanthine (Britton *et al.*, 1995 ).

Hou et Cui (2017), ont rapporté que les souches *Halogeometricum* sp. RO1-4 et *Halogeometricum* sp. RO1-6 accumulaient également la bactériorubérine, la bisanhydrobactériorubérine et la monoanhydrobactériorubérine.



**Figure 31.** Chromatogramme obtenu après séparation, par HPLC, de l'extrait caroténoïdique de la souche *Halogeometricum* sp. ME3.

**Tableau 19.** Caractéristiques des caroténoïdes produits par la souche *Halogetometricum* sp. ME3 d'après les résultats d'analyse par HPLC/DAD et LC/MS.

Pic	Tentative d'identification	TR (min)	Longueurs d'onde maximales d'absorption (nm)	Rapports m/z (Th)	Profils de fragmentation
1	BABR	12,41	464, 490, 523	705,5	673,5 ; 619,4 ; 579,1 ; 540,3 ; 487,4 ; 457,6 ; 439,1 ; 394,5 ; 315,2
2	BR	12,80	468, 497, 530	741,7	723,4 ; 683,7 ; 664,5 ; 646,0 ; 537,9 ; 484,2 ; 459,0 ; 425,2 ; 386,5 ; 346,1 ; 314,2
3	BR	14,44	468, 496, 530	741,3	648,5 ; 593,5 ; 561,8 ; 501,4 ; 450,8 ; 406,6
4	BR	15,84	466, 495, 528	741,2	689,4 ; 656,4 ; 632,4 ; 606,4 ; 577,4 ; 560,0 ; 523,9 ; 470,3 ; 429,1 ; 405,9 ; 384,1 ; 353,9
5	BR	16,17	465, 492, 524	740,6	705,8 ; 688,3 ; 642,7 ; 614,4 ; 568,2 ; 527,4 ; 468,0 ; 432,1 ; 379,9 ; 313,9
6	Haloxanthine	16,47	456, 482, 514	738,6	706,3 ; 687,2 ; 667,1 ; 604,4 ; 574,2 ; 526,4 ; 509,5 ; 477,3 ; 451,2 ; 411,2 ; 382,2 ; 347,6
7	BR	16,81	466. 494. 526	740,2	723,4 ; 701,4 ; 671,1 ; 604,4 ; 570,5 ; 508,5 ; 492,4 ; 439,2 ; 421,2 ; 383,6

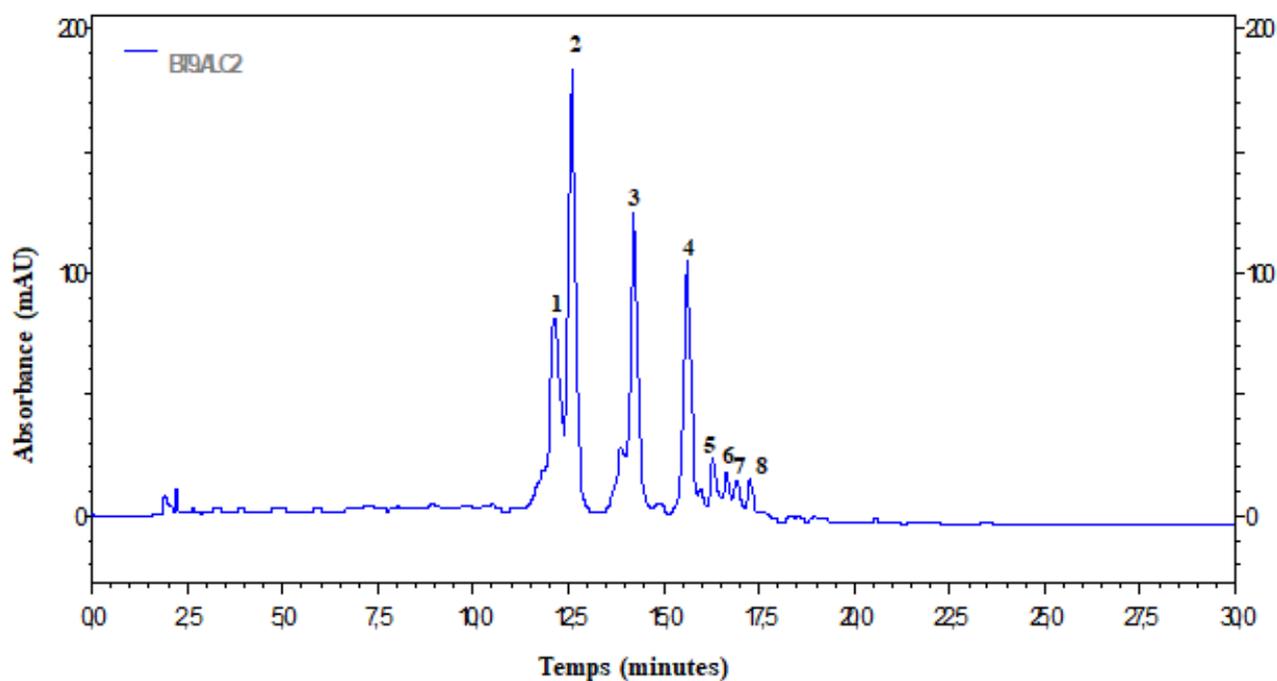
TR : temps de rétention ; BR : Bactériorubérine ; BABR : Bisanydrobactériorubérine, min : minute, Th : Thomson, nm : nanomètre.

### 7.1.3. Profil caroténoïdique de la souche *Haloarcula* sp. BT9

Le chromatogramme issu de l'analyse de l'extrait caroténoïdique de la souche *Haloarcula* sp. BT9 a révélé la présence de 8 pics (Figure 33). Les spectres d'absorption visibles présentés dans la figure 34 (Annexe 2) montrent que tous les composés sont caractérisés par des spectres d'absorption à trois pics majeurs situés sur l'intervalle 450-532 nm, correspondant ainsi à la bactériorubérine et à ses dérivées (Britton *et al.*, 1995). Les résultats de l'analyse par spectrométrie de masse (Figure 30 - Annexe 2) ont révélé que les pics 1, 2, 3 et 4 possédaient un rapport m/z de 740-741 Th et pourraient donc être attribués à la bactériorubérine. Les pics 5 (m/z=682 Th), 6 (m/z=701 Th) et 7 (m/z=720 Th) correspondent, respectivement à la trisanhydrobactériorubérine, la 3',4'-tétrahydrobisanydrobactériorubérine et la 3',4'-dihydromonoanydrobactériorubérine (Tableau 20) comme décrit dans littérature (Britton *et al.*, 1995 ; De la Vega *et al.*, 2016). Cependant, le pic 8 n'a pas pu être identifié. Bien que son spectre d'absorption présente les caractéristiques des caroténoïdes C<sub>50</sub>, son rapport m/z de 759 Th ne correspond à aucune de

ces molécules. Ceci pourrait être expliqué par une très faible intensité du signal par rapport au bruit.

Des études portant sur l'identification des caroténoïdes produits par la souche *Haloarcula japonica* JCM 7785<sup>T</sup> ont rapporté la présence de la bactériorubérine, la monoanhydrobactériorubérine, la bisanhydrobactériorubérine, l'isopentenylldéhydrorhodopine, et des traces du lycopène (Yatsunami *et al.*, 2014 ; Yang *et al.*, 2015).



**Figure 33.** Chromatogramme obtenu après séparation, par HPLC, de l'extrait caroténoïdique de la souche *Haloarcula* sp. BT9.

**Tableau 20.** Caractéristiques des caroténoïdes produits par la souche *Haloarcula* sp. BT9 d'après les résultats d'analyse par HPLC/DAD et LC/MS.

Pic	Tentative d'identification	TR (min)	Longueurs d'onde maximales d'absorption (nm)	Rapports m/z (Th)	Profils de fragmentation
1	BR	12,13	462, 490, 522	741,5	723,9 ; 664,5 ; 647,6 ; 606,8 ; 566,2 ; 536,8 ; 511,7 ; 475,4 ; 407,9 ; 371,4 ; 341,9 ; 312,9
2	BR	12,61	468, 497, 530	740,5	688,4 ; 664,0 ; 646,5 ; 601,4 ; 575,3 ; 517,8 ; 441,6 ; 389,1 ; 363,3 ; 317,6
3	BR	14,20	468, 497, 530	741,5	723,1 ; 665,4 ; 624,3 ; 577,3 ; 545,1 ; 507,5 ; 452,1 ; 428,0 ; 371,3 ; 353,3 ; 327,1
4	BR	15,62	468, 497, 530	741,5	705,1 ; 683,3 ; 625,4 ; 606,5 ; 564,2 ; 531,6 ; 508,9 ; 458,2 ; 409,2 ; 372,0 ; 339,0
5	TABR	16,31	457, 485, 517	682,2	662,9 ; 645,4 ; 604,5 ; 538,6 ; 510,5 ; 468,0 ; 424,5 ; 347,3 ; 321,1
6	3',4'-TH-BABR	16,66	446, 473, 503	701,6	681,9 ; 665,2 ; 624,5 ; 603,1 ; 568,7 ; 524,3 ; 444,3 ; 399,3 ; 361,1
7	3'4'-DH-MABR	16,91	455, 483, 515	720,9	691,4 ; 665,2 ; 626,9 ; 591,3 ; 550,5 ; 503,0 ; 469,8 ; 419,0 ; 358,1
8	ND	17,26	450, 480, 510	759,3	740,2 ; 701,6 ; 654,9 ; 629,4 ; 602,6 ; 577,5 ; 550,5 ; 509,6 ; 454,4 ; 414,7 ; 390,5 ; 328,2

TR : temps de rétention ; BR : Bactériorubérine, TABR : Trisanhydrobactériorubérine ; TH-BABR : Tétrahydrobis-anhydrobactériorubérine ; DH-MABR : Dihydromono-anhydrobactériorubérine, ND : non déterminé, min : minute, Th : Thomson, nm : nanomètre.

#### 7.1.4. Profil caroténoïdique de la souche *Haloferax* sp. ME16

L'analyse de l'extrait caroténoïdique de la souche *Haloferax* sp. ME16 a révélé la présence de 3 pics comme le montre la figure 35. La comparaison spectres d'absorption visibles et de masse de chacun des pics élués (Figure 36 – Annexe 2) à ceux de la littérature, a révélé que les pics 1 et 2 possédant un rapport m/z de 741 Th et des absorbances maximales à 465, 494, 522 nm et à 468, 497, 529 nm correspondent à la bactériorubérine. Quant au pic 3 ayant un rapport m/z de 722 Th et des absorbances maximales à 465, 494, 526 nm, il est attribué à la monoanhydrobactériorubérine (Tableau 21) selon Britton *et al.* (1995). La présence de ces deux caroténoïdes a été également observée chez les souches *Haloferax volcanii* DS2 et *Haloferax volcanii* CGMCC 1.2150 (Ronnekleiv et Liaaen-Jensen, 1995 ;

Hou et Cui, 2017). Alors que Fang *et al.* (2010) et Montero-Lobato *et al.* (2018), ont rapporté la présence de la bactériorubérine, la monoanhydrobactériorubérine, la bisanhydrobactériorubérine et l'isopentenyl-déhydrorhodopine chez la souche *Haloferax mediterranei* ATCC 33500<sup>T</sup>.

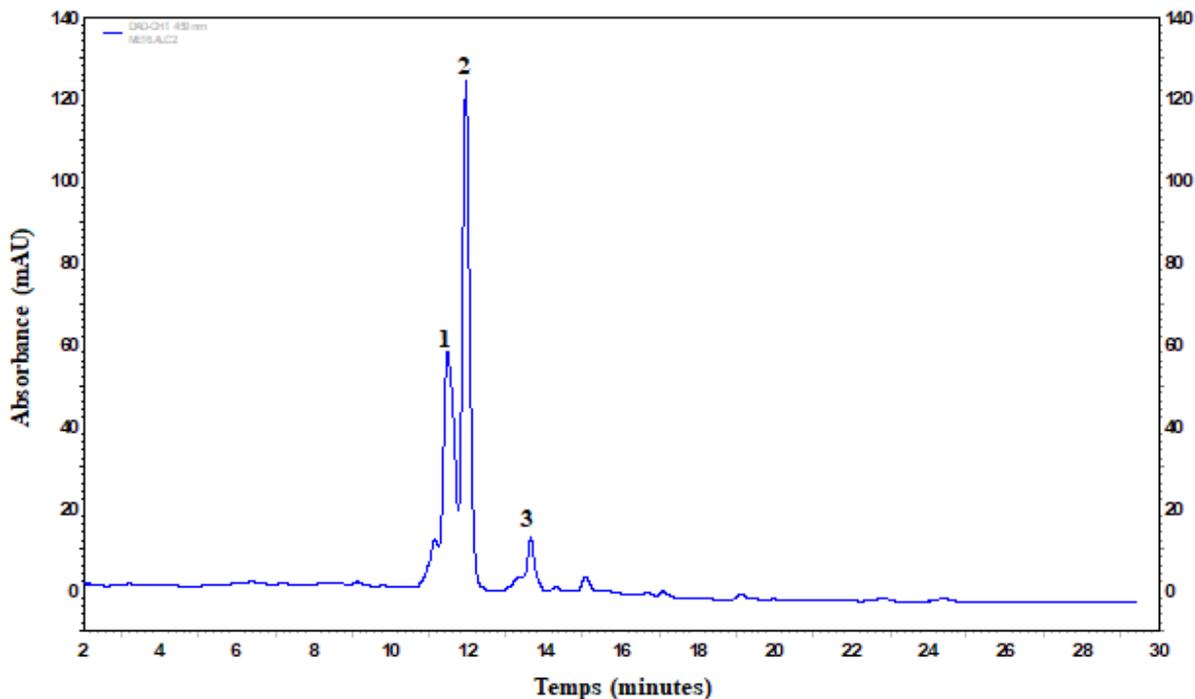


Figure 35. Chromatogramme obtenu après séparation, par HPLC, de l'extrait caroténoïdique de la souche *Haloferax* sp. ME16.

Tableau 21. Caractéristiques des caroténoïdes produits par la souche *Haloferax* sp. ME16 d'après les résultats d'analyse par HPLC/DAD et LC/MS.

Pic	Tentative d'identification	TR (min)	Longueurs d'onde maximales d'absorption (nm)	Rapports m/z (Th)	Profils de fragmentation
1	BR	12,02	464, 495, 522	741,5	723,7 ; 683,6 ; 606,3 ; 583,6 ; 559,8 ; 543,2 ; 502,3 ; 465,6 ; 420,3 ; 395,3 ; 353,3 ; 315,5
2	BR	12,48	468, 497, 529	741,8	723,4 ; 682,4 ; 665,5 ; 624,4 ; 569,5 ; 510,9 ; 462,1 ; 410,4 ; 339,1
3	MABR	14,18	465, 494, 526	722,7	643,3 ; 610,8 ; 571,6 ; 525,5 ; 482,2 ; 452,5 ; 406,2 ; 379,5 ; 361,3 ; 344,1

TR : temps de rétention ; BR : Bactériorubérine ; MABR : Monoanhydrobactériorubérine ? min : minute, Th : Thomson, nm : nanomètre.

L'analyse des extraits caroténoïdiques étudiés a révélé une variation de la composition en caroténoïdes en fonction de la souche. Toutefois, la bactériorubérine est le caroténoïde majeur accumulé par les quatre souches. Une telle dominance a été également rapportée dans des travaux portant sur les caroténoïdes produits par les *Archaea* halophiles extrêmes (Yatsunami *et al.*, 2014, De La Vega *et al.*, 2016 ; Hou et Cui, 2017 ; Montero-Lobato *et al.*, 2018 ; Squillaci *et al.*, 2018 ; Flores *et al.*, 2020). La bactériorubérine est un composé tétra-hydroxylé à 50 atomes de carbone, constituée d'une chaîne isoprénoïde avec une série de treize doubles liaisons conjuguées. Ce caroténoïde joue un rôle important dans l'adaptation des haloarchaea dans les environnements hypersalins. Il augmente la rigidité de la membrane en agissant comme un rivet intercellulaire grâce à la présence des groupements hydroxyles. Il accroît également la diffusion de l'oxygène et joue le rôle d'une barrière contrôlant la perméabilité à l'eau (Torregrosa-Crespo *et al.*, 2018 ; Giani *et al.*, 2019). La bisanhydrobactériorubérine (C<sub>50</sub>H<sub>72</sub>O<sub>2</sub>) a été détectée chez *Halorubrum* sp. BS2 et *Halogeometricum* sp. ME3. Ce composant est en fait la bactériorubérine ayant perdu deux molécules d'H<sub>2</sub>O. La monoanhydrobactériorubérine (C<sub>50</sub>H<sub>74</sub>O<sub>3</sub>) a été exclusivement trouvée chez *Haloferax* sp. ME16, il s'agit de la bactériorubérine dépourvue d'une molécule d'H<sub>2</sub>O (Britton, 1995 ; De la Vega *et al.*, 2016). La trisanhydrobactériorubérine (C<sub>50</sub>H<sub>70</sub>O) a été uniquement identifiée chez *Haloarcula* sp. BT9. C'est un composant mono-hydroxylé possédant quatorze doubles liaisons conjuguées (Rodrigo-Baños *et al.*, 2015). L'haloxanthine (C<sub>50</sub>H<sub>74</sub>O<sub>4</sub>) a été détectée chez *Halogeometricum* sp. ME3. Ce caroténoïde est un dérivé de la 3',4'-dihydromonoanhydrobactériorubérine, il est composé de douze doubles liaisons conjuguées et deux groupements hydroxyles. Il a été trouvé en faibles concentrations chez des *Archaea* halophiles extrêmes (Oren, 2002b ; Rodrigo-Baños *et al.*, 2015).

La 3',4'-dihydromonoanhydrobactériorubérine (C<sub>50</sub>H<sub>76</sub>O<sub>3</sub>) et la 3',4'-tétrahydrobisanhydrobactériorubérine (C<sub>50</sub>H<sub>76</sub>O<sub>2</sub>) ont été uniquement trouvées chez la souche *Haloarcula* sp. BT9. Le premier est un composé tri-hydroxylé constitué de douze doubles liaisons conjuguées. Quant au deuxième, ils possèdent deux groupements hydroxyles et onze doubles liaisons conjuguées (Britton, 1995 ; Oren, 2002b).

La variation de la composition en caroténoïdes des quatre extraits étudiés pourrait être expliquée par la différence génétique entre les souches productrices. Rodrigo-Baños *et al.* (2015) rapportent que les espèces d'*Archaea* halophiles extrêmes présentent toutes un profil caroténoïdique dominé par la bactériorubérine. Cependant la composition en d'autres caroténoïdes varie selon les espèces. Certains caroténoïdes sont présents exclusivement chez quelques espèces et peuvent être considérés comme des biomarqueurs de ces espèces. À titre

d'exemple, la 3',4'-époxymonoanhydrobactériorubérine a été uniquement identifiée chez *Haloferax volcanii* (Ronnekleiv et Liaaen-Jensen, 1995 ; Bidle *et al.*, 2007). Le cétocaroténoïde canthaxanthine est un autre exemple, il a été exclusivement détecté chez *Haloferax alexandrinus* (Asker *et al.*, 2002). À noter que les proportions des caroténoïdes halorchéens accumulés peuvent être influencées par certains facteurs tels que la composition nutritive du milieu de culture, la concentration en NaCl, l'intensité de la lumière, le taux d'oxygène, etc. (Rodrigo-Baños *et al.*, 2015). À titre d'exemples, Asker *et al.* (2002) ont trouvé que le profil caroténoïdiques de la souche *Haloferax alexandrinus* TM<sup>T</sup>, cultivée à 15% (p/v) de NaCl, est composé de ~74 % de la bactériorubérine et ses dérivés, de ~24 % de la canthaxanthine et de ~2 % du  $\beta$ -carotène. L'augmentation de la concentration en NaCl à 25 % (p/v) conduit à une réduction de la production de la bactériorubérine et ses dérivés à 60 % et à un accroissement de la production de la canthaxanthine et du  $\beta$ -carotène à ~36 % et ~4 %, respectivement.

### 7.2. Détermination du pouvoir antioxydant des caroténoïdes

Le potentiel antioxydant des extraits caroténoïdiques des souches sélectionnées a été évalué *in vitro* par deux tests couramment utilisés dans les études portant sur les caroténoïdes. Il s'agit du test de piégeage du radical libre DPPH<sup>•</sup> et du test de piégeage du radical cationique ABTS<sup>•+</sup>. La présence d'un antioxydant provoque la réduction de ces deux radicaux et par conséquent leur décoloration. Ainsi, la capacité des antioxydants présents dans le milieu réactionnel est inversement proportionnelle à l'intensité de la couleur (Re *et al.*, 1999 ; Dong-Sun Lee *et al.*, 2001).

À noter que peu de travaux ont été réalisés sur l'étude des propriétés antioxydantes des caroténoïdes produits par les haloarchaea (Mandelli *et al.*, 2012 ; Yatsunami *et al.*, 2014 ; Hou et Cui, 2017 ; Squillaci *et al.*, 2018).

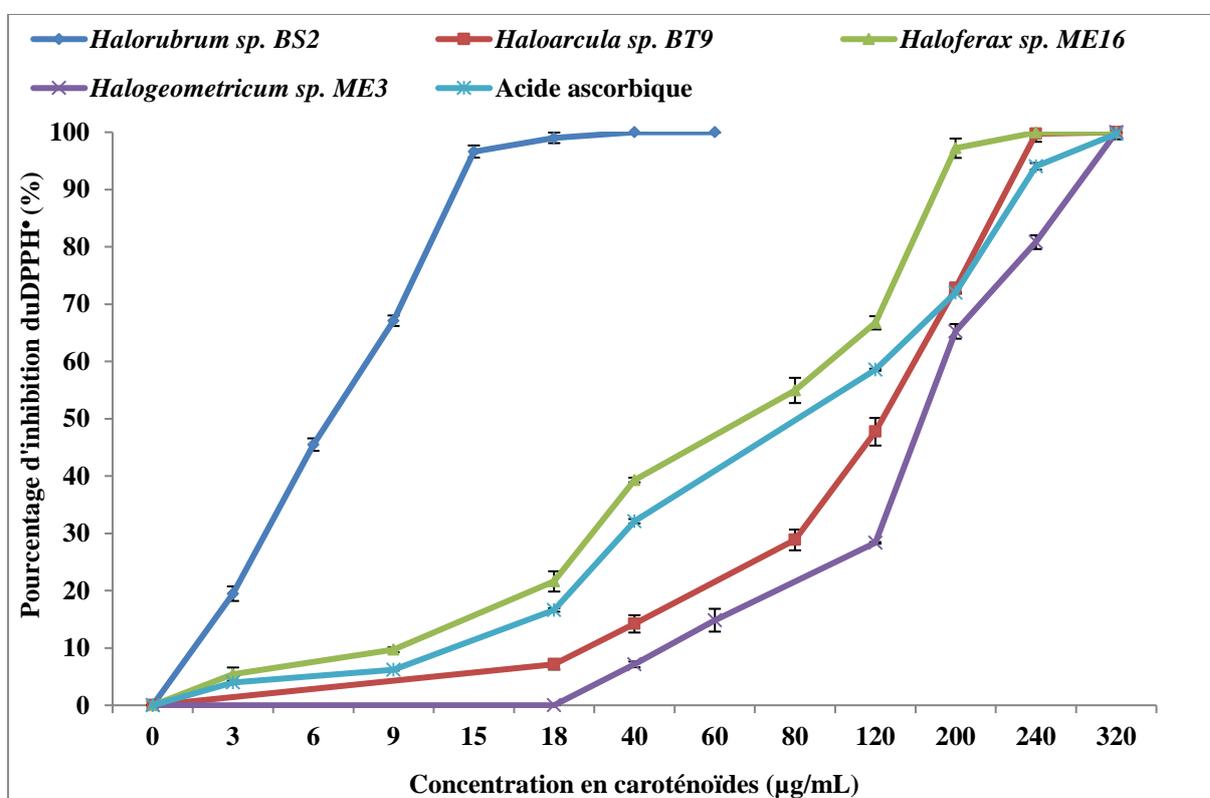
#### 7.2.1. Test DPPH

L'activité antioxydante des caroténoïdes vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical. La figure 37 illustre les courbes représentatives du pourcentage d'inhibition du radical en fonction des concentrations des extraits caroténoïdiques testés.

Les résultats obtenus montrent que tous les extraits testés possèdent une activité antiradicalaire dose-dépendante qui augmente avec l'augmentation de la concentration des caroténoïdes. L'extrait caroténoïdique de la souche *Halorubrum* sp. BS2 a montré un fort pouvoir antiradicalaire, il a inhibé  $99,02 \pm 0,92$  % du DPPH à une concentration de 18  $\mu\text{g/mL}$ .

Ce résultat est comparable à celui trouvé par Hou et Cui (2017) qui ont rapporté qu'à une concentration de 10 µg/mL, les extraits caroténoïdiques des souches *Haloplanus* sp. RO5-8, *Halogramum* sp. RO2-11 et *Haloferax volcanii* CGMCC 1.2150 inhibaient environ 90 % de ce radical.

Cependant, les extraits de nos souches *Haloarcula* sp. BT9 et *Haloferax* sp. ME16 ont atteint leur d'activité maximale à une concentration de 240 µg/mL avec des pourcentages d'inhibition de  $99,75 \pm 0,42$  % et de  $99,96 \pm 0,06$  %, respectivement. À cette même concentration, l'acide ascorbique utilisé comme référence a inhibé  $94,05 \pm 0,58$  % du DPPH. Quant à l'extrait de la souche *Halogeometricum* sp. ME3, il a montré un pourcentage d'inhibition de  $99,98 \pm 0,01$  % à la concentration de 320 µg/mL (Tableau 22- Annexe 2).



**Figure 37.** Pourcentage d'inhibition du radical DPPH\* en fonction des concentrations des extraits caroténoïdiques.

Pour mieux comparer les activités des différents extraits caroténoïdiques, les concentrations efficaces médianes (EC50) ont été déterminées à partir des courbes du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration des extraits, à l'aide du logiciel Graphpad Prism version 8.4.3 (Chen *et al.*, 2013). L'EC50 est un paramètre utilisé pour estimer l'activité antioxydante. Elle définit la concentration du substrat nécessaire pour diminuer 50 % de la

concentration initiale du radical. La valeur d'EC50 est inversement liée à la capacité antioxydante d'un composé (Barros *et al.*, 2007).

L'analyse de la variance ANOVA à un facteur a révélé une différence hautement significative ( $p < 0,0001$ ) entre les EC50 des différents échantillons (Tableau 23). Parmi les quatre extraits caroténoïdiques testés, l'extrait de la souche *Halorubrum* sp. BS2 est le plus actif avec une EC50 de l'ordre de  $6,09 \pm 0,13 \mu\text{g/mL}$ , valeur significativement inférieure à celles des autres extraits et même 10 fois inférieure à celle de l'acide ascorbique ( $69,95 \pm 0,21 \mu\text{g/mL}$ ).

**Tableau 23.** Valeurs d'EC50 d'activité antioxydante des extraits caroténoïdiques vis-à-vis du radical DPPH.

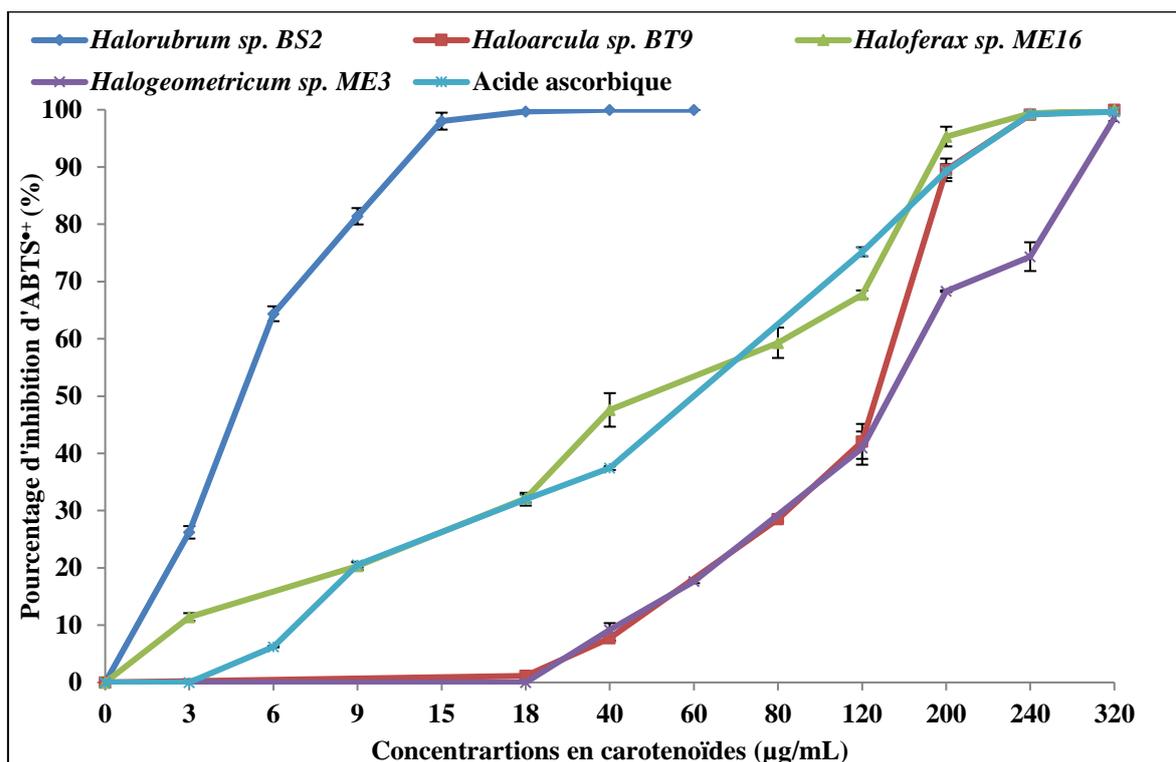
Extraits	EC50 ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>Halorubrum</i> sp.BS2	$6,09 \pm 0,13^a$
<i>Haloferax</i> sp.ME16	$56,69 \pm 1,97^b$
<i>Halogeometricum</i> sp.ME3	$170,4 \pm 0,52^c$
<i>Haloarcula</i> sp.BT9	$119,43 \pm 0,97^d$
Acide ascorbique	$69,95 \pm 0,21^c$

Les différentes lettres en exposant indiquent une différence hautement significative ( $p < 0,0001$ ).

### 7.2.2. Test ABTS

Le pouvoir antioxydant des extraits caroténoïdiques a été également évalué à l'encontre du radical cationique ABTS<sup>•+</sup>. La cinétique de la réduction de ce radical est représentée dans la figure 38.

En général, les résultats obtenus présentent des tendances similaires à celles observées pour le test DPPH. Tous les extraits caroténoïdiques testés ont présenté une activité antiradicalaire proportionnelle à l'augmentation de la concentration des caroténoïdes. L'extrait caroténoïdique de la souche *Halorubrum* sp. BS2 a montré une meilleure activité que ceux des autres souches. À seulement une concentration de  $18 \mu\text{g/mL}$ , il a inhibé  $99,96 \pm 0,06 \%$  du radical ABTS<sup>•+</sup>. Cependant, ce même pourcentage d'inhibition a été atteint avec une concentration de  $240 \mu\text{g/mL}$  pour les extraits caroténoïdiques des souches *Haloarcula* sp. BT9 et *Haloferax* sp. ME16 ainsi que pour l'acide ascorbique. Quant à l'extrait de la souche *Halogeometricum* sp. ME3, le pourcentage d'inhibition le plus important ( $98,58 \pm 0,56$ ) a été observé à  $320 \mu\text{g/mL}$  (Tableau 24- Annexe 2).



**Figure 38.** Pourcentage d'inhibition du radical ABTS\*+ en fonction des concentrations des extraits caroténoïdiques.

Les valeurs des EC50 ont présenté une différence hautement significative à  $p < 0,0001$  (Tableau 25). Comme pour le test DPPH, l'EC50 de l'extrait caroténoïdique de la souche *Halorubrum* sp. BS2 est significativement la plus faible ( $p < 0,0001$ ) par rapport aux autres extraits. Elle est de l'ordre de  $4,67 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$  contre  $41,43 \pm 0,83$  pour l'acide ascorbique. Cependant, celle de l'extrait de la souche *Haloferax* sp. ME16 est significativement la plus élevée avec une valeur de  $136,43 \mu\text{g/mL}$ .

La différence observée dans les valeurs des EC50 pourrait s'expliquer par la différence de la composition qualitative et quantitative entre les extraits. En effet, la réaction entre l'antioxydant et le radical libre dépend de la conformation structurale de l'antioxydant.

Miller *et al.* (1996) ont rapporté que la présence de groupements hydroxyles affecte positivement le mécanisme d'inhibition des radicaux libres en servant de donneur d'atomes d'hydrogène. Également, le pouvoir inhibiteur a tendance à augmenter avec le nombre de doubles liaisons conjuguées. Ces dernières délocalisent l'électron libre et créent une résonance qui stabilise le radical (Yang *et al.*, 2015).

**Tableau 25.** Valeurs d'EC50 d'activité antioxydante des extraits caroténoïdiques vis-à-vis du radical ABTS<sup>•+</sup>.

Extraits	EC50 (µg/mL)
<i>Halorubrum</i> sp.BS2	4,67 ± 0,02 <sup>a</sup>
<i>Haloferax</i> sp.ME16	39,66 ± 1,39 <sup>b</sup>
<i>Halogeometricum</i> sp.ME3	136,43 ± 5,08 <sup>d</sup>
<i>Haloarcula</i> sp.BT9	120,1 ± 3,15 <sup>c</sup>
Acide ascorbique	41,43 ± 0,83 <sup>b</sup>

Les différentes lettres en exposant indiquent une différence hautement significative ( $p < 0,0001$ ).

Les résultats des deux tests montrent clairement que les extraits caroténoïdiques des quatre souches archéennes possèdent une puissante activité à céder des protons pour neutraliser les radicaux libres, les transformant ainsi en molécules stables. Ces résultats sont conformes à ceux trouvés dans des études précédentes (Mandelli *et al.*, 2012 ; Yatsunami *et al.*, 2014 ; Hou et Cui, 2017 ; Squillaci *et al.*, 2018). Selon Leong et Shui (2002), tout composé ayant la capacité de neutraliser les radicaux libres DPPH et ABTS est considéré comme étant un excellent antioxydant.

D'une manière générale, les caroténoïdes exercent leur activité antioxydante par la désactivation d'espèces chimiques réactives comme les radicaux peroxyles et alkyles, selon des réactions de transfert d'électrons ou d'atomes d'hydrogène ou des réactions d'addition électrophile. Toutefois, le comportement antioxydant des caroténoïdes dépend de la pression partielle en oxygène. En effet, lorsque celle-ci est faible, ils agissent comme des antioxydants briseurs de chaînes qui capturent les radicaux peroxyles. Alors que dans un milieu où l'oxygène est présent en forte concentration, ils peuvent réagir avec l'oxygène et devenir pro-oxydants en produisant certains radicaux peroxyles de caroténoïdes (El-Agamey *et al.*, 2004 ; Young et Lowe, 2018).

Au vu des valeurs d'EC50 enregistrées, nous pouvons déduire que parmi les quatre extraits caroténoïdiques testés, ceux des souches *Halorubrum* sp. BS2 et *Haloferax* sp. ME16 possèdent une capacité antioxydante importante et significativement supérieure à celle trouvée pour l'antioxydant standard utilisé qui est l'acide ascorbique. Des résultats similaires ont été obtenus avec les caroténoïdes produits par la souche *Haloterrigena turkmenica* DMS-5511 qui ont montré une efficacité antioxydante plus élevée que celles de l'acide ascorbique,

de l' $\alpha$ -tocophérol et de l'hydroxytoluène butylé (BHT) (Squillaci *et al.*, 2018). Également, Mandelli *et al.* (2012) ont trouvé que les caroténoïdes extraits des souches *Halococcus morrhuae* ATCC 43280 et *Halobacterium salinarium* ATCC 33171 sont dotés d'un potentiel antioxydant supérieur à celui des caroténoïdes produits par la bactérie thermophile *Thermus filiformis*, avec des EC50 de l'ordre de 0,84 et 0,85  $\mu\text{g/mL}$ , respectivement. D'autres études réalisées par Yatsunami *et al.* (2014) et Hou et Cui (2017) ont rapporté que les extraits caroténoïdiques des souches *Haloplanus* sp. RO5-8, *Halogramum* sp. RO2-11, *Haloferax volcanii* CGMCC1.2150, et *Haloarcula japonica* JCM 7785<sup>T</sup> possèdent une activité antioxydante largement supérieure à celle du  $\beta$ -carotène.

En comparant les valeurs d'EC50 obtenues avec ceux rapportées dans de nombreux travaux, il s'avère que le pouvoir antioxydant des caroténoïdes produits par les souches archéennes étudiées est considérablement supérieur à celui des pigments produits par d'autres microorganismes. Hu *et al.* (2008), ont trouvé que la capacité antioxydante des caroténoïdes extraits de l'algue halophile *Dunaliella salina* est relativement faible avec une EC50 de l'ordre de  $8360 \pm 0,75 \mu\text{g/mL}$ . Rostami *et al.* (2016) ont rapporté que les caroténoïdes produits par la levure *Rhodotorula glutinis* possèdent une EC50 de  $555,5 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$ . Les valeurs des EC50 enregistrées pour les pigments extraits à partir des champignons *Fusarium* sp. FC1-3, *Exidia nigricans* et *Aspergillus terreus* sont de l'ordre de 1620, 1000 et 199  $\mu\text{g/mL}$ , respectivement (Manon Mani *et al.*, 2015 ; Sreedevi et Pradeep, 2017 ; Łopusiewicz, 2018). D'autres travaux s'intéressant au potentiel antioxydant des pigments bactériens ont rapporté que les pigments produits par *Sphingomonas paucimobilis*, *Microbacterium arborescens*, *Micrococcus roseus* et *Pedobacter* sp. possèdent des EC50 de l'ordre de 3100, 4800,  $572,5 \pm 0,15$  et  $720 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$ , respectivement (Correa-Llantén *et al.*, 2012 ; Rostami *et al.*, 2016 ; Jayaraman *et al.*, 2019).

Ce fort potentiel antioxydant des caroténoïdes haloarchéens est lié à leur structure. En plus de la présence de groupements hydroxyles qui servent de donneurs de protons, ces molécules possèdent un nombre important de doubles liaisons conjuguées. À titre d'exemple, la bactériorubérine et la trisanhydrobactériorubérine contiennent respectivement 13 et 14 doubles liaisons contre 11 dans le  $\beta$ -carotène et l'astaxanthine et 10 dans la lutéine (Yang *et al.*, 2015 ; Giani *et al.*, 2019). Ces caroténoïdes pourraient donc présenter des perspectives intéressantes pour le marché des compléments et des additifs alimentaires.

### 7.3. Détermination du pouvoir antibactérien des caroténoïdes

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents peut entraîner la sélection de souches multi-résistantes d'où l'importance d'orienter la recherche vers la découverte de nouvelles voies qui constitueraient une source de nouveaux traitements à base de produits naturels (Bouyahya *et al.*, 2017). Les antimicrobiens naturels peuvent servir également de conservateurs qui prolongent la durée de vie des aliments, en empêchant, entre autres, les problèmes relatifs à la santé, les mauvaises odeurs, les goûts désagréables ou les changements de textures ou de couleurs, provoqués principalement par les systèmes enzymatiques ou métaboliques des microorganismes contaminants (Parseh *et al.*, 2012).

Lors de cette étude, le pouvoir antibactérien des quatre extraits caroténoïdiques a été évalué par la méthode de diffusion des disques sur milieux gélosés. C'est une technique qualitative permettant d'avoir une idée préliminaire sur la capacité d'un substrat à inhiber la croissance microbienne. D'après nos connaissances et à ce jour, aucun travail n'a été effectué sur les propriétés antimicrobiennes des caroténoïdes  $C_{50}$ .

Ce test a été réalisé sur deux catégories de bactéries dont la première inclue 4 souches pathogènes responsables de maladies humaines, alors que la deuxième est constituée de souches pathogènes présentes dans beaucoup de milieux aquatiques et qui affectent surtout les poissons d'élevage en eaux salées.

L'activité antibactérienne a été estimée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition apparente autour des disques imprégnés des extraits à tester. Afin d'évaluer précisément le pouvoir antibactérien de nos échantillons, le diamètre réellement pris en compte est celui qui a été calculé par la différence entre le diamètre des zones d'inhibition de l'extrait et celui du contrôle négatif (méthanol). La gentamicine, un antibiotique de la famille des aminoglycosides et la dicentracine, un peptide antimicrobien produit par le poisson *Dicentrarchus labrax* ont été utilisés comme contrôle positif.

L'ensemble des résultats de cette étude sont répertoriés dans le tableau 26.

**Tableau 26.** Diamètres d'inhibition des extraits caroténoïdiques vis-à-vis des souches bactériennes testées.

Extraits caroténoïdiques Souches testées	Diamètre d'inhibition (mm) ± ET					
	BS2	ME16	ME3	BT9	Gen	Dic
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	13,66 ± 1,52 <sup>b</sup>	10 ± 0 <sup>a</sup>	11,66 ± 0,57 <sup>ab</sup>	11 ± 1,73 <sup>ab</sup>	25 ± 0 <sup>c</sup>	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	15 ± 2,64 <sup>b</sup>	10,33 ± 0,57 <sup>a</sup>	10,66 ± 0,57 <sup>a</sup>	9,66 ± 0,57 <sup>a</sup>	21 ± 0 <sup>c</sup>	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	15,66 ± 2,08 <sup>b</sup>	13 ± 0,5 <sup>a</sup>	12,66 ± 1,15 <sup>a</sup>	13 ± 1 <sup>a</sup>	13 ± 0 <sup>a</sup>	ND
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	15,33 ± 1,52 <sup>b</sup>	9,33 ± 1,52 <sup>a</sup>	11 ± 1 <sup>a</sup>	9 ± 1 <sup>a</sup>	28 ± 0 <sup>c</sup>	ND
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i> CECT 899	3 ± 1 <sup>a</sup>	4,33 ± 0,57 <sup>a</sup>	6 ± 1,73 <sup>ab</sup>	3,33 ± 2,08 <sup>a</sup>	ND	9 ± 0 <sup>b</sup>
<i>Aeromonas salmonicida</i> CECT 894	0,33 ± 0,57 <sup>a</sup>	0 ± 0 <sup>a</sup>	0 ± 0 <sup>a</sup>	0 ± 0 <sup>a</sup>	ND	0,1 ± 0 <sup>a</sup>
<i>Vibrio anguillarum</i> CECT 522	3,4 ± 0,7 <sup>a</sup>	3 ± 1,73 <sup>a</sup>	8,33 ± 1,52 <sup>b</sup>	5,66 ± 1,52 <sup>ab</sup>	ND	9 ± 0 <sup>ab</sup>
<i>Photobacterium damsela</i> CECT 626T	1,5 ± 0,7 <sup>a</sup>	1,33 ± 0,57 <sup>a</sup>	3,33 ± 1,52 <sup>a</sup>	1 ± 1 <sup>a</sup>	ND	6 ± 0 <sup>b</sup>

ET : écart typt ; Gen : gentamycine ; Dic : dicentracine ; les différentes lettres en exposant indiquent une différence significative à  $p < 0,05$  ; ND : non déterminé.

Les résultats obtenus révèlent que les extraits caroténoïdiques ont induit des zones d'inhibition variables allant de 1 à 15 mm, traduisant ainsi une activité antibactérienne variable selon la souche testée. D'après Tekwi *et al.* (2012), un extrait est considéré comme antibactérien lorsqu'il induit une zone d'inhibition supérieure ou égale à 10 mm. Cependant, il convient de noter que la faible solubilité de nos extraits peut entraîner une diffusion très lente sur la gélose, et par conséquent affecterait la formation d'une zone d'inhibition.

L'extrait caroténoïdique de la souche *Halorubrum* sp. BS2 a montré un effet antibactérien significativement plus important ( $p < 0,05$ ) que celui des autres extraits vis-à-vis des bactéries pathogènes pour l'homme avec des diamètres d'inhibition entre 13 et 15 mm. Toutefois, la meilleure activité contre les bactéries pathogènes pour les poissons a été enregistrée avec l'extrait caroténoïdique de la souche *Halogeometricum* sp. ME3 (3-8 mm). La variation de l'activité antibactérienne des extraits pourrait être liée à la variation de leur composition. Selon Ibrahim (2012), l'activité d'un extrait ne peut être due à un constituant actif majoritaire, mais plutôt à la synergie d'action des différents caroténoïdes présents dans cet extrait.

À noter que l'extrait de la souche *Halorubrum* sp. BS2 a également présenté la meilleure activité antioxydante parmi les extraits testés. Cela nous laisse supposer qu'une corrélation entre ces deux activités pourrait exister. Une telle observation a été rapportée dans de nombreux travaux évaluant les activités biologiques de composés naturels (de Freitas Araújo

*et al.*, 2012 ; Balraj *et al.*, 2014 ; Rostami *et al.*, 2016 ; Santos *et al.*, 2016 ; Wang *et al.*, 2018). Toutefois, aucune explication de cette corrélation n'a été rapportée dans la littérature. Nos résultats sont proches de ceux trouvés par d'autres études portant sur le pouvoir antibactérien des pigments produits par des bactéries halophiles et halotolérantes. Suresh et ses collaborateurs (2015), ont rapporté que les pigments extraits de la souche *Halolactibacillus alkaliphilus* MSRD1 possèdent une activité inhibitrice sur *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Salmonella paratyphi*, et *Staphylococcus aureus*, en induisant des zones d'inhibition allant de 6 à 16 mm, respectivement. De même, Ravikumar *et al.* (2016) ont rapporté que les pigments produits par la souche *Halomonas* sp. KT-02 inhibent la croissance d'*Escherichia coli*, de *Staphylococcus aureus*, de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Klebsiella* sp. avec des diamètres d'inhibition de 9 à 12 mm. Une autre étude menée par Fariq *et al.* (2019) a trouvé que les pigments extraits des trois souches *Aquisalibacillus elongatus* MB592, *Salinicoccus sesuvii* MB597, et *Halomonas aquamarina* MB598 sont dotées d'une importante activité inhibitrice contre *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas geniculata* et *Enterococcus faecium*, avec des diamètres d'inhibition compris entre 19 et 28 mm.

En comparaison avec les pigments produits par d'autres types de microorganismes, il s'avère que nos extraits caroténoïdiques, en particulier celui de la souche *Halorubrum* sp. BS2 montrent une activité antibactérienne plus importante. Karpiński et Adamczak (2019), ont noté un très faible pouvoir antibactérien du pigment algal fucoxanthine vis-à-vis des souches *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*, avec des diamètres d'inhibition de 5 ; 2,8 ; 1,5 et 4,2 mm, respectivement. La phycocyanine, un autre pigment algal produit par *Spirulina maxima* a révélé une faible activité inhibitrice contre *Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas* sp. et *Bacillus* sp. Les valeurs des diamètres d'inhibition sont comprises entre 6 et 8 mm (Muthulakshmi *et al.*, 2012).

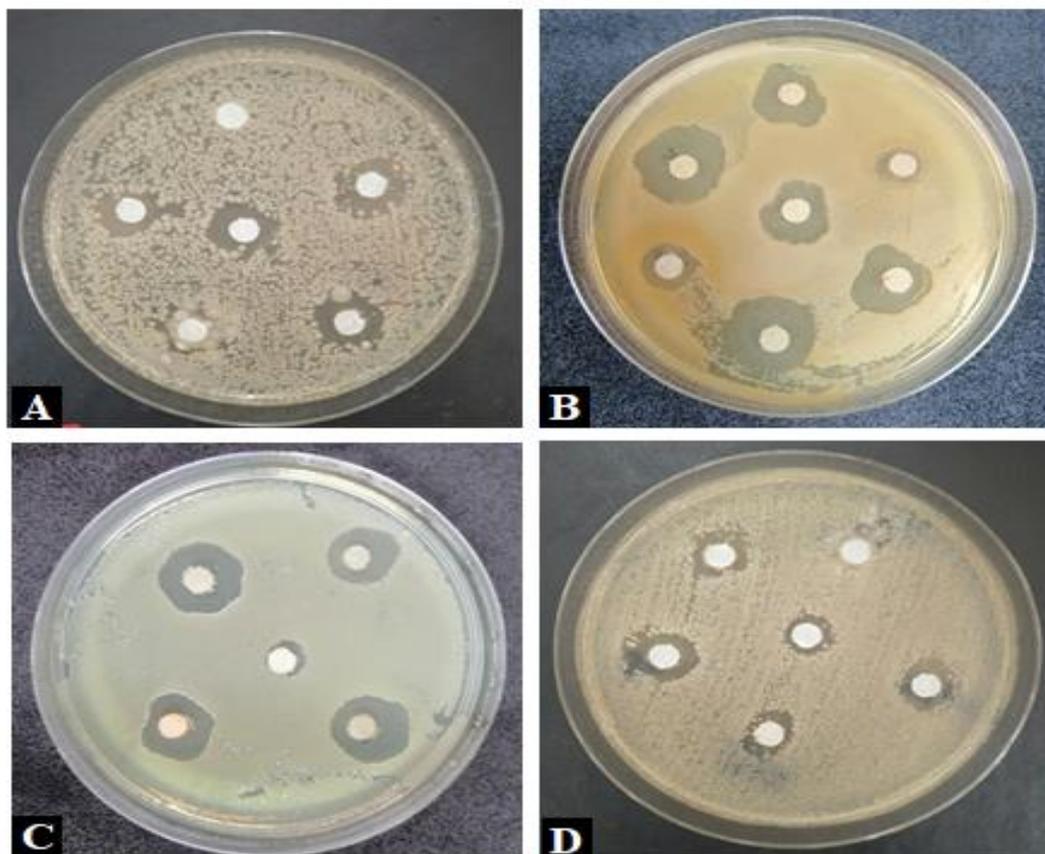
Rostami *et al.* (2016), ont étudié le potentiel antibactérien des pigments extraits de la levure *Rhodotorula glutinis* contre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella enteritidis* et *Escherichia coli*. Les résultats obtenus ont montré une activité antibactérienne relativement faible. À une concentration de 0,5 mg/mL, ces pigments induisent des zones d'inhibition entre 7,3 et 9,5 mm. Une étude menée sur la mélanine produite par la souche fongique *Aspergillus bridgeri* ICTF201 a révélé que ce pigment ne présente aucun effet inhibiteur contre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella planticola* et *Micrococcus luteus* (Ganesh Kumar *et al.*, 2011). Également, Majeed (2017) a constaté l'absence de toute activité inhibitrice des caroténoïdes

extraits de la bactérie *Micrococcus luteus* contre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*. D'autre part, ce même auteur a révélé un effet inhibiteur de ces caroténoïdes contre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella* sp. dont les diamètres d'inhibition sont compris entre 4 et 11 mm. Une autre étude a rapporté que la prodigiosine, un pigment produit par la bactérie marine *Serratia marcescens* IBRL USM 84, inhibait la croissance de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et *Micrococcus* sp. en induisant des diamètres d'inhibition inférieurs à 9 mm (Ibrahim *et al.*, 2014).

Selon les résultats rapportés dans le tableau 26, il apparaît que les bactéries pathogènes pour l'homme sont plus sensibles aux extraits caroténoïdiques que les bactéries pathogènes pour les poissons. La présence de plasmides de résistance chez ces dernières pourrait expliquer ce résultat. Ces plasmides ont été décelés chez un grand nombre d'espèces notamment *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum* et *Pseudomonas fluorescens*, leur conférant la résistance à une grande variété d'antibiotiques et d'agents antimicrobiens (Aoki, 2000 ; Trudel *et al.*, 2016). Les taux élevés de bactéries résistantes aux agents antimicrobiens observés dans les écosystèmes aquatiques proviennent essentiellement des rejets des eaux hospitalières non ou partiellement traitées et des effluents des stations d'épurations des eaux domestiques (Kim *et al.*, 2015).

Parmi les souches testées, c'est la bactérie à Gram positif *Staphylococcus aureus* qui s'est révélée être la plus sensible aux extraits caroténoïdiques, en comparaison avec les autres bactéries à Gram négatif. Ceci pourrait être attribué à la différence de la structure de la paroi entre ces deux groupes. En effet, les bactéries à Gram négatif possèdent des membranes externes entourant la paroi de la cellule, formant ainsi une barrière imperméable aux composés hydrophobes et aux molécules à haut poids moléculaire grâce aux lipopolysaccharides et aux porines. Tandis que la paroi des bactéries à Gram positif ne présente pas cette perméabilité sélective puisque le peptidoglycane n'entrave que la diffusion des molécules supérieures à plus de 50 kDa (Basli *et al.*, 2012).

Étant donné leur nature liposoluble, les caroténoïdes exercent leur activité antibactérienne en s'intercalant dans la membrane cytoplasmique. Une fois que ces molécules ont atteint la membrane cytoplasmique, elles interagissent avec les phospholipides et modifient leurs structures ce qui peut induire un changement de conformation de la membrane, une perturbation chimiosmotique et une fuite d'ions (Guo-Ping *et al.*, 2016 ; Ben Abdallah *et al.*, 2019).



**Figure 39.** Exemples d'activité antibactérienne des extraits caroténoïdiques. A : Extraits de la souche ME3 contre *Vibrio anguillarum* CECT 522 ; B : Extraits de la souche BS2 contre *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 ; C : Extraits de la souche BS2 contre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ; D : Extraits de la souche ME16 contre *Pseudomonas anguilliseptica* CECT 899.

À la suite de ces résultats, on peut déduire que les extraits caroténoïdiques des 4 souches archéennes ont manifesté une activité antibactérienne plus ou moins importante, en particulier contre les souches pathogènes pour l'homme. Ils peuvent ainsi constituer une nouvelle source de molécules intéressantes qui pourraient offrir de grande possibilité d'application dans le domaine médical ou en tant qu'agents conservateurs dans les aliments. Cependant, ce test réalisé n'est qu'un criblage des activités antibactériennes, il serait par conséquent intéressant d'entreprendre d'autres tests complémentaires, notamment la détermination des concentrations minimales inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB) afin de confirmer et de quantifier les activités, et aussi de caractériser la nature de l'effet révélé.

### 8. Étude de l'effet de quelques paramètres physico-chimiques sur la croissance et la production de caroténoïdes par la souche *Halorubrum* sp. BS2

L'environnement physico-chimique dans lequel se trouvent les haloarchaea influence fortement leur croissance et leur métabolisme et donc impacte directement les rendements de production de biomasse et/ou des biomolécules (Calegari-Santos *et al.*, 2016).

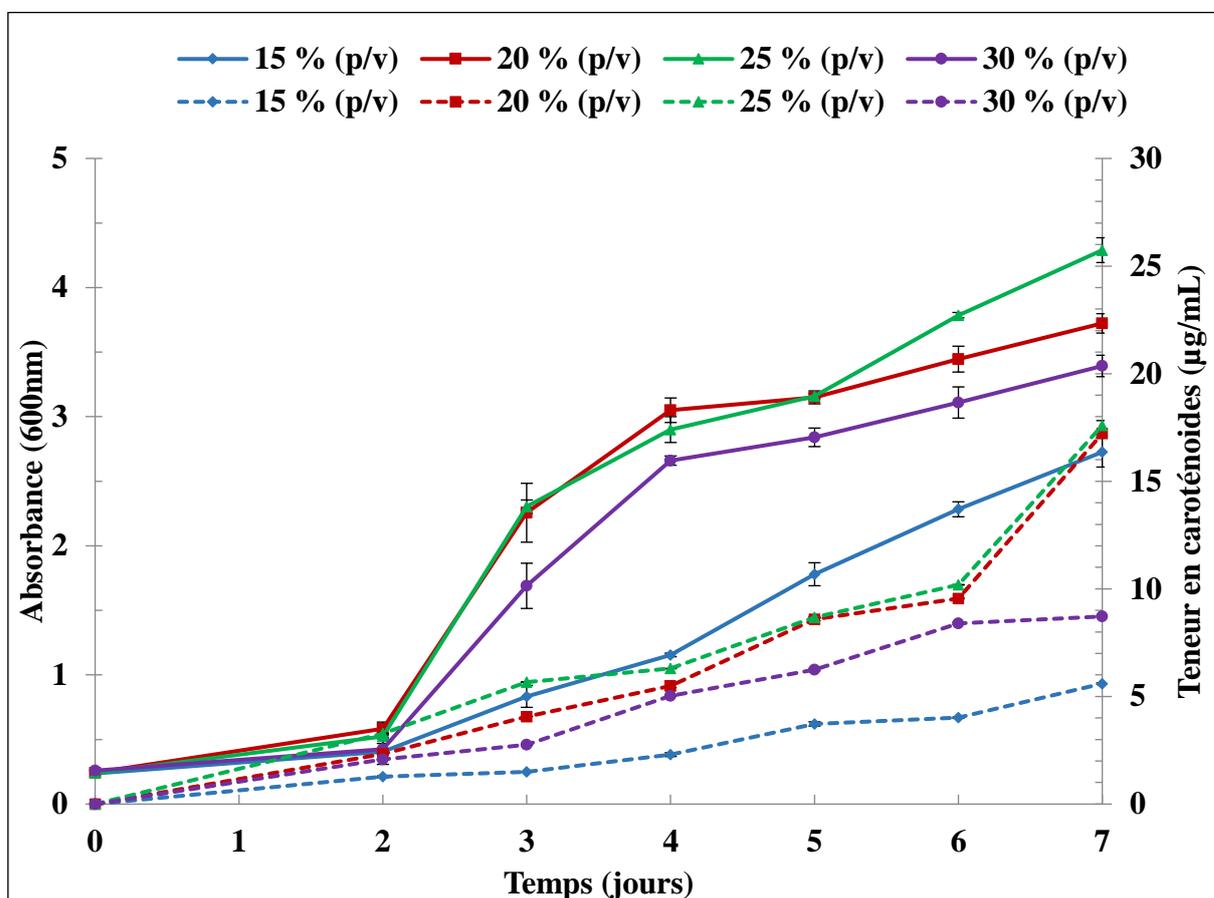
La souche *Halorubrum* sp. BS2, ayant le taux de production de caroténoïdes le plus élevé et présentant des activités biologiques intéressantes, a été sélectionnée pour étudier l'effet de quelques conditions physico-chimiques de culture sur sa croissance et sa production de caroténoïdes.

#### 8.1. Effet de la salinité

La salinité est le principal facteur qui intervient dans la croissance cellulaire des halorachaea et de leur métabolisme, provoquant des changements au niveau de la structure cellulaire (Abrevaya, 2012). Ainsi, la croissance et la production de caroténoïdes par la souche *Halorubrum* sp. BS2 ont été testées à différentes salinités allant de 15 à 30 % (p/v). Les résultats présentés dans la figure 40 montrent un effet hautement significatif de la salinité ( $p < 0,0001$ ). Le taux de croissance significativement le plus élevé est obtenu à une salinité de 25 % (p/v), ce qui confirme les résultats de la caractérisation effectuée dans la section 3.1. Toutefois, une bonne croissance est également observée à 15, 20 et 30 % (p/v) de sel. Ceci correspond au caractère d'halophilie des membres du genre *Halorubrum* qui se développent entre 15 et 30 % (p/v) de sel avec un optimum de 25 % (p/v) (Oren, 2018).

Pour ce qui est de la production de caroténoïdes, elle augmente significativement ( $p < 0,0001$ ) avec l'augmentation de la salinité, atteignant une valeur maximale de  $17,59 \pm 0,22 \mu\text{g/mL}$  à 25 % (p/v) de sel (Tableau 27-Annexe 2). À cette salinité, la teneur en caroténoïdes est trois fois plus élevée que celle obtenue à 15 % (p/v) de sel. Ces résultats corroborent ceux trouvés par De la Vega *et al.* (2016), qui ont rapporté que la souche *Halorubrum* sp. SH1 cultivée à des salinités allant de 10 à 30 % (p/v) produit le maximum de caroténoïdes à 25 % (p/v) de sel. Également, les souches *Haloferax alexandrinus* TM et *Halobacterium salinarum* ATCC 33170 cultivées entre 0 et 35 % (p/v) de sel accumulent plus de caroténoïdes à des salinités élevées avec une meilleure production à 25 % (p/v) de sel (Kushwaha *et al.*, 1982; Asker et Ohta, 1999). En revanche, la production de caroténoïdes chez les souches *Haloferax mediterranei* ATCC 33500, *Haloferax volcanii* WFD11, *Halobacterium* SP-2 et *Halorubrum* SP-4 est inversement proportionnelle à l'augmentation de la salinité, les teneurs en caroténoïdes les plus élevées ont été obtenues à 15 % (p/v) de sel (D'Souza *et al.*, 1997; Bidle

*et al.*, 2007; Sui *et al.*, 2014 ; Montero-Lobato *et al.*, 2018). Il a été suggéré qu'à de faibles concentrations en sel, certaines souches d'*halorchaea* ont tendance à accumuler plus de caroténoïdes afin de stabiliser leurs membranes cellulaires et ainsi prévenir la lyse cellulaire (Fang *et al.*, 2010 ; Hamidi *et al.*, 2014).

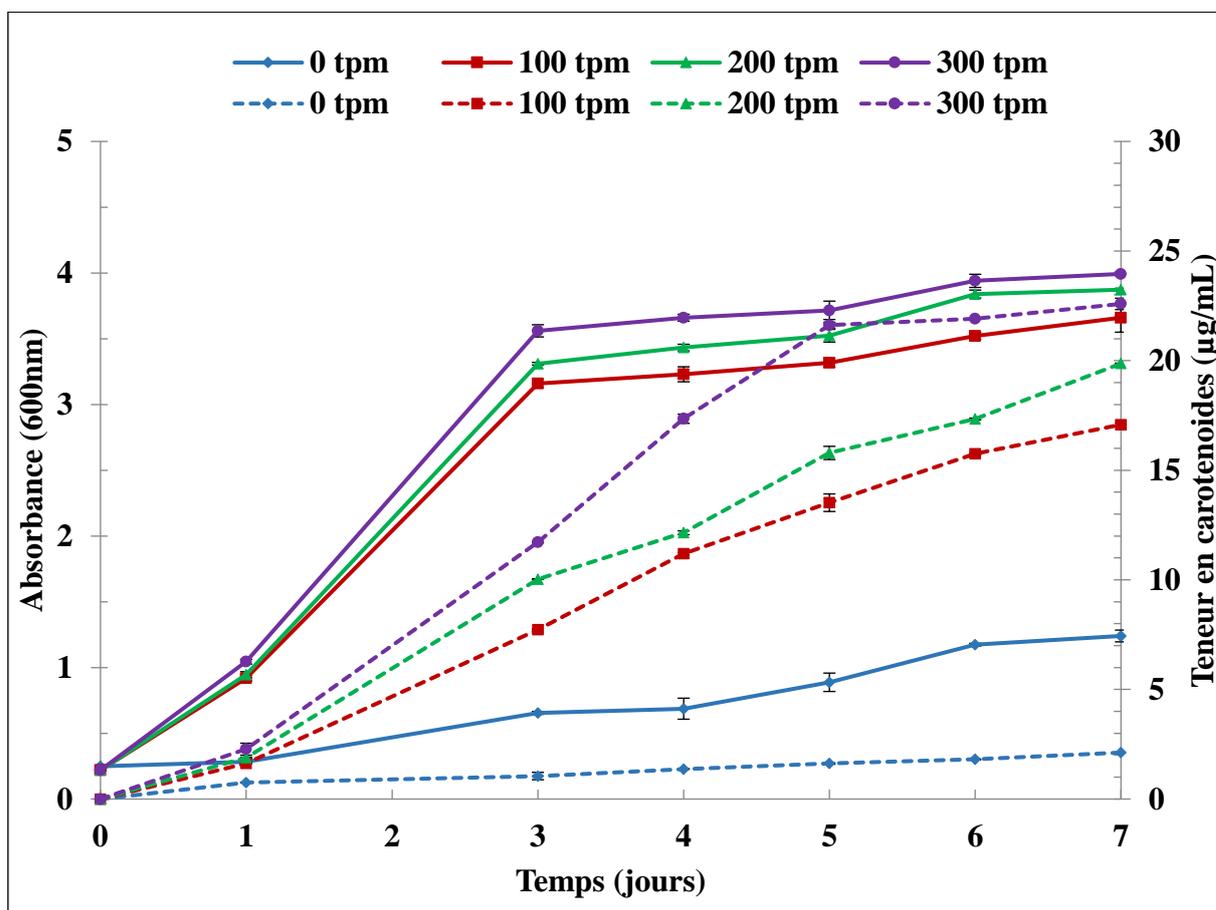


**Figure 40.** Suivi de la croissance et la teneur en caroténoïdes de la souche *Halorubrum* sp. BS2 sous différentes salinités. Traits continus — : croissance ; traits discontinus --- : teneur en caroténoïdes.

## 8.2. Effet de l'agitation

L'agitation du milieu de culture peut être un facteur important pour la croissance et la production des biomolécules par les microorganismes aérobies comme les *Archaea* halophiles extrêmes. Pour tester ce facteur, différentes vitesses d'agitation (0, 100, 200 et 300 tpm) ont été imposées aux cultures de *Halorubrum* sp. BS2. Les résultats obtenus montrent que la croissance et la production de caroténoïdes sont significativement influencées par l'agitation. Elles sont d'autant plus élevées que le taux d'agitation augmente (Figure 41). Les valeurs significativement les plus importantes ( $p < 0,0001$ ) ont été obtenues pour une agitation de 300 tpm. À l'inverse, en absence d'agitation, la croissance a été très faible avec une production de caroténoïdes quasi absente (Tableau 27-Annexe 2). Ces observations rejoignent

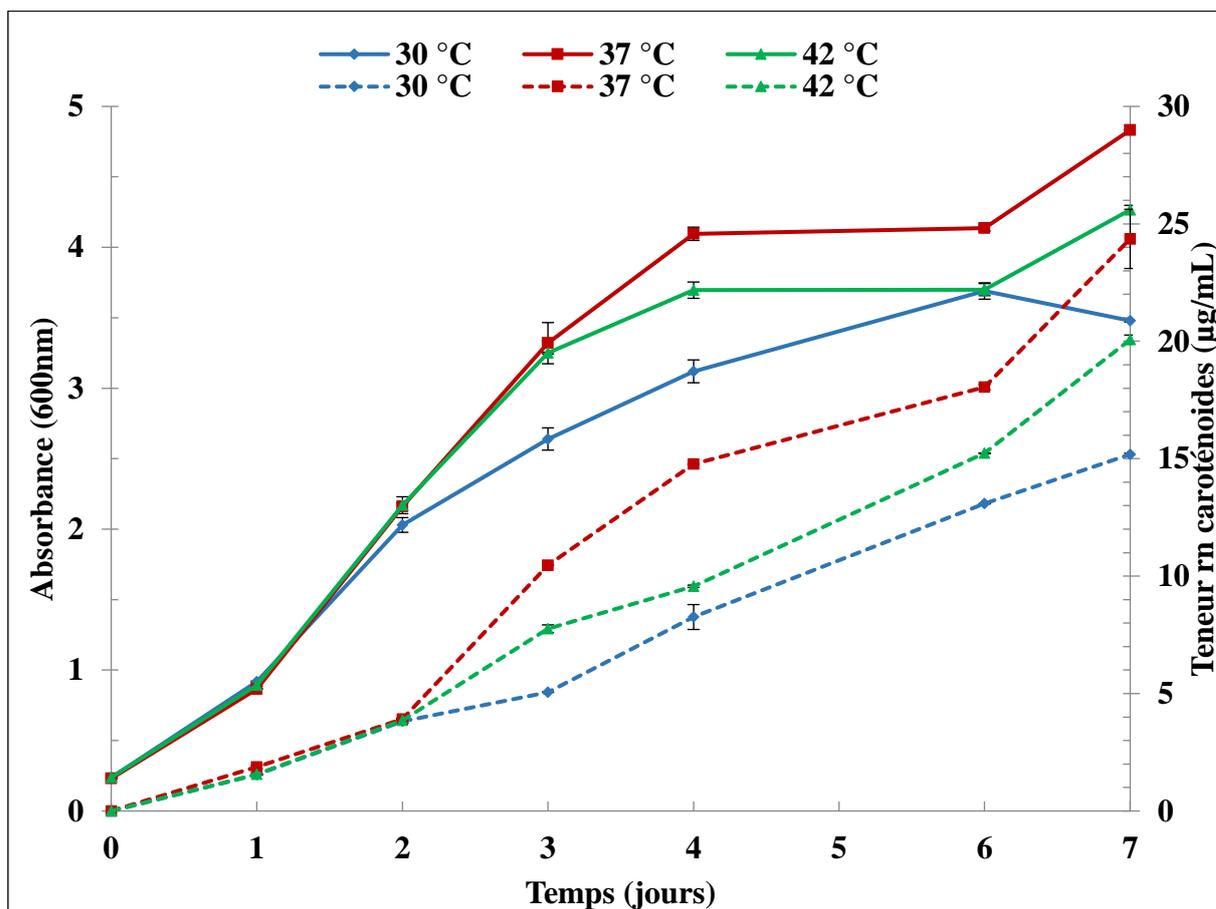
celles rapportées par De la Vega *et al.* (2016) et Montero-Lobato *et al.* (2018) qui ont trouvé que la croissance et la production des caroténoïdes par *Halorubrum* sp. SH1 et *Haloferax mediterranei* ATCC 33500 augmentaient de manière considérable avec l'augmentation des vitesses d'agitation. Ceci est expliqué par la faible solubilité de l'oxygène dans les milieux de culture hautement salins, et par conséquent, il peut facilement devenir un facteur limitant le développement des haloarchaea. L'augmentation de la vitesse d'agitation augmente le transfert d'oxygène ce qui fournit une bonne aération, favorisant ainsi la croissance et aussi la production des caroténoïdes (Calegari-Santos *et al.*, 2016 ; De la Vega *et al.*, 2016). En effet, la biosynthèse de la bactériorubérine et de ses dérivés à partir du lycopène implique des réactions d'hydroxylation qui dépendent des atomes d'oxygène. La présence d'oxygène à de faibles concentrations conduit à l'arrêt de la biosynthèse des caroténoïdes C<sub>50</sub> au stade du lycopène (El-Sayed *et al.*, 2002).



**Figure 41.** Suivi de la croissance et la teneur en caroténoïdes de la souche *Halorubrum* sp. BS2 sous différentes vitesses d'agitations. Traits continus — : croissance ; traits discontinus -- : teneur en caroténoïdes ; tpm : tours par minute.

### 8.3. Effet de la température

La température est un autre facteur physique important pour le développement des halorachaea et qui permet de réguler leurs réponses physiologiques et morphologiques (Oren, 2013a). Pour tester l'effet de ce facteur, des cultures d'*Halorubrum* sp. BS2 ont été incubées à 30 °C, 37 °C et 42 °C. Les résultats obtenus sont montrés dans la figure 42.



**Figure 38.** Suivi de la croissance et la teneur en caroténoïdes de la souche *Halorubrum* sp. BS2 sous différentes températures. Traits continus — : croissance ; traits discontinus --- : teneur en caroténoïdes.

Les résultats observés montrent un effet hautement significatif ( $p < 0,0001$ ) de la température sur la croissance et sur la production des caroténoïdes. Le taux de croissance le plus élevé a été obtenu à 37 °C. Toutefois, une bonne croissance a été également observée à 42 °C et à 30 °C, ce qui confirme les résultats précédents de la caractérisation de cette souche (Tableau 27-Annexe 2). Ces résultats sont similaires à ceux trouvés par Yachai (2009), Hamidi *et al.* (2014) et De la Vega *et al.* (2016), et corrént parfaitement avec les caractères

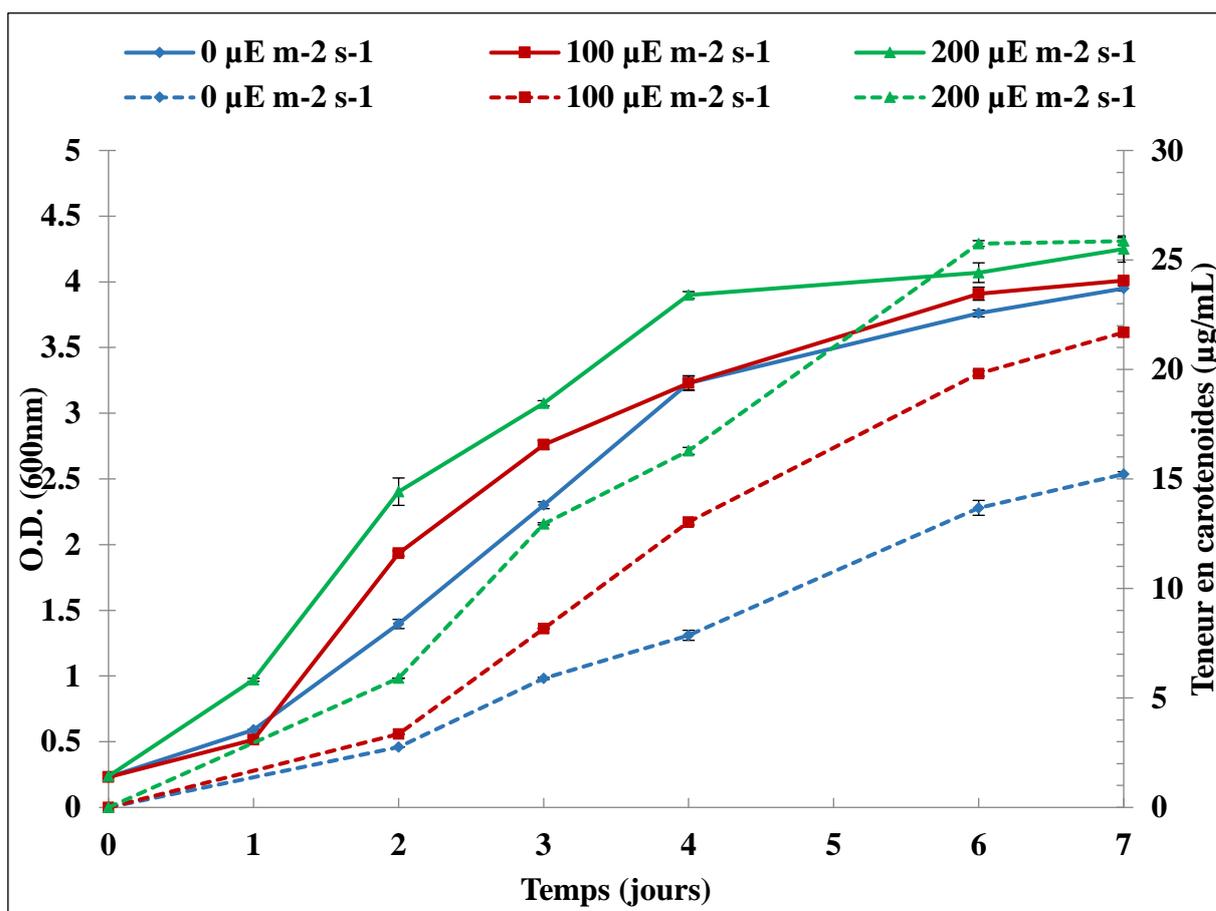
physiologiques des membres de l'espèce *Halorubrum chaoviator*. Ces derniers se développent entre 28 et 50 °C avec un optimum de croissance à 37 °C (Oren, 2018).

Comme pour la croissance, la teneur en caroténoïdes significativement la plus élevée a été obtenue à 37°C. Des observations similaires ont été notées pour *Haloferax alexandrinus* TM, *Halobacterium* sp. HM3, *Haloferax mediterranei* ATCC 33500 et *Halorubrum* sp. SH1 qui produisent le maximum de caroténoïdes entre 36,8 °C et 37 °C (Asker et Ohta ; Yachai, 2009 ; De la Vega *et al.*, 2016 ; Montero-Lobato *et al.*, 2018). L'augmentation de la température peut provoquer une altération de la structure des enzymes impliquées dans la caroténogénèse, ce qui entraîne souvent une perte de fonction et par conséquent une diminution de la teneur en caroténoïdes produits. D'autre part, les basses températures diminuent l'activité des enzymes et les taux d'absorption de nutriments à partir de l'environnement, il en résulte ainsi un ralentissement du métabolisme énergétique, ce qui impacte directement les rendements de production des biomolécules (Bhosale, 2003 ; Calegari-Santos *et al.*, 2016).

### 8.4. Effet de la lumière

La lumière est un facteur important qui intervient dans la régulation de la biosynthèse des caroténoïdes dans de nombreux types de microorganismes. L'influence de ce facteur sur la croissance et la production de caroténoïdes a été étudiée en incubant les cultures d'*Halorubrum* sp. BS2 à l'obscurité et sous différentes intensités lumineuses (100 et 260  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Les résultats obtenus sont montrés dans la figure 43. D'après ces résultats, la lumière n'avait pas d'effet significatif ( $p > 0,05$ ) sur la croissance de la souche étudiée, ce qui est en accord avec ce qui a été observé précédemment pour *Halorubrum* sp. SH1 et *Haloferax mediterranei* ATCC 33500 (De la Vega *et al.*, 2016 ; Montero-Lobato *et al.*, 2018). Cependant, elle influençait significativement ( $p < 0,0001$ ) la production de caroténoïdes. La teneur en caroténoïdes augmente avec l'augmentation des intensités lumineuses, atteignant une valeur maximale de  $25,86 \pm 0,17 \mu\text{g/mL}$  sous 260  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Tableau 27-Annexe 2). Ces observations s'accordent avec celles notées pour *Halobacterium salinarum* JCM10927 et *Halorubrum* sp. SH1 (El-Sayed *et al.*, 2002 ; De la Vega *et al.*, 2016). Ceci pourrait être expliqué par le fait que la bactériorubérine et ses dérivés jouent le rôle de photoprotecteurs chez les haloarchaea. L'augmentation de l'intensité lumineuse stimule la production de ces caroténoïdes afin de protéger les cellules contre l'oxydation (El-Sayed *et al.*, 2002 ; Silva-Castro *et al.*, 2019).

En revanche, d'autres études ont trouvé que les souches *Halobacterium salinarum* ATCC 33170, *Halobacterium salinarum* ATCC 432014, *Haloferax alexandrinus* TM et *Haloferax mediterranei* ATCC 33500 ne présentent aucune différence dans la teneur en caroténoïdes lorsqu'elles sont cultivées en absence ou en présence de la lumière (Asker et Ohta 1999; Calegari-Santos *et al.*, 2016 ; Montero-Lobato *et al.*, 2018). Montero-Lobato *et al.* (2018) expliquent ce constat par le fait que la réponse au stress induit par la lumière peut différer d'une *Archaea* à une autre.



**Figure 43.** Suivi de la croissance et la teneur en caroténoïdes de la souche *Halorubrum* sp. BS2 sous différentes intensités lumineuses. Traits continus — : croissance ; traits discontinus --- : teneur en caroténoïdes.

Les résultats obtenus ont permis de déterminer les conditions optimales pour la production de caroténoïdes par la souche *Halorubrum* sp. BS2. Le taux de croissance et la teneur en caroténoïdes sont meilleurs à une salinité de 25% (p/v), sous une agitation de 300 tpm, à une température de 37 °C et sous une illumination de 260 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Dans ces conditions, la production des caroténoïdes par la souche étudiée a atteint 25,86 ± 0,17 µg/mL. Cette valeur

est supérieure à celles obtenues par d'autres auteurs qui ont rapporté que les souches *Haloferax mediterranei* ATCC 33500<sup>T</sup>, *Halobacterium salinarum* HM3 et *Halorubrum* sp. TBZ126 produisent dans les conditions optimales 3,74 ; 9 ; 24 et 10,78 µg/mL de caroténoïdes, respectivement (Yachai, 2009 ; Hamidi, 2014 ; Montero-Lobato *et al.*, 2018).

**CONCLUSION**

**et**

**PERSPECTIVES**

Les *Archaea* halophiles extrêmes sont les colonisateurs majoritaires des environnements hypersalins. Elles possèdent la capacité de maintenir en équilibre leur pression osmotique cellulaire, mais aussi parviennent à résister aux effets dénaturants des sels. En réponse à ces conditions hostiles, ces microorganismes ont développé au cours de l'évolution un répertoire de voies métaboliques très diversifié. Ils représentent de ce fait une source potentielle de biomolécules à intérêt industriel et biotechnologique, notamment les pigments.

Les principaux objectifs de notre travail étaient d'isoler des souches archéennes halophiles extrêmes à partir de différents environnements hypersalins algériens, d'évaluer leur potentiel de production de caroténoïdes, d'effectuer une caractérisation polyphasique des souches les plus intéressantes, et enfin de caractériser les caroténoïdes produits par une sélection de ces souches.

Les isolements ont été effectués sur des échantillons de saumures et de sels collectés à partir de 7 sites différents incluant des chotts et des sebkhas. L'analyse physico-chimique des échantillons a montré un pH neutre à légèrement alcalin, une forte salinité, une dominance des ions sodium et chlorure et une présence des ions magnésium, sulfate et calcium. Ces caractéristiques ont permis de classer les environnements étudiés comme thalassohalins.

Au total, une collection de 110 isolats archéens, sélectionnés sur la base des caractères culturels des colonies, a été obtenue. L'ensemble de ces isolats est halophile extrême, mésophile à thermotolérant et neutrophile. Ils sont tous à Gram négatif avec une morphologie cellulaire variable allant de cocci ou bâtonnets aux formes sphériques ou pléomorphes. Le taux de production des caroténoïdes varie d'une souche à une autre avec des valeurs comprises entre 0,1 et 3,68 µg/mL.

Sur la base de leurs caractères physiologiques et de leur potentiel de production de caroténoïdes, 43 souches ont été sélectionnées pour une identification polyphasique combinant une caractérisation phénotypique et moléculaire. Toutes les souches sélectionnées sont aérobies et la moitié d'entre elles possèdent en plus la capacité de réduire les nitrates en anaérobiose. Cependant, aucune souche n'est capable de croître en anaérobiose sur la L-arginine. Leur utilisation des sources d'énergie, de carbone et/ou d'azote est variable. La recherche d'activité hydrolytique extracellulaire envers l'amidon, la gélatine, la caséine et le Tween 80 a montré que 76 % des souches étudiées montrent au moins une activité hydrolytique. L'activité protéolytique représentée par l'hydrolyse de la gélatine est prédominante suivie par l'activité lipolytique. La combinaison de plusieurs activités hydrolytiques a été détectée chez plusieurs souches. Cependant, aucune souche n'a pu hydrolyser la caséine.

Le séquençage et l'analyse des gènes de l'ARNr 16S des souches étudiées a révélé que ces dernières sont affiliées à 7 genres archéens différents appartenant à la classe des *Halobacteria* : *Halorubrum*, *Haloracula*, *Haloferax*, *Natrinema*, *Halogeometricum*, *Haloterrigena* et *Halopiger*. Par ailleurs, une majorité des souches identifiées est retrouvée dans le genre *Halorubrum*.

Par la suite, 4 souches présentant les taux de production de caroténoïdes les plus élevés et appartenant à différents genres ont été sélectionnées pour l'étude de leurs caroténoïdes. Il s'agit des souches *Halorubrum* sp.BS2 ; *Halogeometricum* sp.ME3 ; *Haloarcula* sp.BT9 et *Haloferax* sp.ME16.

L'analyse des extraits caroténoïdiques par méthodes chromatographiques et spectrométrie a révélé une variation de la composition en fonction de la souche avec une prédominance de la bactériorubérine.

L'évaluation du pouvoir antioxydant *in vitro* en utilisant les tests de piégeage des radicaux libres a montré que nos extraits caroténoïdiques possèdent un fort potentiel antioxydant, en particulier ceux des souches *Halorubrum* sp. BS2 et *Haloferax* sp. ME16 qui ont présenté des EC50 significativement inférieures à celle de l'antioxydant standard (acide ascorbique).

Les extraits caroténoïdiques étudiés ont été également soumis à un criblage de leur possible activité antibactérienne contre 4 souches pathogènes pour l'être humain et 4 souches pathogènes pour les poissons, en employant la méthode de diffusion des disques. Les résultats ont révélé des zones d'inhibition variables allant de 1 à 15 mm, traduisant ainsi une activité antibactérienne variable selon la souche testée. L'extrait caroténoïdique de la souche *Halorubrum* sp. BS2 a montré l'effet inhibiteur le plus important vis-à-vis des bactéries pathogènes pour l'homme. En revanche, la meilleure activité contre les bactéries pathogènes pour les poissons a été enregistrée avec l'extrait caroténoïdique de la souche *Halogeometricum* sp. ME3.

Enfin, la croissance et la production des caroténoïdes par la souche *Halorubrum* sp. BS2 ont été étudiées sous différentes conditions physico-chimiques de culture. Les résultats ont montré que le taux de croissance et la teneur en caroténoïdes sont meilleurs à une salinité de 25 % (p/v), sous une agitation de 300 tpm, à une température de 37°C et sous une illumination de 260  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Dans ces conditions, la production des caroténoïdes a atteint  $25,86 \pm 0,17$   $\mu\text{g/mL}$ .

Au vu des résultats acquis au cours de ce travail de thèse, il apparaît clairement que certaines souches de notre collection disposent d'un potentiel important pour la production des caroténoïdes aux propriétés biologiques intéressantes. Elles constituent ainsi de bons

candidats pour l'exploitation en biotechnologie en qualité de productrices de caroténoïdes utilisables dans plusieurs domaines, notamment agro-alimentaire.

L'ensemble de ces résultats ouvre des perspectives diverses, ainsi, nous envisageons de :

- Compléter la caractérisation des souches ayant montré un pourcentage de similarité relativement bas avec les espèces les plus proches, en utilisant le test d'hybridation ADN-ADN et par méthodes chimiotaxonomiques ;

- Caractériser les génomes des souches productrices de caroténoïdes les plus intéressantes afin de révéler les voies de régulation de l'expression métabolique de ces molécules ;

- Réaliser des tests *in vivo* afin d'apprécier l'activité réelle de ces molécules et de comprendre leurs mécanismes d'action et leur toxicité ;

- Élargir le panel des activités biologiques à étudier, notamment en évaluant les activités anti-inflammatoires, anti-cancéreuses et antivirales de nos extraits caroténoïdiques ;

- Optimiser d'autres paramètres culturels afin d'augmenter le rendement de production des caroténoïdes par la souche *Halorubrum* sp. BS2. Cela peut passer également par l'amélioration génétique de la souche ;

- Encapsuler les caroténoïdes produits par la souche *Halorubrum* sp. BS2 et étudier leur stabilité en conditions gastriques et leur biodisponibilité en vue d'une éventuelle application comme additifs fonctionnels dans des matrices alimentaires appropriées : boissons, produits fermentés, produits carnés, etc.

**RÉFÉRENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

- Abbes, M., H. Baati, S. Guermazi, C. Messina, A. Santulli, N. Gharsallah et E. Ammar. Biological properties of carotenoids extracted from *Halobacterium halobium* isolated from a Tunisian solar saltern. BMC complementary and alternative medicine, 2013, 13(1), 255. [<https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-255>].
- Abdallah, R., D. Frikha et S. M. E. S. Sassi. Evaluation in vitro de l'activité antibactérienne et antifongique de quatre espèces algales marines. Journal de l'Information Médicale de Sfax, 2019, 38.
- Abrevaya, X. C. Features and Applications of Halophilic *Archaea*. In O. V. Singh Ed. *Extremophiles*: Springer, 2012, p. 123-158. [<https://doi.org/10.1002/9781118394144.ch5>]
- Akash, M. S. H. et K. Rehman. Thin Layer Chromatography. In M.S.H. Akash et K. Rehman eds. *Essentials of Pharmaceutical Analysis*. Singapore : Springer Singapore, 2020, p. 157-165. [[https://doi.org/10.1007/978-981-15-1547-7\\_12](https://doi.org/10.1007/978-981-15-1547-7_12)]
- Akmoussi-Toumi, S., S. Khemili-Talbi, S. Kebbouche-Gana, N. Lenchi-Izouine, M, Khelfaoui, A, Sayah, G, Bouarab, I, Ferrioune, W, Mokhtari et A, Najjari. Diversity of Culturable Halophilic Archaea and Bacteria from Chott Tinsilt and El Malah Salt-Lake in Algeria. Current Research in Bioinformatics, 2020, 8(1), 46-54. [<https://doi.org/10.3844/ajbsp.2019.46.54>]
- Akolkar, A., D. Durai et A. Desai. *Halobacterium* sp. SP1 (1) as a starter culture for accelerating fish sauce fermentation. Journal of applied microbiology, 2010, 109(1), 44-53. [<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04626.x>]
- Alfonzo, A., W. Randazzo, M. Barbera, C. Sannino, O. Corona, L. Settanni, G. Moschetti, A. Santulli et N. Francesca. Effect of salt concentration and extremely halophilic archaea on the safety and quality characteristics of traditional salted anchovies. Journal of Aquatic Food Product Technology, 2017, 26(5), 620-637. [<https://doi.org/10.1080/10498850.2016.1251521>]
- Allers, T. et M. Mevarech. Archaeal genetics- the third way. Nature Reviews Genetics, 2005, 6(1), 58-73. [<https://doi.org/10.1038/nrg1504>]
- Al-Mailem, D. M., N. A. Sorkhoh, H. Al-Awadhi, M. Eliyas et S. S. Radwan. Biodegradation of crude oil and pure hydrocarbons by extreme halophilic archaea from hypersaline coasts of the Arabian Gulf. Extremophiles, 2010, 14(3), 321-328. [<https://doi.org/10.1007/s00792-010-0312-9>]
- Amann, R., F.-O. Glöckner et A. Neef. Modern methods in subsurface microbiology: in situ identification of microorganisms with nucleic acid probes. FEMS Microbiology Reviews, 1997, 20(3-4), 191-200. [<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00308.x>]
- Amengual, J. Bioactive Properties of Carotenoids in Human Health. Nutrients, 2019, 11(10), 2388. [<https://doi.org/10.3390/nu11102388>]
- Amoozegar, M. A., M. Siroosi, S. Atashgahi, H. Smidt et A. Ventosa. Systematics of haloarchaea and biotechnological potential of their hydrolytic enzymes. Microbiology, 2017, 163(5), 623-645. [<https://doi.org/10.1099/mic.0.000463>]

- Amorim-Carrilho, K. T., A. Cepeda, C. Fente et P. Regal Review of methods for analysis of carotenoids. *Trends in Analytical Chemistry*, 2014, 56, 49-73. [<https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.12.011>]
- Andrei, A.-Ş., H. L. Banciu et A. Oren. Living with salt: metabolic and phylogenetic diversity of archaea inhabiting saline ecosystems. *FEMS Microbiology Letters*, 2012, 330(1), 1-9. [<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02526.x>]
- Antón, J., E. Llobet-Brossa, F. Rodríguez-Valera et R. Amann. Fluorescence in situ hybridization analysis of the prokaryotic community inhabiting crystallizer ponds. *Environmental Microbiology*, 1999, 1(6), 517-523. [<https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.1999.00065.x>]
- Antunes, A., M. Taborda, R. Huber, C. Moissl, M. F. Nobre et M. S. Da Costa. *Halorhabdus tiamatea* sp. nov., a non-pigmented, extremely halophilic archaeon from a deep-sea, hypersaline anoxic basin of the Red Sea, and emended description of the genus *Halorhabdus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58(1), 215-220. [<https://doi.org/10.1099/ijs.0.65316-0>]
- Aoki, T. Transferable drug resistance plasmids in fish-pathogenic bacteria. In *Use of Chemicals in Aquaculture in Asia: Proceedings of the Meeting on the Use of Chemicals in Aquaculture in Asia 20-22 May 1996, Tigbauan, Iloilo, Philippines*. : Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center, 2000, p. 31-33.
- Aouad, M., N. Taib, A. Oudart, M. Lecocq, M. Gouy et C. Brochier-Armanet. Extreme halophilic archaea derive from two distinct methanogen Class II lineages. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2018, 127, 46-54. [<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.04.011>]
- Asker, D. et Y. Ohta. Production of canthaxanthin by extremely halophilic bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 1999, 88(6), 617-621. [[https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)87089-9](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)87089-9)]
- Asker, D., T. Awad et Y. Ohta. Lipids of *Haloferax alexandrinus* strain TMT: an extremely halophilic canthaxanthin-producing archaeon. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2002, 93(1), 37-43. [[https://doi.org/10.1016/s1389-1723\(02\)80051-2](https://doi.org/10.1016/s1389-1723(02)80051-2)]
- Atanasova, N. S., E. Roine, A. Oren, D. H. Bamford et H. M. Oksanen. Global network of specific virus-host interactions in hypersaline environments. *Environmental Microbiology*, 2012, 14(2), 426-440. [<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02603.x>]
- Baati, H., S. Guerhazi, N. Gharsallah, A. Sghir et E. Ammar. Novel prokaryotic diversity in sediments of Tunisian multipond solar saltern. *Research in Microbiology*, 2010, 161(7), 573-582. [<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.05.009>]
- Baaziz, N., B. Mayache, M. Saheb, E. Bensaci, M. Ounissi, S. Metallaoui et M. Houhamdi. Statut phénologique et reproduction des peuplements d'oiseaux d'eau dans l'éco-complexe de zones humides de Sétif (Hauts plateaux, Est de l'Algérie). *Bulletin de l'Institut Scientifique de Rabat*, 2011, 32(2), 77-87.
- Baaziz, N. Statut et écologie de l'avifaune aquatique de la Sebkhia de Bazer-Sakra (El-Eulma, Sétif): Phénologie et distribution spatio-temporelle. Thèse de doctorat Université Badji Mokhtar. Annaba, 2012.

- Ballais, J.-L. Des oueds mythiques aux rivières artificielles: l'hydrographie du Bas-Sahara algérien. *Physio-Géo*, Volume 4, 2010, 107-127. [<https://doi.org/10.4000/physio-geo.1173>]
- Balraj, J., K. Pannerselvam et A. Jayaraman. Isolation of pigmented marine bacteria *Exiguobacterium* sp. from peninsular region of India and a study on biological activity of purified pigment. *International Journal of Science and Technology Research*, 2014, 3(3), 375-384.
- Baricz, A., A. Cristea, V. Muntean, G. Teodosiu, A.-Ş. Andrei, I. Molnár, M. Alexe, E. Rakosy-Tican et H. L. Banciu. Culturable diversity of aerobic halophilic archaea (Fam. Halobacteriaceae) from hypersaline, meromictic Transylvanian lakes. *Extremophiles*, 2015, 19(2), 525-537. [<https://doi.org/10.1007/s00792-015-0738-1>]
- Barreteau, H., M. Vandervennet, L. Guédon, V. Point, S. Canaan, S. Rebuffat, J. Peduzzi et A. Carré-Mlouka. *Haloarcula sebkhae* sp. nov., an extremely halophilic archaeon from Algerian hypersaline environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2019, 69(3), 732-738. [<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003211>]
- Barros, L., M.-J. Ferreira, B. Queirós, I. C. F. R. Ferreira et P. Baptista. Total phenols, ascorbic acid,  $\beta$ -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 2007, 103(2), 413-419. [<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.038>]
- Basli, A., M. Chibane, K. Madani et N. Oukil. Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie: *Origanum glandulosum* Desf. *Phytothérapie*, 2012, 10(1), 2-9. [<https://doi.org/10.1007/s10298-012-0683-9>]
- Bell, S. D. et S. P. Jackson. Mechanism and regulation of transcription in archaea. *Current Opinion in Microbiology*, 2001, 4(2), 208-213. [[https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(00\)00190-9](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(00)00190-9)]
- Benlloch, S., A. López-López, E. O. Casamayor, L. Øvreås, V. Goddard, F. L. Daae, G. Smerdon, R. Massana, I. Joint, F. Thingstad, C. Pedrós-Alió et F. Rodríguez-Valera. Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern. *Environmental Microbiology*, 2002, 4(6), 349-360. [<https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00306.x>]
- Bennabi, F., M. Meddah, F. Toumi, L. Hamel, A. Megharbi, F. Koudache et S. Ghomari. Etude éco-biologique d'*Artémia salina* des zones humides de l'Ouest Algérien. *Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie*, 2015, 11(2), 97-106.
- Benzellat, B. Contribution à l'amélioration des rendements des plantes cultivées en sols salés. Mémoire de Magistère Université de Tlemcen, 2012.
- Berrada, I. Etude de la biodiversité des bactéries telluriques halophiles au niveau du Bas Loukkos (Marais salants & Marecage de Beggara). Thèse de doctorat Université Mohamed V Rabat, 2012.
- Besse, A., J. Peduzzi, S. Rebuffat et A. Carré-Mlouka. Antimicrobial peptides and proteins in the face of extremes: Lessons from archaeococci. *Biochimie*, 2015, 118, 344-355. [<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.06.004>]

Betlach, M. C., D. Leong et H. W. Boyer. Bacterio-opsin gene expression in *Halobacterium halobium*. *Systematic and Applied Microbiology*, 1986, 7(1), 83-89. [[https://doi.org/10.1016/s0723-2020\(86\)80128-x](https://doi.org/10.1016/s0723-2020(86)80128-x)]

Bhatnagar, T., S. Boutaiba, H. Hacene, J.-L. Cayol, M.-L. Fardeau, B. Ollivier et J. C. Baratti. Lipolytic activity from *Halobacteria*: Screening and hydrolase production. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 248(2), 133-140. [<https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.05.044>]

Bhosale, P. Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 63(4), 351-361. [<https://doi.org/10.1007/s00253-003-1441-1>]

Bidle, K. A., T. E. Hanson, K. Howell et J. Nannen. HMG-CoA reductase is regulated by salinity at the level of transcription in *Haloferax volcanii*. *Extremophiles*, 2007, 11(1), 49-55. [<https://doi.org/10.1007/s00792-006-0008-3>]

Birbir, M. et C. Sesal. Extremely halophilic bacterial communities in Şereflikoçhisar Salt Lake in Turkey. *Turkish Journal of Biology*, 2003, 27(1), 7-22.

Birbir, M., B. Calli, B. Mertoglu, R. E. Bardavid, A. Oren, M. N. Ogmen et A. Ogan. Extremely halophilic *Archaea* from Tuz Lake, Turkey, and the adjacent Kaldirim and Kayacik salterns. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2007, 23(3), 309-316. [<https://doi.org/10.1007/s11274-006-9223-4>]

Biswas, J. et A. Paul. Diversity and production of extracellular polysaccharide by halophilic microorganisms. *Biodiversity International Journal*, 2017, 1(2), 32-39. [<http://doi.org/10.15406/bij.2017.01.00006>]

Bonete, M. J. et R. M. Martínez-Espinosa. Enzymes from Halophilic *Archaea*: Open Questions. In A. Ventosa, A. Oren et Y. Ma eds. *Halophiles and Hypersaline Environments: Current Research and Future Trends*. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2011, p. 359-371. [[https://doi.org/10.1007/978-3-662-45796-2\\_19](https://doi.org/10.1007/978-3-662-45796-2_19)]

Bonete, M.J., V. Bautista, J. M. Esclapez Espliego, M. J. García-Bonete, C. Pire, M. Camacho, J. Torregrosa-Crespo et R. M. Martínez-Espinosa. New uses of haloarchaeal species in bioremediation processes. In N. Shiomi ed. *Advances in Bioremediation of Wastewater and Polluted Soil*. Norderstedt: BoD Norderstedt, 2015, p. 23-49. [<https://doi.org/10.5772/60667>]

Bonfá, M. R. L., M. J. Grossman, E. Mellado et L. R. Durrant. Biodegradation of aromatic hydrocarbons by haloarchaea and their use for the reduction of the chemical oxygen demand of hypersaline petroleum produced water. *Chemosphere*, 2011, 84(11), 1671-1676. [<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.05.005>]

Boujelben, I., M. Gomariz, M. Martínez-García, F. Santos, A. Peña, C. López, J. Antón et S. Maalej. spatial and seasonal prokaryotic community dynamics in ponds of increasing salinity of Sfax solar saltern in Tunisia. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2012, 101(4), 845-857. [<https://doi.org/10.1007/s10482-012-9701-7>]

Boutaiba, S., H. Hacene, K. A. Bidle et J. A. Maupin-Furlow. Microbial diversity of the hypersaline Sidi Ameer and Himalatt Salt Lakes of the Algerian Sahara. *Journal of Arid Environments*, 2011, 75(10), 909-916. [<https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2011.04.010>]

- Boutaiba, S., T. Bhatnagar, H. Hacene, D. A. Mitchell et J. C. Baratti. Preliminary characterisation of a lipolytic activity from an extremely halophilic archaeon, *Natronococcus* sp. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2006, 41(1), 21-26. [<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.03.010>]
- Bouteyre, G. et J.-Y. Loyers Sols salés, eaux saumâtres des régions arides tropicales et méditerranéennes: principaux faciès, conséquences pour l'agriculture. In E. Le Floch, M. Grouzis, A. Cornet et J-C Bille eds. *L'aridité : une contrainte au développement : caractérisation, réponses biologiques, stratégies des sociétés*. Paris : ORSTOM. (Didactiques), 1992, p. 69-80.
- Bouyahya, A., Y. Bakri, A. Et-Touys, A. Talbaoui, A. Khouchlaa, S. Charfi, J. Abrini et N. Dakka. Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. *Phytothérapie*, 2017. [<https://doi.org/10.1007/s10298-017-1118-z>].
- Bowers, K. J. et J. Wiegel. Temperature and pH optima of extremely halophilic archaea: a mini-review. *Extremophiles*, 2011, 15(2), 119-128. [<https://doi.org/10.1007/s00792-010-0347-y>]
- Britton, G., S. Liaaen-Jensen et H. Pfander. *Carotenoids, Volume 1B: Spectroscopy*. Edition ed. : Birkhäuser Basel, 1995. ISBN 9783764329099.
- Burns, D. G., H. M. Camakarlis, P. H. Janssen et M. L. Dyall-Smith. Combined use of cultivation-dependent and cultivation-independent methods indicates that members of most haloarchaeal groups in an Australian crystallizer pond are cultivable. *Applied and environmental microbiology*, 2004, 70(9), 5258-5265. [<https://doi.org/10.1128/aem.70.9.5258-5265.2004>]
- Burns, D. et M. Dyall-Smith. Cultivation of Haloarchaea. In *Methods in Microbiology*. : Academic Press, 2006, vol. 35, p. 535-552. [[https://doi.org/10.1016/s0580-9517\(08\)70025-4](https://doi.org/10.1016/s0580-9517(08)70025-4)]
- Cai, L., D. Zhao, J. Hou, J. Wu, S. Cai, P. Dassarma et H. Xiang. Cellular and organellar membrane-associated proteins in haloarchaea: Perspectives on the physiological significance and biotechnological applications. *Science China Life Sciences*, 2012, 55(5), 404-414. [<https://doi.org/10.1007/s11427-012-4321-z>]
- Calegari-Santos, R., R. A. Diogo, J. D. Fontana et T. M. B Bonfim. Carotenoid production by halophilic *Archaea* under different culture conditions. *Current Microbiology*, 2016, 72(5), 641-651. [<https://doi.org/10.1007/s00284-015-0974-8>]
- Calo, P., T. De Miguel, C. Sieiro, J. B. Velazquez et T. G. Villa. Ketocarotenoids in halobacteria: 3-hydroxy-echinenone and trans-astaxanthin. *Journal of Applied Bacteriology*, 1995, 79(3), 282-285. [<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb03138.x>]
- Camacho, R. M., J. C. Mateos-Díaz, D. M. Diaz-Montaña, O. González-Reynoso et J. Córdova. Carboxyl ester hydrolases production and growth of a halophilic archaeon, *Halobacterium* sp. NRC-1. *Extremophiles*, 2009, 14(1), 99-106. [<https://doi.org/10.1007/s00792-009-0291-x>]
- Casamayor, E. O., R. Massana, S. Benlloch, L. Øvreås, B. Díez, V. J. Goddard, J. M. Gasol, I. Joint, F. Rodríguez-Valera et C. Pedrós-Alió. Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a

## Références bibliographiques

---

- multipond solar saltern. *Environmental Microbiology*, 2002, 4(6), 338-348. [<https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00297.x>]
- Caton, T. M., I. R. Caton, L. R. Witte et M. A. Schneegurt. Archaeal diversity at the great salt plains of Oklahoma described by cultivation and molecular analyses. *Microbial Ecology*, 2009, 58(3), 519-528. [<https://doi.org/10.1007/s00248-009-9507-y>]
- Cayol, J.-L., B. Ollivier, D. Alazard, R. Amils, A. Godfroy, D. Marty, F. Piette et D. Prieur. Les conditions de vie extrêmes sur la planète et exobiologie. *Ecologie microbienne*, 2011, 363-371.
- Chakravorty, D. et S. Patra. Attaining extremophiles and extremolytes: methodologies and limitations. In Om V. Singh ed. *Extremophiles: Sustainable Resources and Biotechnological Implications*. : John Wiley & Sons, Ltd, 2012, p. 29-74. [<https://doi.org/10.1002/9781118394144.ch2>]
- Charlesworth, J. C. et B. P. Burns. Untapped resources: biotechnological potential of peptides and secondary metabolites in archaea. *Archaea*, 2015, 1-7. [<https://doi.org/10.1155/2015/282035>]
- Charlesworth, J. et B. P. Burns. Extremophilic adaptations and biotechnological applications in diverse environments. *AIMS Microbiol*, 2016, 2(3), 251-261. [<https://doi.org/10.3934/microbiol.2016.3.251>]
- Chaudhary D.K., A. Khulan et J. Kim. Development of a novel cultivation technique for uncultured soil bacteria. *Science Report*, 2019, 9(1), 1-11. [<https://doi.org/10.1038/s41598-019-43182-x>]
- Chen, Z., R. Bertin et G. Froidi. EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. *Food Chemistry*, 2013, 138(1), 414-420. [<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.001>]
- Chen, S., H.-C. Liu, J. Zhou et H. Xiang. *Haloparvum sedimenti* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Haloferacaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016, 66(6), 2327-2334. [<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001033>]
- Chen, S., Y. Xu, H.-C. Liu, A.-N. Yang et L.-X. Ke. *Halobaculum roseum* sp. nov., isolated from underground salt deposits. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, 67(4), 818-823. [<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001663>]
- Chen, S., Y. Xu, S. Sun, J. Liu et F. Chen. *Halomicrococcus hydrotolerans* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a subterranean salt deposit. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2019. [<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003534>]
- Cho, B. C. Heterotrophic Flagellates in Hypersaline Waters. In N. Gunde-Cimerman, A. Oren et A. Plemenitaš eds. *Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya*. Dordrecht : Springer Netherlands, 2005, p. 541-549. [[https://doi.org/10.1007/1-4020-3633-7\\_34](https://doi.org/10.1007/1-4020-3633-7_34)]
- Çınar, S. et M. B. Mutlu. Comparative analysis of prokaryotic diversity in solar salterns in eastern Anatolia (Turkey). *Extremophiles*, 2016, 20(5), 589-601. [<https://doi.org/10.1007/s00792-016-0845-7>]

- Clementino, M. M., R. P. Vieira, A. M. Cardoso, A. P. A. Nascimento, C. B. Silveira, T. C. Riva, A. S. M. Gonzalez, R. Paranhos, R. M. Albano, A. Ventosa et O. B. Martins. prokaryotic diversity in one of the largest hypersaline coastal lagoons in the world. *Extremophiles*, 2008, 12(4), 595-604. [<https://doi.org/10.1007/s00792-008-0162-x>]
- Clouet-D'orval, B., D. K. Phung, P. S. Langendijk-Genevaux et Y. Quentin. Universal RNA-degrading enzymes in *Archaea*: Prevalence, activities and functions of  $\beta$ -CASP ribonucleases. *Biochimie*, 2015, 118, 278-285. [<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.05.021>]
- Corral, P., M. A. Amoozegar et A. Ventosa. Halophiles and Their Biomolecules: Recent Advances and Future Applications in Biomedicine. *Marine drugs*, 2020, 18(1), 33. [<https://doi.org/10.3390/md18010033>]
- Correa-Llantén, D. N., M. J. Amenábar et J. M. Blamey. Antioxidant capacity of novel pigments from an Antarctic bacterium. *Journal of Microbiology*, 2012, 50(3), 374-379. [<https://doi.org/10.1007/s12275-012-2029-1>]
- Cui, H.-L., Z.-Z. Lü, Y. Li et Y. Zhou. *Salinirussus salinus* gen. nov., sp. nov., isolated from a marine solar saltern. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, 67(9), 3622-3626. [<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002182>]
- Cyplik, P., W. Grajek, R. Marecik, P. Króliczak et R. Dembczyński Application of a membrane bioreactor to denitrification of brine. *Desalination*, 2007, 207(1), 134-143. [<https://doi.org/10.1016/j.desal.2006.07.008>]
- Cytryn, E., D. Minz, R. S. Oremland et Y. Cohen. Distribution and diversity of archaea corresponding to the limnological cycle of a hypersaline stratified lake (Solar lake, Sinai, Egypt). *Applied and environmental microbiology*, 2000, 66(8), 3269-3276. [<https://doi.org/10.1128/aem.66.8.3269-3276.2000>]
- Dalmaso, G. Z. L., D. Ferreira et A. B. Vermelho. Marine extremophiles: a source of hydrolases for biotechnological applications. *Marine drugs*, 2015, 13(4), 1925-1965. [<https://doi.org/10.3390/md13041925>]
- Dassarma, P., M. D. Capes et S. Dassarma. Comparative genomics of *Halobacterium* strains from diverse locations. In S. Das et H.R. Dash eds. *Microbial Diversity in the Genomic Era*. : Academic Press, 2019, p. 285-322. [<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814849-5.00017-4>]
- Dassarma, S., S. P. Kennedy, B. Berquist, W. V. Ng, N. S. Baliga, J. L. Spudich, M. P. Krebs, J. A. Eisen, C. H. Johnson et L. Hood. Genomic perspective on the photobiology of *Halobacterium species* NRC-1, a phototrophic, phototactic, and UV-tolerant haloarchaeon. *Photosynthesis Research*, 2001, 70(1), 3-17.
- Dassarma, S., M. Capes et P. Dassarma. Haloarchaeal Megaplastids. In E. Schwartz ed. *Microbial Megaplastids*. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2009, p. 3-30. [[https://doi.org/10.1007/978-3-540-85467-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-540-85467-8_1)]
- DasSarma, S. et P. DasSarma. Halophiles. In *Encyclopedia of Life Sciences*. : John Wiley & Sons, Ltd, 2017. [<http://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000394.pub4>]
- De Freitas Araújo, M. G., F. Hilário, W. Vilegas, L. C. Dos Santos, I. L. Brunetti, C. E. Sotomayor et T. M. Bauab. Correlation among antioxidant, antimicrobial, hemolytic, and

- antiproliferative properties of *Leiothrix spiralis* leaves extract. *International journal of molecular sciences*, 2012, 13(7), 9260-9277. [<https://doi.org/10.3390/ijms13079260> ]
- De La Haba, R. R., C. Sánchez-Porro, M. C. Marquez et A. Ventosa. Taxonomy of Halophiles. In K. Horikoshi ed. *Extremophiles Handbook*. Tokyo : Springer Japan, 2011, p. 255-308. [[https://doi.org/10.1007/978-4-431-53898-1\\_13](https://doi.org/10.1007/978-4-431-53898-1_13) ]
- De La Vega, M., A. Sayago, J. Ariza, A. G. Barneto et R. León. Characterization of a bacterioruberin producing Haloarchaea isolated from the marshlands of the Odiel river in the southwest of Spain. *Biotechnology progress*, 2016, 32(3), 592-600. [<https://doi.org/10.1002/btpr.2248> ]
- Delgado-García, M., J. A. Rodríguez, J. C. Mateos-Díaz, C. N. Aguilar, R. Rodríguez-Herrera et R. M. Camacho-Ruíz. Halophilic Archaeal Lipases and Esterases: Activity, Stability, and Food Applications. In M. Kuddus ed. *Enzymes in Food Technology: Improvements and Innovations*. Singapore : Springer Singapore, 2018, p. 243-262. [[https://doi.org/10.1007/978-981-13-1933-4\\_12](https://doi.org/10.1007/978-981-13-1933-4_12) ]
- Demnati,F. Biodiversité et Enjeux Socio-économiques des lacs salés (Chotts et Sebkhass) d'Algérie. Cas du Chott Merouane et Melghir. Thèse de doctorat Université Mohamed Khider. Biskra, 2013.
- Demnati, F., B. Samraoui, F. Allache, A. Sandoz et L. Ernoul. A literature review of Algerian salt lakes: values, threats and implications. *Environmental Earth Sciences*, 2017, 76(3), 127. [<https://doi.org/10.1007/s12665-017-6443-x> ]
- Desjardins, P. et D. Conklin NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *Journal of Visualized Experiments*, 2010, (45), 25-65. [<https://doi.org/10.3791/2565> ]
- Ding, J. Y. et M. C. Lai. The biotechnological potential of the extreme halophilic archaea *Haloterrigena* sp. H13 in xenobiotic metabolism using a comparative genomics approach. *Environmental Technology*, 2010, 31(8-9), 905-914. [<https://doi.org/10.1080/09593331003734210> ]
- D'souza, S. E., W. Altekari et S. D'souza. Adaptive response of *Haloferax mediterranei* to low concentrations of NaCl (< 20%) in the growth medium. *Archives of microbiology*, 1997, 168(1), 68-71. [<https://doi.org/10.1007/s002030050471> ]
- Dummer, A. M., J. C. Bonsall, J. B. Cihla, S. M. Lawry, G. C. Johnson et R. F. Peck. Bacterioopsin-mediated regulation of bacterioruberin biosynthesis in *Halobacterium salinarum*. *Journal of bacteriology*, 2011, 193(20), 5658-5667. [<https://doi.org/10.1128/jb.05376-11> ]
- Dumorne, K., D. C. Córdova, M. Astorga-Elo et P. Renganathan. Extremozymes: a potential source for industrial applications. *Journal of Microbiology Biotechnology*, 2017, 27(4), 649-659. [<https://doi.org/10.4014/jmb.1611.11006> ]
- Durand, G. et J.-L. Beaudoux. *Biochimie médicale: Marqueurs actuels et perspectives*. Edition ed. : Lavoisier, 2011. ISBN 2257204727.
- Durvasula, R. et D. S. Rao. Extremophiles: Nature's Amazing Adapters. In *Extremophiles*. : CRC Press, 2018, p. 1-18.

- Dussault, H. P. An improved technique for staining red halophilic bacteria. *Journal of bacteriology*, 1955, 70 (4), 484.
- Dyall-Smith, M. et A. Oren. Culture-dependent study of microbial diversity of lake Chaka. *Applied and environmental microbiology*, 2006, 72(11), 7427. [<https://doi.org/10.1128/aem.01401-06> ]
- Dyall-Smith, M., P. Palm, G. Wanner, A. Witte, D. Oesterhelt et F. Pfeiffer. *Halobacterium salinarum* virus ChaoS9, a novel halovirus related to PhiH1 and PhiCh1. *Genes*, 2019, 10(3), 194. [<https://doi.org/10.3390/genes10030194> ]
- Edbeib, M. F., R. A. Wahab et F. Huyop. Halophiles: biology, adaptation, and their role in decontamination of hypersaline environments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2016, 32(8), 135. [<https://doi.org/10.1007/s11274-016-2081-9> ]
- Edgar, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(5), 1792-1797. [<https://doi.org/10.1093/nar/gkh340> ]
- Eisenberg, H. et E. J. Wachtel. Structural studies of halophilic proteins, ribosomes, and organelles of bacteria adapted to extreme salt concentrations. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, 1987, 16(1), 69-92. [<https://doi.org/10.1146/annurev.bb.16.060187.000441> ]
- El-Agamey, A., G. M. Lowe, D. J. Mearns, A. Mortensen, D. M. Phillip, T. G. Truscott et A. J. Young. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2004, 430(1), 37-48. [<https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.03.007> ]
- Elbanna, K., I. M. Ibrahim et A.-M. Revol-Junelles. Purification and characterization of haloalkali-thermophilic protease from *Halobacterium* sp. strain HP25 isolated from raw salt, Lake Qarun, Fayoum, Egypt. *Extremophiles*, 2015, 19(4), 763-774. [<https://doi.org/10.1007/s00792-015-0752-3> ]
- Elevi Bardavid, R. et A. Oren. Sensitivity of *Haloquadratum* and *Salinibacter* to antibiotics and other inhibitors: implications for the assessment of the contribution of *Archaea* and *Bacteria* to heterotrophic activities in hypersaline environments. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 63(3), 309-315. [<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00433.x> ]
- Elevi Bardavid, R., P. Khristo et A. Oren. Interrelationships between *Dunaliella* and halophilic prokaryotes in saltern crystallizer ponds. *Extremophiles*, 2008, 12(1), 5-14. [<https://doi.org/10.1007/s00792-006-0053-y> ]
- Elevi, R., P. Assa, M. Birbir, A. Ogan et A. Oren. Characterization of extremely halophilic *Archaea* isolated from the Ayvalik Saltern, Turkey. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2004, 20(7), 719-725. [<https://doi.org/10.1007/s11274-004-4515-z> ]
- El-Sayed, W. S. M., S. Takaichi, H. Saida, M. Kamekura, M. Abu-Shady, H. Seki et T. Kuwabara. Effects of light and low oxygen tension on pigment biosynthesis in *Halobacterium salinarum*, revealed by a novel method to quantify both retinal and carotenoids. *Plant and Cell Physiology*, 2002, 43(4), 379-383. [<https://doi.org/10.1093/pcp/pcf044> ]
- Enache, M., G. Teodosiu, T. Itoh, M. Kamekura et H. Stan-Lotter. Halophilic microorganisms from man-made and natural hypersaline environments: Physiology, ecology, and

biotechnological potential. In *Adaption of Microbial Life to Environmental Extremes*. : Springer, 2017, p. 201-226. [[https://doi.org/10.1007/978-3-319-48327-6\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-48327-6_8)]

Escudier, J., B. Gillery, H. Ojeda et F. Etchebarne. Maitrise de la salinité des eaux d'irrigation pour la viticulture. In *BIO Web of Conferences*. : EDP Sciences, 2019, vol. 12. [<https://doi.org/10.1051/bioconf/20191201010>]

Essington, M. E. *Soil and water chemistry: an integrative approach*. Edition ed. : CRC press, 2015. ISBN 0429157967. [<https://doi.org/10.1201/b12397>]

Elshahed, M. S., K. N. Savage, A. Oren, M. C. Gutierrez, A. Ventosa et L. R. Krumholz. *Haloferax sulfurifontis* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a sulfide- and sulfur-rich spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54(6), 2275-2279. [<https://doi.org/10.1099/ijs.0.63211-0>]

Evilia, C. et Y.-M. Hou. Acquisition of an insertion peptide for efficient aminoacylation by a halophile tRNA synthetase. *Biochemistry*, 2006, 45(22), 6835-6845. [<https://doi.org/10.1021/bi0521386>]

Falb, M., K. Müller, L. Königsmaier, T. Oberwinkler, P. Horn, S. Von Gronau, O. Gonzalez, F. Pfeiffer, E. Bornberg-Bauer et D. Oesterhelt. Metabolism of halophilic archaea. *Extremophiles*, 2008, 12(2), 177-196. [<https://doi.org/10.1007/s00792-008-0138-x>]

Fang, C.-J., K.-L. Ku, M.-H. Lee et N.-W. Su. Influence of nutritive factors on C50 carotenoids production by *Haloferax mediterranei* ATCC 33500 with two-stage cultivation. *Bioresource technology*, 2010, 101(16), 6487-6493. [<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.044>]

Fariq, A., A. Yasmin et M. Jamil. Production, characterization and antimicrobial activities of bio-pigments by *Aquisalibacillus elongatus* MB592, *Salinicoccus sesuvii* MB597, and *Halomonas aquamarina* MB598 isolated from Khewra Salt Range, Pakistan. *Extremophiles*, 2019, 23(4), 435-449. [<https://doi.org/10.1007/s00792-019-01095-7>]

Farkas, Á., T. Bencsik et J. Deli. Carotenoids as Food Additives. In: E. Jacob-Lopes, M. ueiroz et L. Zepka eds. *Pigments from Microalgae Handbook*. Cham : Springer International Publishing, 2020, p. 421-474. [[https://doi-org-443.webvpn.jnu.edu.cn/10.1007/978-3-030-50971-2\\_17](https://doi-org-443.webvpn.jnu.edu.cn/10.1007/978-3-030-50971-2_17)].

Felsenstein, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 1985, 783-791. [<https://doi.org/10.2307/2408678>]

Fendrihan, S., A. Legat, M. Pfaffenhuemer, C. Gruber, G. Weidler, F. Gerbl et H. Stan-Lotter. Extremely halophilic archaea and the issue of long-term microbial survival. *Re/views in environmental science and bio/technology*, 2006, 5(2-3), 203-218. [<https://doi.org/10.1007/s11157-006-0007-y>]

Fendrihan, S., M. Dornmayr Pfaffenhuemer, F. Gerbl, A. Holzinger, M. Grösbacher, P. Briza, A. Erler, C. Gruber, K. Plätzer et H. Stan Lotter. Spherical particles of halophilic archaea correlate with exposure to low water activity—implications for microbial survival in fluid inclusions of ancient halite. *Geobiology*, 2012, 10(5), 424-433. [<https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2012.00337.x>]

- Fernández, A. B., B. Vera-Gargallo, C. Sánchez-Porro, R. Ghai, R. T. Papke, F. Rodriguez-Valera et A. Ventosa. Comparison of prokaryotic community structure from Mediterranean and Atlantic saltern concentrator ponds by a metagenomic approach. *Frontiers in microbiology*, 2014, 5(196). [<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00196>]
- Fernandes, A. S., T. C. Do Nascimento, E. Jacob-Lopes, V. V. De Rosso et L. Q. Zepka. Carotenoids: a brief overview on its structure, biosynthesis, synthesis, and applications. *Progress in Carotenoid Research*, 2018, 1. [<https://doi.org/10.5772/intechopen.79542>]
- Flores, N., S. Hoyos, M. Venegas, A. Galetović, L. M. Zúñiga, F. Fábrega, B. Paredes, C. Salazar-Ardiles, C. Vilo, C. Ascaso, J. Wierzchos, V. Souza-Egipsy, J. E. Araya, R. A. Batista-García et B. Gómez-Silva. *Haloterrigena* sp. strain SGH1, a bacterioruberin-rich, perchlorate-tolerant halophilic archaeon isolated from halite microbial communities, Atacama desert, Chile. *Frontiers in microbiology*, 2020, 11(324). [<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00324>]
- Franzmann, P. D., E. Stackebrandt, K. Sanderson, J. K. Volkman, D. E. Cameron, P. L. Stevenson, T. A. Mcmeekin et H. R. Burton. *Halobacterium lacusprofundi* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from Deep Lake, Antarctica. *Systematic and Applied Microbiology*, 1988, 11(1), 20-27. [[https://doi.org/10.1016/s0723-2020\(88\)80044-4](https://doi.org/10.1016/s0723-2020(88)80044-4)]
- Frazier, W. C. A. Method for the detection of changes in gelatin due to bacteria. *The Journal of Infectious Diseases*, 1926, 39(4), 302-309. [<https://doi.org/10.1093/infdis/39.4.302>]
- Fukushima, T., T. Mizuki, A. Echigo, A. Inoue et R. Usami. Organic solvent tolerance of halophilic  $\alpha$ -amylase from a Haloarchaeon, *Haloarcula* sp. strain S-1. *Extremophiles*, 2005, 9(1), 85-89. [<https://doi.org/10.1007/s00792-004-0423-2>]
- Gallen, C. et J. Pla. Allergie et intolérance aux additifs alimentaires. *Revue Française d'Allergologie*, 2013, 53, 9-18. [[https://doi.org/10.1016/s1877-0320\(13\)70044-7](https://doi.org/10.1016/s1877-0320(13)70044-7)]
- García-Fraga, B., A. F. Da Silva, J. López-Seijas et C. Sieiro. Functional expression and characterization of a chitinase from the marine archaeon *Halobacterium salinarum* CECT 395 in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(5), 2133-2143. [<https://doi.org/10.1007/s00253-013-5124-2>]
- Ghai, R., L. Pašić, A. B. Fernández, A.-B. Martin-Cuadrado, C. M. Mizuno, K. D. McMahon, R. T. Papke, R. Stepanauskas, B. Rodriguez-Brito, F. Rohwer, C. Sánchez-Porro, A. Ventosa et F. Rodríguez-Valera. New abundant microbial groups in aquatic hypersaline environments. *Scientific Reports*, 2011, 1(1), 135. [<https://doi.org/10.1038/srep00135>]
- Ghosh, S., S. Kumar et S. K. Khare. Microbial diversity of saline habitats: An overview of biotechnological applications. In B. Giri et A. Varma eds. *Microorganisms in Saline Environments: Strategies and Functions*. Cham : Springer International Publishing, 2019, p. 65-92. [[https://doi.org/10.1007/978-3-030-18975-4\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-030-18975-4_4)]
- Giani, M., I. Garbayo, C. Vílchez et R. M. Martínez-Espinosa. Haloarchaeal carotenoids: healthy novel compounds from extreme environments. *Marine drugs*, 2019, 17(9), 524. [<https://doi.org/10.3390/md17090524>]
- Giani, M., J. M. Miralles-Robledillo, G. Peiró, C. Pire et R. M. Martínez-Espinosa. Deciphering Pathways for Carotenogenesis in Haloarchaea. *Molecules*, 2020, 25(5), 1197. [<https://doi.org/10.3390/molecules25051197>]

- Giddings, L.-A. et D. J. Newman. Bioactive compounds from terrestrial Extremophiles. In L.-A. Giddings et D.J. Newman eds. *Bioactive Compounds from Terrestrial Extremophiles*. Cham : Springer International Publishing, 2015, p. 1-75. [[https://doi.org/10.1007/978-3-319-13260-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-13260-0_1)]
- Giménez, M. I., C. A. Studdert, J. J. Sánchez et R. E. De Castro. Extracellular protease of *Natrialba magadii*: purification and biochemical characterization. *Extremophiles*, 2000, 4(3), 181-188. [<https://doi.org/10.1007/s007920070033>]
- Giovanella, P., G. a. L. Vieira, I. V. Ramos Otero, E. Pais Pellizzer, B. De Jesus Fontes et L. D. Sette. Metal and organic pollutants bioremediation by extremophile microorganisms. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 382, 121024. [<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121024>]
- Goldman, N. Maximum likelihood inference of phylogenetic trees, with special reference to a poisson process model of DNA substitution and to parsimony analyses. *Systematic Biology*, 1990, 39(4), 345-361. [<https://doi.org/10.2307/2992355>]
- Gómez-Villegas, P., J. Vígara et R. León. Characterization of the microbial population inhabiting a solar saltern pond of the Odiel Marshlands (SW Spain). *Marine drugs*, 2018, 16(9), 332. [<https://doi.org/10.3390/md16090332>]
- Gornitz, V. *Encyclopedia of paleoclimatology and ancient environments*. Edition ed. : Springer Science & Business Media, 2008. ISBN 1402045514.
- Guo-Ping, Z., L. Ying-Qiu, Y. Jie et C. Kai-Yu. Antibacterial characteristics of orange pigment extracted from *Monascus pigments* against *Escherichia coli*. *Czech Journal of Food Sciences*, 2016, 34(3), 197-203. [<https://doi.org/10.17221/430/2015-cjfs>]
- Gutiérrez, C. et C. González. Method for simultaneous detection of proteinase and esterase activities in extremely halophilic bacteria. *Applied microbiology*, 1972, 24(3), 516-517. [<https://doi.org/10.1128/aem.24.3.516-517.1972>]
- Gunde-Cimerman, N. et P. Zalar. Extremely halotolerant and halophilic fungi inhabit brine in solar salterns around the globe. *Food Technology and Biotechnology*, 2014, 52(2), 170-179.
- Gunde-Cimerman, N., A. Plemenitaš et A. Oren. Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. *FEMS Microbiology Reviews*, 2018, 42(3), 353-375. [<https://doi.org/10.1093/femsre/fuy009>]
- Gupta, R. S., S. Naushad et S. Baker. Phylogenomic analyses and molecular signatures for the class Halobacteria and its two major clades: a proposal for division of the class *Halobacteria* into an emended order *Halobacteriales* and two new orders, *Haloferacales* ord. nov. and *Natrialbales* ord. nov., containing the novel families *Haloferacaceae* fam. nov. and *Natrialbaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65(3), 1050-1069. [<https://doi.org/10.1099/ijs.0.070136-0>]
- Gupta, R. S., S. Naushad, R. Fabros et M. Adeolu. 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 the families, *Haloferacaceae* and *Halorubraceae* fam. nov.

- Antonie van Leeuwenhoek, 2016, 109(4), 565-587. [<https://doi.org/10.1007/s10482-016-0660-2>]
- Hacène, H., F. Raza, N. Chebhouni, S. Boutaiba, T. Bhatnagar, J. C. Baratti et B. Ollivier. Biodiversity of prokaryotic microflora in El Golea Salt lake, Algerian Sahara. *Journal of Arid Environments*, 2004, 58(3), 273-284. [<https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2003.08.006>]
- Hamidi, M., M. Abdin, H. Nazemyieh, M. Hejazi et M. Hejazi. Optimization of total carotenoid production by *Halorubrum* sp. TBZ126 using response surface methodology. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 2014, 6, 286-294. [<https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000158>]
- Hamidi, M., M. S. Hejazi, H. Nazemyieh, M. A. Hejazi et D. Naziri. *Halorubrum* sp. TBZ112, an extremely halophilic carotenoid-producing archaeon isolated from Urmia Lake. *Pharmaceutical Sciences*, 2017, 23(2), 150-158. [<https://doi.org/10.15171/ps.2017.22>]
- Han, D., L. Zhu et H.-L. Cui. *Halorussus litoreus* sp. nov., isolated from the salted brown alga *Laminaria*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2019, 69(3), 767-772. [<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003233>]
- Han, D. et H.-L. Cui. *Halostella pelagica* sp. nov. and *Halostella litorea* sp. nov., isolated from salted brown alga *Laminaria*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2020, 70(3), 1969-1976. [<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004003>]
- Harley, J. P. Harley-Prescott: Laboratory exercises in microbiology. In : McGraw-Hill. México, 2002, p. 1-350.
- Hayward, A. C. Detection of gas production from glucose by heterofermentative lactic acid bacteria. *Microbiology*, 1957, 16(1), 9-15. [<https://doi.org/10.1099/00221287-16-1-9>]
- Hedi, A., N. Sadfi, M.-L. Fardeau, H. Rebib, J.-L. Cayol, B. Ollivier et A. Boudabous. Studies on the biodiversity of halophilic microorganisms isolated from El-Djerid Salt lake (Tunisia) under aerobic conditions. *International journal of microbiology*, 2009, 9, 1-17. [<https://doi.org/10.1155/2009/731786>]
- Hezayen, F. F., B. H. A. Rehm, R. Eberhardt et A. Steinbüchel. Polymer production by two newly isolated extremely halophilic archaea: application of a novel corrosion-resistant bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, 54(3), 319-325. [<https://doi.org/10.1007/s002530000394>]
- Holding, A. J. et J. G. Collee. Chapter I Routine biochemical tests. In J.R. Norris et D.W. Ribbons eds. *Methods in Microbiology*. : Academic Press, 1971, vol. 6, p. 1-32. [[https://doi.org/10.1016/s0580-9517\(08\)70573-7](https://doi.org/10.1016/s0580-9517(08)70573-7)]
- Horikoshi, K. Alkaliphiles. In *Encyclopedia of Life Sciences*. : John Wiley & Sons, Ltd ,2008. [<https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000337.pub2>]
- Horikoshi, K., G. Antranikian, A. T. Bull, F. T. Robb et K. O. Stetter. *Extremophiles handbook*. Edition ed. : Springer Science & Business Media, 2011. ISBN 4431538976. [<https://doi.org/10.1007/978-4-431-53898-1>]
- Horikoshi, K. et A. T. Bull. Prologue: Definition, categories, distribution, origin and evolution, pioneering studies, and emerging fields of Extremophiles. In K. Horikoshi ed.

## Références bibliographiques

---

- Extremophiles Handbook*. Tokyo : Springer Japan, 2011, p. 3-15.  
[ [https://doi.org/10.1007/978-4-431-53898-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-4-431-53898-1_1) ]
- Hou, J. et H.-L. Cui. In Vitro antioxidant, antihemolytic, and anticancer activity of the carotenoids from halophilic archaea. *Current Microbiology*, 2018, 75(3), 266-271.  
[ <https://doi.org/10.1007/s00284-017-1374-z> ]
- Hu, C.-C., J.-T. Lin, F.-J. Lu, F.-P. Chou et D.-J. Yang. Determination of carotenoids in *Dunaliella salina* cultivated in Taiwan and antioxidant capacity of the algal carotenoid extract. *Food Chemistry*, 2008, 109(2), 439-446.  
[ <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.043> ]
- Hutcheon, G. W., N. Vasisht et A. Bolhuis. Characterisation of a highly stable  $\alpha$ -amylase from the halophilic archaeon *Haloarcula hispanica*. *Extremophiles*, 2005, 9(6), 487-495.  
[ <https://doi.org/10.1007/s00792-005-0471-2> ]
- Ibrahim, H. a. H. Antibacterial carotenoids of three *Holothuria* species in Hurghada, Egypt. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 2012, 38(3), 185-194.  
[ <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2013.01.004> ]
- Ibrahim, D., T. F. Nazari, J. Kassim et S.-H. Lim. Prodigiosin-an antibacterial red pigment produced by *Serratia marcescens* IBRL USM 84 associated with a marine sponge *Xestospongia testudinaria*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2014, 4, 1-6.  
[ <https://doi.org/10.7324/japs.2014.401001> ]
- Imadalou-Idres, N., A. Carré-Mlouka, M. Vandervennet, H. Yahiaoui, J. Peduzzi et S. Rebuffat. Diversity and antimicrobial activity of cultivable halophilic archaea from three Algerian sites. *Journal of Life Sciences*, 2013, 7(10), 1057.
- INSID : Institut National des Sols, de l'Irrigation et du Drainage. Sols salins en Algérie, 2008. p. 1-6.
- Jayaraman, J. D., S. Sigamani, D. Arul, K. Nedunchelizan, P. Pachiappan et D. Ramamurthy. Molecular characterization and antioxidant assay of pigment producing bacteria, *Sphingomonas paucimobilis* and *Microbacterium arborescens* isolated from fresh water sediments. *Natural Product Research*, 2020, 34(8), 1192-1196.  
[ <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1553171> ]
- Kajale, S., N. Deshpande, S. Pali, Y. Shouche et A. Sharma. *Natrialba swarupiae* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a hypersaline lake in India. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2020, 70(3), 1876-1881.  
[ <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003986> ]
- Kakhki, A. M., M. A. Amoozegar et E. M. Khaledi. Diversity of hydrolytic enzymes in haloarchaeal strains isolated from salt lake. *International Journal of Environmental Science & Technology*, 2011, 8(4), 705-714. [ <https://doi.org/10.1007/bf03326255> ]
- Kandler, O. et H. König. Cell wall polymers in Archaea (Archaeobacteria). *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 1998, 54(4), 305-308.  
[ <https://doi.org/10.1007/s000180050156> ]
- Kanekar, P. P., S. P. Kanekar, A. S. Kelkar et P. K. Dhakephalkar. Halophiles – Taxonomy, diversity, physiology and applications. In T. Satyanarayana et B.N. Johri eds. *Microorganisms*

in *Environmental Management: Microbes and Environment*. Dordrecht : Springer Netherlands, 2012, p. 1-34. [[https://doi.org/10.1007/978-94-007-2229-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-94-007-2229-3_1)]

Karpiński, T. M. et A. Adamczak. Fucoxanthin—An Antibacterial carotenoid. *Antioxidants*, 2019, 8(8), 239. [<https://doi.org/10.3390/antiox8080239>]

Kates, M. Structural analysis of phospholipids and glycolipids in extremely halophilic archaeobacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 1996, 25(2), 113-128. [[https://doi.org/10.1016/0167-7012\(96\)00010-3](https://doi.org/10.1016/0167-7012(96)00010-3)]

Kebbouche-Gana, S., M. L. Gana, S. Khemili, F. Fazouane-Naimi, N. A. Bouanane, M. Penninckx et H. Hacene. Isolation and characterization of halophilic Archaea able to produce biosurfactants. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2009, 36, 727–738. [<https://doi.org/10.1007/s10295-009-0545-8>]

Keith-Roach, M. J., N. D. Bryan, R. D. Bardgett et F. R. Livens. Seasonal changes in the microbial community of a salt marsh, measured by phospholipid fatty acid analysis. *Biogeochemistry*, 2002, 60(1), 77-96. [<https://doi.org/10.1023/A:1016553225977>]

Khallef, S. Etude de la flore bactérienne halophile cultivable des zones humides de Ouargla (Algérie). Thèse de doctorat Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou, 2019.

Kharroub, K., M. Aguilera, T. Quesada, J. A. Morillo, A. Ramos-Cormenzana, A. Boulharouf et M. Monteoliva-Sanchez. *Salicola salis* sp. nov., an extremely halophilic bacterium isolated from Ezzemoul sabkha in Algeria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56(11), 2647-2652. [<https://doi.org/10.1099/ijs.0.64482-0>]

Kharroub, K. Identification et étude moléculaire des bactéries et des archéobactéries aérobies halophiles de la sebkha Ezzemoul (Ain M'Lila). Thèse de doctorat Université Mentouri. Constantine, 2007.

Kharroub, K., M. Gomri, M. Aguilera et M. Monteoliva-Sánchez Diversity of hydrolytic enzymes in haloarchaea isolated from Algerian sabkhas. *African Journal of Microbiology Research*, 2014, 8(52), 3992-4001. [<https://doi.org/10.5897/AJMR2014.7183>]

Khemili-Talbi, S., S. Kebbouche-Gana, S. Akmoussi-Toumi, Y. Angar et M. L. Gana. Isolation of an extremely halophilic archaeon *Natrialba* sp. C21 able to degrade aromatic compounds and to produce stable biosurfactant at high salinity. *Extremophiles*, 2015, 19(6), 1109-1120. [<https://doi.org/10.1007/s00792-015-0783-9>]

Kiadehi, M. S. H., M. A. Amoozegar, S. Asad et M. Siroosi. Exploring the potential of halophilic archaea for the decolorization of azo dyes. *Water Science and Technology*, 2018, 77(6), 1602-1611. [<https://doi.org/10.2166/wst.2018.040>]

Kim, T. W., Y. Joung, J. H. Han, W. Jung et S. B. Kim. Antibiotic resistance among aquatic bacteria in natural freshwater environments of Korea. *Journal of Water and Health*, 2015, 13(4), 1085-1097. [<https://doi.org/10.2166/wh.2015.032>]

Kish, A. et J. Diruggiero. DNA Replication and Repair in halophiles. In R.H. Vreeland ed. *Advances in Understanding the Biology of Halophilic Microorganisms*. Dordrecht : Springer Netherlands, 2012, p. 163-198. [[https://doi.org/10.1007/978-94-007-5539-0\\_7](https://doi.org/10.1007/978-94-007-5539-0_7)]

- Klingl, A. S-layer and cytoplasmic membrane—exceptions from the typical archaeal cell wall with a focus on double membranes. *Frontiers in microbiology*, 2014, 5, 624. [<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00624>]
- Koull, N., A. Chehma, N. Hamouda, O. Bellahcene et N. Guezzoun. Qualité des eaux des zones humides du bas sahara algerien. *Revue des BioRessources*, 2016, 6(1), 113-124. [<https://doi.org/10.12816/0045900>]
- Knoblauch, C., M. Griep et C. Friedrich. Recent advances in the field of bionanotechnology: an insight into optoelectric bacteriorhodopsin, quantum dots, and noble metal nanoclusters. *Sensors*, 2014, 14(10), 19731-19766. [<https://doi.org/10.3390/s141019731>]
- Kobayashi, T., H. Kanai, T. Hayashi, T. Akiba, R. Akaboshi et K. Horikoshi Haloalkaliphilic maltotriose-forming alpha-amylase from the archaeobacterium *Natronococcus* sp. strain Ah-36. *Journal of bacteriology*, 1992, 174(11), 3439-3444. [<https://doi.org/10.1128/jb.174.11.3439-3444.1992>]
- Koller, M. Polyhydroxyalkanoate biosynthesis at the edge of water activity-haloarchaea as biopolyester factories. *Bioengineering*, 2019, 6(2), 34. [<https://doi.org/10.3390/bioengineering6020034>]
- Kour, D., K. L. Rana, T. Kaur, B. Singh, V. S. Chauhan, A. Kumar, A. A. Rastegari, N. Yadav, A. N. Yadav et V. K. Gupta. Extremophiles for hydrolytic enzymes productions: biodiversity and potential biotechnological applications. *Bioprocessing for Biomolecules Production*, 2019, 321-372. [<https://doi.org/10.1002/9781119434436.ch16>]
- Kuchina, N. Topical halobacteria extract composition for treating radiation skin tissue damage. U.S. Patent Application No 15/796,897. In : Google Patents, 2018.
- Kumar, C. G., P. Mongolla, S. Pombala, A. Kamle et J. Joseph. Physicochemical characterization and antioxidant activity of melanin from a novel strain of *Aspergillus bridgeri* ICTF-201. *Letters in Applied Microbiology*, 2011, 53(3), 350-358. [<https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2011.03116.x>]
- Kumar, N., A. Singh, D. K. Sharma et K. Kishore. Toxicity of food additives. In R.L. Singh et S. Mondal eds. *Food Safety and Human Health*. : Academic Press, 2019, p. 67-98. [<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816333-7.00003-5>]
- Kumar, S., J. Grewal, A. Sadaf, R. Hemamalini et S. K. Khare. Halophiles as a source of polyextremophilic  $\alpha$ -amylase for industrial applications. *AIMS Microbiol*, 2016a, 2, 1-26. [<https://doi.org/10.3934/microbiol.2016.1.1>]
- Kumar, S., G. Stecher et K. Tamura MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 2016b, 33(7), 1870-1874. [<https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>]
- Kumar, V. et S. K. Tiwari. Halocin diversity among halophilic archaea and their applications. In T. Satyanarayana, B.N. Johri et S.K. Das eds. *Microbial Diversity in Ecosystem Sustainability and Biotechnological Applications: Volume 1. Microbial Diversity in Normal & Extreme Environments*. Singapore : Springer Singapore, 2019, p. 497-532. [[https://doi.org/10.1007/978-981-13-8315-1\\_16](https://doi.org/10.1007/978-981-13-8315-1_16)]

- Kushner, D. J. Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria. In: D.J Kushner (ed). *Microbial life in extreme environments*. Academic, London, 1978, p. 317–368.
- Kushwaha, S. et M. Kates. Effect of nicotine on biosynthesis of C50 carotenoids in *Halobacterium cutirubrum*. *Canadian journal of biochemistry*, 1975, 54(9), 824-829. [<https://doi.org/10.1139/o76-118>]
- Kushwaha, S. et M. Kates. Effect of glycerol on carotenogenesis in the extreme halophile, *Halobacterium cutirubrum*. *Canadian journal of microbiology*, 1976, 25(11), 1288-1291. [<https://doi.org/10.1139/m79-203>]
- Kushwaha, S., G. Juez-Perez, F. Rodriguez-Valera, M. Kates et D. Kushner. Survey of lipids of a new group of extremely halophilic bacteria from salt ponds in Spain. *Canadian Journal of Microbiology*, 1982, 28(12), 1365-1372. [<https://doi.org/10.1139/m82-203>]
- Lamoril, J., N. Ameziane, J. C. Deybach, P. Bouizegarène et M. Bogard. Les techniques de séquençage de l'ADN : une révolution en marche. Première partie. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 2008, 23(5), 260-279. [<https://doi.org/10.1016/j.immbio.2008.07.016>].
- Lanyi, J. K. et S. P. Balashov. Xanthorhodopsin. In A. Ventosa, A. Oren et Y. Ma eds. *Halophiles and Hypersaline Environments: Current Research and Future Trends*. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2011, p. 319-340. [[https://doi.org/10.1007/978-3-662-45796-2\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-662-45796-2_17)]
- Lefevre, T., M. Raymond et F. Thomas *Biologie évolutive*. Edition ed. : De Boeck Supérieur, 2016. ISBN 2807302963.
- Leong, L. P. et G. Shui. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chemistry*, 2002, 76(1), 69-75. [[https://doi.org/10.1016/s0308-8146\(01\)00251-5](https://doi.org/10.1016/s0308-8146(01)00251-5)]
- León, M. J., T. Hoffmann, C. Sánchez-Porro, J. Heider, A. Ventosa et E. Bremer. Compatible solute synthesis and import by the moderate halophile *Spiribacter salinus*: physiology and genomics. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9(108). [<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00108>]
- Lestini, R., F. Delpech et H. Myllykallio. DNA replication restart in archaea. *Advances in DNA Repair*, 2015, 381-404. [<https://doi.org/10.5772/59994>]
- Leuko, S., F. Goh, M. Allen, B. Burns, M. Walter et B. Neilan. Analysis of intergenic spacer region length polymorphisms to investigate the halophilic archaeal diversity of stromatolites and microbial mats. *Extremophiles*, 2007, 11(1), 203-210. [<https://doi.org/10.1007/s00792-006-0028-z>]
- Liaaen-Jensen, S. et A. Jensen. Quantitative determination of carotenoids in photosynthetic tissues. In *Methods in Enzymology*. : Academic Press, 1971, vol. 23, p. 586-602. [[https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(71\)23132-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(71)23132-3)]
- Li, X. et H.-Y. Yu. Characterization of a halostable endoglucanase with organic solvent-tolerant property from *Haloarcula* sp. G10. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 62, 101-106. [<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.08.047>]

- Li, X. et H.-Y. Yu. Characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Haloarcula* sp. G41 and its application for biodiesel production. *Folia Microbiologica*, 2014, 59(6), 455-463. [<https://doi.org/10.1007/s12223-014-0320-8>]
- Li, Y.-T., Y. Tian, H. Tian, T. Tu, G.-Y. Gou, Q. Wang, Y.-C. Qiao, Y. Yang et T.-L. Ren. A review on bacteriorhodopsin-based bioelectronic devices. *Sensors*, 2018, 18(5), 1368. [<https://doi.org/10.3390/s18051368>]
- Litchfield, C. et P. Gillevet. Microbial diversity and complexity in hypersaline environments: a preliminary assessment. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2002, 28(1), 48-55. [<https://doi.org/10.1038/sj/jim/7000175>]
- Liu, Q., M. Ren et L.-L. Zhang. *Natribaculum breve* gen. nov., sp. nov. and *Natribaculum longum* sp. nov., halophilic archaea isolated from saline soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65(Pt\_2), 604-608. [<https://doi.org/10.1099/ijs.0.060541-0>]
- Lizama, C., M. Monteoliva-Sánchez, B. Prado, A. Ramos-Cormenzana, J. Weckesser et V. Campos. Taxonomic study of extreme halophilic archaea isolated from the “Salar de Atacama”, Chile. *Systematic and Applied Microbiology*, 2001, 24(3), 464-474. [<https://doi.org/10.1078/0723-2020-00053>]
- Loeb, J. et R. F. Loeb. The influence of electrolytes on the solution and precipitation of casein and gelatin. *The Journal of general physiology*, 1921, 4(2), 187-211. [<https://doi.org/10.1085/jgp.4.2.187>]
- Londei, P. Archaeal ribosomes. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. : John Wiley & Sons, Ltd, 2001, p.1-5. [<https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000293.pub3>]
- Lopalco, P., S. Lobasso, M. Baronio, R. Angelini et A. Corcelli. Impact of Lipidomics on the Microbial World of Hypersaline Environments. In A. Ventosa, A. Oren et Y. Ma eds. *Halophiles and Hypersaline Environments: Current Research and Future Trends*. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2011, p. 123-135. [[https://doi.org/10.1007/978-3-642-20198-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-642-20198-1_6)]
- López-García, P., F. Gaill et D. Moreira. Wide bacterial diversity associated with tubes of the vent worm *Riftia pachyptila*. *Environmental Microbiology*, 2002, 4(4), 204-215. [<https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00286.x>]
- López-García, P. Extremophiles. In M. Gargaud, B. Barbier, H. Martin et J. Reisse eds. *Lectures in Astrobiology: Volume I*. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2005, p. 657-679. [[https://doi.org/10.1007/10913406\\_20](https://doi.org/10.1007/10913406_20)]
- Łopusiewicz, Ł. Isolation, characterisation and biological activity of melanin from *Exidia nigricans*. *World Scientific News*, 2018, 91, 111-129.
- Lorantfy, B., T. Renkecz, C. Koch, G. Horvai, B. Lendl et C. Herwig. Identification of lipophilic bioproduct portfolio from bioreactor samples of extreme halophilic archaea with HPLC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2014, 406(9), 2421-2432. [<https://doi.org/10.1007/s00216-014-7626-x>]
- Luk, A. W. S., T. J. Williams, S. Erdmann, R. T. Papke et R. Cavicchioli. Viruses of haloarchaea. *Life*, 2014, 4(4), 681-715. [<https://doi.org/10.3390/life4040681>]

- Luque, R., C. M. González-Domenech, I. Llamas, E. Quesada et V. Béjar. Diversity of culturable halophilic archaea isolated from Rambla Salada, Murcia (Spain). *Extremophiles*, 2012, 16(2), 205-213. [<https://doi.org/10.1007/s00792-011-0420-1>]
- Machmudah, S. et M. Goto. Methods for Extraction and Analysis of Carotenoids. In K.G. Ramawat et J.-M. Mérillon eds. *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2013, p. 3367-3411. [[https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6\\_145](https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_145)]
- Majeed, H. Z. Antimicrobial activity of *Micrococcus luteus* carotenoid pigment. *Al-Mustansiriyah Journal of Science*, 2017, 28(1), 65-70. [<https://doi.org/10.23851/mjs.v28i1.314>]
- Kakhki, A. M., M. A. Amoozegar et E. M. Khaledi. Diversity of hydrolytic enzymes in haloarchaeal strains isolated from salt lake. *International Journal of Environmental Science & Technology*, 2011, 8(4), 705-714. [<https://doi.org/10.1007/BF03326255>]
- Makhdoumi-Kakhki, A., M. A. Amoozegar, B. Kazemi, L. Paic et A. Ventosa. Prokaryotic diversity in Aran-Bidgol Salt lake, the largest hypersaline playa in Iran. *Microbes and Environments*, 2012, 27(1), 87-93. [<https://doi.org/10.1264/jsme2.me11267>]
- Mandelli, F., V. S. Miranda, E. Rodrigues et A. Z. Mercadante. Identification of carotenoids with high antioxidant capacity produced by extremophile microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012, 28(4), 1781-1790. [<https://doi.org/10.1007/s11274-011-0993-y>]
- Mani, V. M., M. S. Priya, S. Dhaylini et K. Preethi. Antioxidant and antimicrobial evaluation of bioactive pigment from *Fusarium* sp. isolated from stressed environment. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2015, 4(6), 1147-1158.
- Manikandan, M., L. Pašić et V. Kannan. Purification and biological characterization of a halophilic thermostable protease from *Haloferax lucentensis* VKMM 007. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 25(12), 2247-2256. [<https://doi.org/10.1007/s11274-009-0132-1>]
- Manousaki, E. et N. Kalogerakis. Halophytes—an emerging trend in phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation*, 2011, 13(10), 959-969. [<https://doi.org/10.1080/15226514.2010.532241>]
- Market Data Forecast. (2020). Global Food Additives Market by Product (Flavors & Enhancers, Antioxidants, Anticaking Agents, Emulsifiers, Sweeteners, Stabilizers, Colorants, Fat Replacers, Others), Application (Confectionary, Hotels, Bakery, Dairy & Frozen Products, Meat, Poultry & Seafood Products, Beverages, Others), Source (Natural and Synthetic), and by Regional Analysis (North America, Europe, Asia Pacific, Latin America, and Middle East & Africa) - Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends, and Forecast (2020 – 2025). 175P. [<https://www.marketdataforecast.com/market-reports/global-food-additives-market>]
- Marlet, S. et J.-O. Job. Processus et gestion de la salinité des sols. In *Traité d'irrigation, Seconde édition*. : Tec & Doc Lavoisier, 2006.

- Martins, F. C. O. L., M. A. Sentanin et D. De Souza. Analytical methods in food additives determination: Compounds with functional applications. *Food Chemistry*, 2019, 272, 732-750. [<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.060>]
- Menasria, T., M. Aguilera, H. Hocine, L. Benammar, A. Ayachi, A. Si Bachir, A. Dekak et M. Monteoliva-Sánchez. Diversity and bioprospecting of extremely halophilic archaea isolated from Algerian arid and semi-arid wetland ecosystems for halophilic-active hydrolytic enzymes. *Microbiological Research*, 2018, 207, 289-298. [<https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.12.011>]
- Merabet, S. Etude comparative de deux systèmes aquatiques dans le Sahara septentrional (Chott Merouane et Ain El Beida), environnement et signes de dégradation. Mémoire de magister Université de Kasdi Merbah Ouergla, 2011.
- Miller, N. J., J. Sampson, L. P. Candeias, P. M. Bramley et C. A. Rice-Evans. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters*, 1996, 384(3), 240-242. [[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00323-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00323-7)]
- Minegishi, H., A. Echigo, S. Nagaoka, M. Kamekura et R. Usami. *Halarchaeum acidiphilum* gen. nov., sp. nov., a moderately acidophilic haloarchaeon isolated from commercial solar salt. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(11), 2513-2516. [<https://doi.org/10.1099/ijs.0.013722-0>]
- Minegishi, H., Y. Shimane, A. Echigo, Y. Ohta, Y. Hatada, M. Kamekura, T. Maruyama et R. Usami. Thermophilic and halophilic  $\beta$ -agarase from a halophilic archaeon *Halococcus* sp. 197A. *Extremophiles : life under extreme conditions*, 2013, 17(6), 931-939. [<https://doi.org/10.1007/s00792-013-0575-z>]
- Minegishi, H., R. Shimogaki, S. Enomoto, A. Echigo, Y. Kondo, S. Nagaoka, Y. Shimane, M. Kamekura, T. Itoh, M. Ohkuma, T. Nunoura, K. Takai et R. Usami. *Halopiger thermotolerans* sp. nov., a thermo-tolerant haloarchaeon isolated from commercial salt. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016, 66(12), 4975-4980. [<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001455>]
- Minegishi, H. et M. Kamekura. *Haloterrigena*. In M.E. Trujillo, S. Dedysh, P. DeVos, B. Hedlund, P. Kämpfer, F.A. Rainey et W.B. Whitman eds. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. : John Wiley & Sons, Ltd, 2019a. p. 1-11.
- Minegishi, H. et M. Kamekura. *Natrinema*. In M.E. Trujillo, S. Dedysh, P. DeVos, B. Hedlund, P. Kämpfer, F.A. Rainey et W.B. Whitman eds. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. : John Wiley & Sons, Ltd, 2019b, p. 1-11. [<https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00490.pub2>]
- Mizuno, C. M., B. Prajapati, S. Lucas-Staat, T. Sime-Ngando, P. Forterre, D. H. Bamford, D. Prangishvili, M. Krupovic et H. M. Oksanen. Novel haloarchaeal viruses from Lake Retba infecting *Haloferax* and *Halorubrum* species. *Environmental Microbiology*, 2019, 21(6), 2129-2147. [<https://doi.org/10.1111/1462-2920.14604>]
- Montalvo-Rodriguez, R., R. H. Vreeland, A. Oren, M. Kessel, C. Betancourt et J. López-Garriga. *Halogeometricum borinquense* gen. nov., sp. nov., a novel halophilic archaeon from Puerto Rico. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1998, 48(4), 1305-1312. [<https://doi.org/10.1099/00207713-48-4-1305>]

- Montero-Lobato, Z., A. Ramos-Merchante, J. L. Fuentes, A. Sayago, Á. Fernández-Recamales, R. M. Martínez-Espinosa, J. M. Vega, C. Vílchez et I. Garbayo. Optimization of growth and carotenoid production by *Haloferax mediterranei* using response surface methodology. *Marine drugs*, 2018, 16(10), 372. [<https://doi.org/10.3390/md16100372>]
- Mori, K., D. A. Nurcahyanto, H. Kawasaki, P. Lisdiyanti, Yopi et K.-I. Suzuki. *Haloarchaeobius baliensis* sp. nov., isolated from a solar saltern. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016, 66(1), 38-43. [<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000672>]
- Moshfegh, M., A. R. Shahverdi, G. Zarrini et M. A. Faramarzi. Biochemical characterization of an extracellular polyextremophilic  $\alpha$ -amylase from the halophilic archaeon *Halorubrum xinjiangense*. *Extremophiles*, 2013, 17(4), 677-687. [<https://doi.org/10.1007/s00792-013-0551-7>]
- Mueller, J. H et J. Hinton A protein-free medium for primary isolation of the *Gonococcus* and *Meningococcus*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1941, 48 (1), 330-333.
- Mukherjee, T., S. Bose et S. K. Mukhopadhyay. Antioxidant properties of the carotenoid extracts of three *Deinococcus–Thermus* phylum bacteria, *Meiothermus* sp. strains RP and TP and *Thermus* sp. strain YY from Paniphala hot spring, India. *Nutrire*, 2017, 42(1), 7. [<https://doi.org/10.1186/s41110-017-0032-3>]
- Mullakhanbhai, M. F. et H. Larsen. *Halobacterium volcanii* sp. nov., a Dead Sea *Halobacterium* with a moderate salt requirement. *Archives of microbiology*, 1975, 104(1), 207-214. [<https://doi.org/10.1007/BF00447326>]
- Mussagy, C. U., J. Winterburn, V. C. Santos-Ebinuma et J. F. B. Pereira. Production and extraction of carotenoids produced by microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(3), 1095-1114. [<https://doi.org/10.1007/s00253-018-9557-5>]
- Muthulakshmi, M., A. Saranya, M. Sudha et G. Selvakumar. Extraction, partial purification, and antibacterial activity of phycocyanin from *Spirulina* isolated from fresh water body against various human pathogens. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 2012, 3(3), 7-11.
- Myers, M. R. et G. M. King. *Halobacterium bonnevilliei* sp. nov., *Halobaculum saliterrae* sp. nov. and *Halovenus carboxidivorans* sp. nov., three novel carbon monoxide-oxidizing Halobacteria from saline crusts and soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2020. [<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004282>]
- Naghoni, A., G. Emtiazi, M. A. Amoozegar, M. S. Cretoiu, L. J. Stal, Z. Etemadifar, S. A. Shahzadeh Fazeli et H. Bolhuis. Microbial diversity in the hypersaline Lake Meyghan, Iran. *Scientific Reports*, 2017, 7(1), 115-122. [<https://doi.org/10.1038/s41598-017-11585-3>]
- Nájera-Fernández, C., B. Zafrilla, M.-J. Bonete et R. Martínez-Espinosa. Role of the denitrifying Haloarchaea in the treatment of nitrite-brines. *International Microbiology*, 2012, 15, 111-119. [<https://doi.org/10.2436/20.1501.01.164>]
- Narasingarao, P., S. Podell, J. A. Ugalde, C. Brochier-Armanet, J. B. Emerson, J. J. Brocks, K. B. Heidelberg, J. F. Banfield et E. E. Allen De novo metagenomic assembly reveals abundant novel major lineage of Archaea in hypersaline microbial communities. *The ISME Journal*, 2012, 6(1), 81-93. [<https://doi.org/10.1038/ismej.2011.78>]

- Nicol, M. et M. Maudet. Caroténoïdes et vitamine A. Actualités. Oléagineux, Corps gras, Lipides, 2000, 7(3), 266-270. [<https://doi.org/10.1051/ocl.2000.0266>]
- Nisar, N., L. Li, S. Lu, Nay c. Khin et Barry j. Pogson. Carotenoid Metabolism in Plants. Molecular Plant, 2015, 8(1), 68-82. [<https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.007>]
- Nocker, A., M. Burr et A. K. Camper. Genotypic Microbial Community Profiling: A Critical Technical Review. Microbial Ecology, 2007, 54(2), 276-289. [[10.1007/s00248-006-9199-5](https://doi.org/10.1007/s00248-006-9199-5)]
- Ochsenreiter, T., F. Pfeifer et C. Schleper. Diversity of *Archaea* in hypersaline environments characterized by molecular-phylogenetic and cultivation studies. Extremophiles, 2002, 6(4), 267-274. [<https://doi.org/10.1007/s00792-001-0253-4>]
- Oh, D., K. Porter, B. Russ, D. Burns et M. Dyll-Smith. Diversity of *Haloquadratum* and other haloarchaea in three, geographically distant, Australian saltern crystallizer ponds. Extremophiles, 2010, 14(2), 161-169. [<https://doi.org/10.1007/s00792-009-0295-6>]
- Oren, A., A. Ventosa et W. D. Grant. Proposed Minimal Standards for Description of new taxa in the order *Halobacteriales*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1997, 47(1), 233-238. [<https://doi.org/10.1099/00207713-47-1-233>]
- Oren, A. Bioenergetic aspects of halophilism. Microbiology and molecular biology reviews : MMBR, 1999, 63(2), 334-348. [<https://doi.org/10.1128/membr.63.2.334-348.1999>]
- Oren, A. et C. D. Litchfield. A procedure for the enrichment and isolation of *Halobacterium*. FEMS Microbiology Letters, 1999, 173(2), 353-358. [<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13525.x>]
- Oren, A. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2002a, 28(1), 56-63. [<https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000176>]
- Oren, A. Halophilic microorganisms and their environments. Edition ed. : Springer Science & Business Media, 2002b, ISBN 0306480530.
- Oren, A. Convergent Evolution in extremely halophilic prokaryotes: a comparison between *Salinibacter ruber* (*Bacteria*) and the *Halobacteriaceae* (*Archaea*). In S.P. Wasser ed. *Evolutionary Theory and Processes: Modern Horizons: Papers in Honour of Eviatar Nevo*. Dordrecht : Springer Netherlands, 2004, p. 43-64. [[https://doi.org/10.1007/978-94-017-0443-4\\_4](https://doi.org/10.1007/978-94-017-0443-4_4)]
- Oren, A. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. Saline systems, 2008, 4(1), 2. [<https://doi.org/10.1186/1746-1448-4-2>]
- Oren, A. The dying Dead Sea: The microbiology of an increasingly extreme environment. Lakes & Reservoirs: Research & Management, 2010a, 15(3), 215-222. [<https://doi.org/10.1111/j.1440-1770.2010.00435.x>]
- Oren, A. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. Environmental Technology, 2010b, 31(8-9), 825-834. [<https://doi.org/10.1080/09593330903370026>]

## Références bibliographiques

---

- Oren, A. Diversity of Halophiles. In K. Horikoshi ed. *Extremophiles Handbook*. Tokyo : Springer Japan, 2011a, p. 309-325. [[https://doi.org/10.1007/978-4-431-53898-1\\_14](https://doi.org/10.1007/978-4-431-53898-1_14)]
- Oren, A. Ecology of Halophiles. In K. Horikoshi ed. *Extremophiles Handbook*. Tokyo : Springer Japan, 2011b, p. 343-361. [[https://doi.org/10.1007/978-4-431-53898-1\\_16](https://doi.org/10.1007/978-4-431-53898-1_16)]
- Oren, A. Strategies for the isolation and cultivation of halophilic microorganisms. *Extremophiles*, 2012, 75-94. [<https://doi.org/10.1002/9781118394144.ch3>]
- Oren, A. Life at High Salt Concentrations. In E. Rosenberg, E.F. Delong, S. Lory, E. Stackebrandt et F. Thompson eds. *The Prokaryotes: Prokaryotic Communities and Ecophysiology*. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2013a, p. 421-440. [[https://doi.org/10.1007/978-3-642-30123-0\\_57](https://doi.org/10.1007/978-3-642-30123-0_57)]
- Oren, A. *Salinibacter*: an extremely halophilic bacterium with archaeal properties. *FEMS Microbiology Letters*, 2013b, 342(1), 1-9. [<https://doi.org/10.1111/1574-6968.12094>]
- Oren, A. Life at high salt concentrations, intracellular KCl concentrations, and acidic proteomes. *Frontiers in Microbiology*, 2013c, 4(315). [<https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00315>]
- Oren, A. Taxonomy of halophilic *Archaea*: current status and future challenges. *Extremophiles*, 2014a, 18(5), 825-834. [<https://doi.org/10.1007/s00792-014-0654-9>]
- Oren, A. The family *Halobacteriaceae*. *The Prokaryotes*, 2014b, 41-121. [[https://doi.org/10.1007/978-3-642-38954-2\\_313](https://doi.org/10.1007/978-3-642-38954-2_313)]
- Oren, A. Life in Hypersaline Environments. In C.J. Hurst ed. *Their World: A Diversity of Microbial Environments*. Cham : Springer International Publishing, 2016, p. 301-339. [[https://doi.org/10.1007/978-3-319-28071-4\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-28071-4_8)]
- Oren, A., A. Ventosa et M. Kamekura. *Halobacteria*. In W. B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. DeVos, B. Hedlund et S. Dedysh eds. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. : John Wiley & Sons, Ltd, 2017, p. 1-5. [<https://doi.org/10.1002/9781118960608.cbm00026.pub2>]
- Oren, A. *Halorubrum*. In M.E. Trujillo, S. Dedysh, P. DeVos, B. Hedlund, P. Kämpfer, F.A. Rainey et W.B. Whitman eds. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. : John Wiley & Sons, Ltd, 2018, p. 1-48. [<https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00487.pub2>]
- Oren, A. et R. Montalvo Rodríguez. *Halogeometricum*. In M.E. Trujillo, S. Dedysh, P. DeVos, B. Hedlund, P. Kämpfer, F.A. Rainey and W.B. Whitman eds. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. : John Wiley & Sons, Ltd, 2018, p. 1-9. [<https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00486.pub2>]
- Oren, A., J. Hirschberg, V. Mann et J. Jehlička. Effects of nicotine on the biosynthesis of carotenoids in halophilic *Archaea* (class *Halobacteria*): an HPLC and Raman spectroscopy study. *Extremophiles*, 2018, 22(3), 359-366. [<https://doi.org/10.1007/s00792-018-0995-x>]
- Oren, A. Chapter 3 - Solar salterns as model systems for the study of halophilic microorganisms in their natural environments. In J. Seckbach et P. Rampelotto eds. *Model*

*Ecosystems in Extreme Environments.* : Academic Press, 2019, p. 41-56. [<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812742-1.00003-9>]

Oren, A. et A. Ventosa. International Committee on Systematics of Prokaryotes subcommittee on the taxonomy of *Halobacteria* and subcommittee on the taxonomy of *Halomonadaceae*. Minutes of the joint open meeting, 26 June 2019, Cluj-Napoca, Romania. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2019, 69(11), 3657-3661. [<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003737>]

Ozcan, B., C. Cokmus, A. Coleri et M. Caliskan. Characterization of extremely halophilic Archaea isolated from saline environment in different parts of Turkey. Microbiology, 2006, 75(6), 739-746. [<https://doi.org/10.1134/s002626170606018x>]

Ozcan, B., G. Ozcengiz, A. Coleri et C. Cokmus. Diversity of halophilic Archaea from six hypersaline environments in Turkey. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, 17(5), 745-752.

Ozcan, B., G. Ozyilmaz, A. Cihan, C. Cokmus et M. Caliskan. Phylogenetic analysis and characterization of lipolytic activity of halophilic archaeal isolates. Microbiology, 2012, 81(2), 186-194. [<https://doi.org/10.1134/s0026261712020105>]

Parseh, H., S. Hassanpour, Z. Emam-Djome et A. S. Lavasani. Antimicrobial properties of Pomegranate (*Punica granatum*) as a Tannin rich Fruit. In *National Congress on Recycling of Organic Waste in Agriculture.* : , 2012, p. 86-92.

Pašić, L., S. G. Bartual, N. P. Ulrih, M. Grabnar et B. H. Velikonja. Diversity of halophilic archaea in the crystallizers of an Adriatic solar saltern. FEMS Microbiology Ecology, 2005, 54(3), 491-498. [<https://doi.org/10.1016/j.femsec.2005.06.004>]

Pathak, A. P. et A. G. Sardar. Isolation and characterization of carotenoid producing Haloarchaea from solar saltern of Mulund, Mumbai, India. Indian Journal of Natural Products and Resources, 2012, 3(4), 483,488.

Peck, R. F., C. Echavarri-Erasun, E. A. Johnson, W. V. Ng, S. P. Kennedy, L. Hood, S. Dassarma et M. P. Krebs. brp and blh are required for synthesis of the retinal cofactor of bacteriorhodopsin in *Halobacterium salinarum*. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(8), 5739-5744. [<https://doi.org/10.1074/jbc.m009492200>]

Pérez-Pomares, F., V. Bautista, J. Ferrer, C. Pire, F. C. Marhuenda-Egea et M. J. Bonete.  $\alpha$ -Amylase activity from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*. Extremophiles, 2003, 7(4), 299-306. [<https://doi.org/10.1007/s00792-003-0327-6>]

Poli, A., I. Finore, I. Romano, A. Gioiello, L. Lama et B. Nicolaus. Microbial diversity in extreme marine habitats and their biomolecules. Microorganisms, 2017, 5(2), 25. [<https://doi.org/10.3390/microorganisms5020025>]

Quadri, I., I. I. Hassani, S. L'haridon, M. Chalopin, H. Hacène et M. Jebbar. Characterization and antimicrobial potential of extremely halophilic archaea isolated from hypersaline environments of the Algerian Sahara. Microbiological Research, 2016, 186-187, 119-131. [<https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.04.003>]

- Raddadi, N., A. Cherif, D. Daffonchio, M. Neifar et F. Fava. Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(19), 7907-7913. [<https://doi.org/10.1007/s00253-015-6874-9>]
- Rampelotto, P. H. *Biotechnology of extremophiles*. Edition ed. : Springer, 2016. ISBN 331913521X.
- Rampelotto, P. H. Extremophiles and extreme environments. *Life*, 2013, 3(3), 482-485. [<https://doi.org/10.3390/life3030482>]
- Rao, L., X. Zhao, F. Pan, Y. Li, Y. Xue, Y. Ma et J. R. Lu. Solution behavior and activity of a halophilic esterase under high salt concentration. *PloS one*, 2009, 4(9), 6980. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006980>]
- Rasooli, M., M. A. Amoozegar, A. Akhavan Sepahy, H. Babavalian et H. Tebyanian. Isolation, identification and extracellular enzymatic activity of culturable extremely halophilic archaea and bacteria of IncheBoroun Wetland. *International Letters of Natural Sciences*, 2016, 56, 40-51. [<https://doi.org/10.18052/www.scipress.com/ilns.56.40>]
- Ravikumar, S., G. Uma et R. Gokulakrishnan. Antibacterial property of halobacterial carotenoids against human bacterial pathogens. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 2016, 75, 253-257.
- Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang et C. Rice-Evans. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, 26(9), 1231-1237. [[https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)]
- Rinke, C., P. Schwientek, A. Sczyrba, N.N. Ivanova, I.J. Anderson, J.F. Cheng, A. Darling, S. Malfatti, B.K. Swan, E.A. Gies, J.A. Dodsworth, B.P. Hedlund, G.Tsiamis, S.M.Sievert, W.T. Liu, J.A.Eisen, S.J. Hallam, N.C. Kyrpides, R. Stepanauskas, E.M. Rubin, P. Hugenholtz, T.Woyke. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature*, 2013, 499, 431-437. [<https://doi.org/10.1038/nature12352>]
- Rodrigo-Baños, M., I. Garbayo, C. Vílchez, M. J. Bonete et R. M. Martínez-Espinosa. Carotenoids from haloarchaea and their potential in biotechnology. *Marine drugs*, 2015, 13(9), 5508-5532. [<https://doi.org/10.3390/md13095508>]
- Rodriguez-Amaya, D. B. Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids—A review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2010, 23(7), 726-740. [<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.03.008>]
- Rodriguez-Valera, F. Characteristics and microbial ecology of hypersaline environments. *Halophilic bacteria*, 1988, 1, 3-30.
- Ronnekleiv, M., S. Liaaen-Jensen. Bacterial carotenoids 53\* C50-carotenoids 23; carotenoids of *Haloferax volcanii* versus other halophilic bacteria. *Biochemical Systematics and Ecology*, 1995, 23(6), 627-634. [[https://doi.org/10.1016/0305-1978\(95\)00047-x](https://doi.org/10.1016/0305-1978(95)00047-x)]
- Rose, D. et H. Tessier. Effect of various salts on the coagulation of casein. *Journal of Dairy Science*, 1959, 42(6), 989-997. [[https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(59\)90682-4](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(59)90682-4)]

- Rosselló-Mora, R., N. Lee, J. Antón et M. Wagner. Substrate uptake in extremely halophilic microbial communities revealed by microautoradiography and fluorescence in situ hybridization. *Extremophiles*, 2003, 7(5), 409-413. [<https://doi.org/10.1007/s00792-003-0336-5>]
- Rostami, H., H. Hamed et M. Yolmeh. Some biological activities of pigments extracted from *Micrococcus roseus* (PTCC 1411) and *Rhodotorula glutinis* (PTCC 5257). *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 2016, 29(4), 684-695. [<https://doi.org/10.1177/0394632016673846>]
- Sabet, S., L. Diallo, L. Hays, W. Jung et J. G. Dillon. Characterization of halophiles isolated from solar salterns in Baja California, Mexico. *Extremophiles*, 2009, 13(4), 643-656. [<https://doi.org/10.1007/s00792-009-0247-1>]
- Salari, Z., M. J. Kazemi et M. S. Shirsalimian. Isolation and molecular identification of halophilic microorganisms from around Saghand uranium mine, Saghand desert, Iran. *Geomicrobiology Journal*, 2020, 37(1), 40-49. [<https://doi.org/10.1080/01490451.2019.1662522>]
- Samraoui, B. et F. Samraoui. An ornithological survey of Algerian wetlands: Important bird areas, Ramsar sites and threatened species. *Wildfowl*, 2013, 58(58), 71-96.
- Sandmann, G. Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2001, 385(1), 4-12. [<https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2170>]
- Sanger, F., S. Nicklen et A. R. Coulson. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1977, 74(12), 5463- 5467. [<https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>]
- Santos, U. P., J. F. Campos, H. F. V. Torquato, E. J. Paredes-Gamero, C. A. Carollo, L. M. Estevinho, K. De Picoli Souza et E. L. Dos Santos. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties as well as the phenolic content of the extract from *Hancornia speciosa* Gomes. *PLoS One*, 2016, 11(12), e0167531. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167531>]
- Schiraldi, C. et M. De Rosa. Halophiles. In E. Drioli et L. Giorno eds. *Encyclopedia of Membranes*. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2016, p. 1-2. [[https://doi.org/10.1007/978-3-662-44324-8\\_1608](https://doi.org/10.1007/978-3-662-44324-8_1608)]
- Schröder, C., C. Burkhardt et G. Antranikian. What we learn from extremophiles. *ChemTexts*, 2020, 6(1), 8. [<https://doi.org/10.1007/s40828-020-0103-6>]
- Seckbach, J. et P. Rampelotto. Polyextremophiles. In C. Bakermans (ed). *Microbial Evolution under Extreme Conditions*. : Walter de Gruyter GmbH & Co KG , 2015, p. 153-170. [<https://doi.org/10.1515/9783110340716-010>]
- Shivanand, P. et G. Mugeraya. Halophilic bacteria and their compatible solutes – osmoregulation and potential applications. *Current Science*, 2011, 100(10), 1516-1521.
- Silva-Castro, G. A., A. C. Moyo, L. Khumalo, L. J. Van Zyl, L. F. Petrik et M. Trindade. Factors influencing pigment production by halophilic bacteria and its effect on brine evaporation rates. *Microbial biotechnology*, 2019, 12(2), 334-345. [<https://doi.org/10.1111/1751-7915.13319>]

- Silva, T. R., R. S. N. Tavares, R. Canela-Garayoa, J. Eras, M. V. N. Rodrigues, I. A. Neri-Numa, G. M. Pastore, L. H. Rosa, J. a. A. Schultz, H. M. Deboni, L. R. G. Cordeiro et V. M. Oliveira. Chemical characterization and biotechnological applicability of pigments isolated from antarctic bacteria. *Marine Biotechnology*, 2019, 21(3), 416-429. [<https://doi.org/10.1007/s10126-019-09892-z>]
- Singh, A. et A. K. Singh. Haloarchaea: worth exploring for their biotechnological potential. *Biotechnology Letters*, 2017, 39(12), 1793-1800. [<https://doi.org/10.1007/s10529-017-2434-y>]
- Singh, P., K. Jain, C. Desai, O. Tiwari et D. Madamwar. Chapter 18 - Microbial community dynamics of extremophiles/extreme environment. In S. Das et H.R. Dash eds. *Microbial Diversity in the Genomic Era*. : Academic Press, 2019, p. 323-332. [<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814849-5.00018-6>]
- Sneath, P. H. A., & Sokal, R. R. (1973). Unweighted pair group method with arithmetic mean. *Numerical Taxonomy*, 230-234.
- Sokal, R. R. A statistical method for evaluating systematic relationship. *University of Kansas science bulletin*, 1958, 28, 1409-1438.
- Sorokin, D. Y., T. Tourova, E. Galinski, C. Belloch et B. Tindall. Extremely halophilic denitrifying bacteria from hypersaline inland lakes, *Halovibrio denitrificans* sp. nov. and *Halospina denitrificans* gen. nov., sp. nov., and evidence that the genus name *Halovibrio* Fendrich 1989 with the type species *Halovibrio variabilis* should be associated with DSM 3050. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56(2), 379-388. [<https://doi.org/10.1099/ijs.0.63964-0>]
- Squillaci, G., R. Finamore, P. Diana, O. F. Restaino, C. Schiraldi, S. Arbucci, E. Ionata, F. La Cara et A. Morana. Production and properties of an exopolysaccharide synthesized by the extreme halophilic archaeon *Haloterrigena turkmenica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(2), 613-623. [<https://doi.org/10.1007/s00253-015-6991-5>]
- Squillaci, G., R. Parrella, V. Carbone, P. Minasi, F. La Cara et A. Morana. Carotenoids from the extreme halophilic archaeon *Haloterrigena turkmenica*: identification and antioxidant activity. *Extremophiles*, 2017, 21(5), 933-945. [<https://doi.org/10.1007/s00792-017-0954-y>]
- Sreedevi, R. et B. V. Pradeep. In vitro cytotoxicity and antioxidant activity of a crude pigment from *aspergillus terreus*. *Asian journal of microbiology biotechnology & environmental sciences : AJMBES*, 2017, 19(3), 693-698.
- Srivastava, P., J. Braganca, S. R. Ramanan et M. Kowshik. Green synthesis of silver nanoparticles by haloarchaeon *Halococcus salifodinae* BK6. *Advanced Materials Research*, 2014, 938, 236-241. [<https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/amr.938.236>]
- Srivastava, P. et M. Kowshik. Biosynthesis of nanoparticles from halophiles. In D.K. Maheshwari et M. Saraf eds. *Halophiles: Biodiversity and Sustainable Exploitation*. Cham : Springer International Publishing, 2015, p. 145-159. [[https://doi.org/10.1007/978-3-319-14595-2\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-14595-2_4)]

- Stan-Lotter, H. et S. Fendrihan. Halophilic *Archaea*: Life with Desiccation, Radiation and Oligotrophy over Geological Times. *Life*, 2015, 5(3), 1487-1496. [<https://doi.org/10.3390/life5031487>]
- Strati, I. F. et V. Oreopoulou Recovery of carotenoids from tomato processing by-products – a review. *Food Research International*, 2014, 65, 311-321. [<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.09.032>]
- Sui, L., L. Liu et Y. Deng. Characterization of halophilic C 50 carotenoid-producing archaea isolated from solar saltworks in Bohai Bay, China. *Chinese journal of oceanology and limnology*, 2014, 32(6), 1280-1287. [<https://doi.org/10.1007/s00343-015-4033-x>]
- Suresh, M., B. Renugadevi, S. Brammavidhya, P. Iyapparaj et P. Anantharaman Antibacterial activity of red pigment produced by *Halolactibacillus alkaliphilus* MSR1—an Isolate from Seaweed. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 176(1), 185-195. [<https://doi.org/10.1007/s12010-015-1566-6>]
- Syutkin, A. S., M. G. Pyatibratov et O. V. Fedorov. Flagella of halophilic archaea: Differences in supramolecular organization. *Biochemistry (Moscow)*, 2014, 79(13), 1470-1482. [<https://doi.org/10.1134/s0006297914130033>]
- Tamura, K., M. Nei et S. Kumar. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(30), 11030-11035. [<https://doi.org/10.1073/pnas.0404206101>]
- Tapilatu, Y. H., V. Grossi, M. Acquaviva, C. Militon, J.-C. Bertrand et P. Cuny. Isolation of hydrocarbon-degrading extremely halophilic archaea from an uncontaminated hypersaline pond (Camargue, France). *Extremophiles*, 2010, 14(2), 225-231. [<https://doi.org/10.1007/s00792-010-0301-z>]
- Tapingkae, W., S. Tanasupawat, K. L. Parkin, S. Benjakul et W. Visessanguan. Degradation of histamine by extremely halophilic archaea isolated from high salt-fermented fishery products. *Enzyme and Microbial Technology*, 2010, 46(2), 92-99. [<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.10.011>]
- Tenchov, B., E. M. Vescio, G. D. Sprott, M. L. Zeidel et J. C. Mathai. Salt tolerance of archaeal extremely halophilic lipid membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(15), 10016-10023. [<https://doi.org/10.1074/jbc.m600369200>]
- Thaipong, K., U. Boonprakob, K. Crosby, L. Cisneros-Zevallos et D. Hawkins Byrne. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2006, 19(6), 669-675. [<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003>]
- Thombre, R. S., V. D. Shinde, R. S. Oke, S. K. Dhar et Y. S. Shouche. Biology and survival of extremely halophilic archaeon *Haloarcula marismortui* RR12 isolated from Mumbai salterns, India in response to salinity stress. *Scientific reports*, 2016, 6, 25642-25642. [<https://doi.org/10.1038/srep25642>]
- Torregrosa-Crespo, J., R. M. Martínez-Espinosa, J. Esclapez, V. Bautista, C. Pire, M. Camacho, D. J. Richardson et M. J. Bonete. Chapter Two - Anaerobic metabolism in *Haloferax* genus: denitrification as case of study. In R.K. Poole ed. *Advances in Microbial*

## Références bibliographiques

---

*Physiology*. : Academic Press, 2016, vol. 68, p. 41-85. [<https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2016.02.001> ]

Torregrosa-Crespo, J., C. Pire et R. Martínez-Espinosa. Biocompounds from haloarchaea and their uses in biotechnology. In H. Sghaier, A. Najjari et K. Ghedira eds. *Archaea: New Biocatalysts, Novel Pharmaceuticals and Various Biotechnological Applications*. BoD–Books on Demand , 2017, p. 63-82. [<https://doi.org/10.5772/intechopen.69944> ]

Torregrosa-Crespo, J., Z. Montero, J. L. Fuentes, M. Reig García-Galbis, I. Garbayo, C. Vílchez et R. M. Martínez-Espinosa. Exploring the valuable carotenoids for the large-scale production by marine microorganisms. *Marine drugs*, 2018, 16(6), 203. [<https://doi.org/10.3390/md16060203> ]

Trudel, M. V., A. T. Vincent, S. A. Attéré, M. Labbé, N. Derome, A. I. Culley et S. J. Charette. Diversity of antibiotic-resistance genes in Canadian isolates of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*: dominance of pSN254b and discovery of pAsa8. *Scientific Reports*, 2016, 6, 35617-35617. [<https://doi.org/10.1038/srep35617> ]

Van Breemen, R. B., L. Dong et N. D. Pajkovic. Atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry of carotenoids. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2012, 312, 163-172. [<https://doi.org/10.1016/j.ijms.2011.07.030> ]

Vannice, J. C., D. A. Skaff, A. Keightley, J. K. Addo, G. J. Wyckoff et H. M. Miziorko. Identification in *Haloferax volcanii* of phosphomevalonate decarboxylase and isopentenyl phosphate kinase as catalysts of the terminal enzyme reactions in an archaeal alternate mevalonate pathway. *Journal of Bacteriology*, 2014, 196(5), 1055-1063. [<https://doi.org/10.1128/jb.01230-13> ]

Ventosa, A., C. Sánchez-Porro, S. Martín et E. Mellado. Halophilic *Archaea* and *Bacteria* as a source of extracellular hydrolytic enzymes. In N. Gunde-Cimerman, A. Oren et A. Plemenitaš eds. *Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya*. Dordrecht : Springer Netherlands, 2005, p. 337-354. [[https://doi.org/10.1007/1-4020-3633-7\\_23](https://doi.org/10.1007/1-4020-3633-7_23) ]

Ventosa, A. Unusual micro-organisms from unusual habitats: hypersaline environments. In H.M. Lappin-Scott, N.A. Logan et P.C.F. Oyston eds. *Prokaryotic Diversity: Mechanisms and Significance*. Cambridge : Cambridge University Press, 2006, p. 223-254. [<https://doi.org/10.1017/cbo9780511754913.015> ]

Ventosa, A. et D. Arahal Physico-chemical characteristics of hypersaline environments and their biodiversity. *Extremophiles*, 2009, 2, 247-262.

Ventosa, A., M. C. Márquez, C. Sánchez-Porro et R. R. De La Haba. Taxonomy of halophilic *Archaea* and *Bacteria*. In R.H. Vreeland ed. *Advances in Understanding the Biology of Halophilic Microorganisms*. Dordrecht : Springer Netherlands, 2012, p. 59-80. [[https://doi.org/10.1007/978-94-007-5539-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-94-007-5539-0_3) ]

Ventosa, A., A. B. Fernández, M. J. León, C. Sánchez-Porro et F. Rodríguez-Valera. The Santa Pola saltern as a model for studying the microbiota of hypersaline environments. *Extremophiles*, 2014, 18(5), 811-824. [<https://doi.org/10.1007/s00792-014-0681-6> ]

- Ventosa, A., R. R. De La Haba, C. Sánchez-Porro et R. T. Papke. Microbial diversity of hypersaline environments: a metagenomic approach. *Current Opinion in Microbiology*, 2015, 25, 80-87. [<https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.05.002>]
- Ventosa, A et R. R. De La Haba. *Halopiger*. In M.E. Trujillo, S. Dedysh, P. DeVos, B. Hedlund, P. Kämpfer, F.A. Rainey et W.B. Whitman eds. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. : John Wiley & Sons, Ltd, 2017, p. 1-8. [<https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01346>]
- Ventosa, A., R. R. De La Haba et C. Sánchez-Porro. *Haloferax*. In M.E. Trujillo, S. Dedysh, P. DeVos, B. Hedlund, P. Kämpfer, F.A. Rainey and W.B. Whitman eds. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. : John Wiley & Sons, Ltd, 2019, p. 1-16. [<https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00485>]
- Verma, A., Y. Pal, P. Kumar et S. Krishnamurthi. *Halocatena pleomorpha* gen. nov. sp. nov., an extremely halophilic archaeon of family *Halobacteriaceae* isolated from saltpan soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2020, 70(6), 3693-3700. [<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004222>]
- Vijayaraghavan, P., T. R. J. Jebamalar et S. G. P. Vincent. Biosynthesis optimization and purification of a solvent stable alkaline serine protease from *Halobacterium* sp. *Annals of Microbiology*, 2012, 62(1), 403-410. [<https://doi.org/10.1007/s13213-011-0276-8>]
- Vila, M., I. Couso et R León. Carotenoid content in mutants of the chlorophyte *Chlamydomonas reinhardtii* with low expression levels of phytoene desaturase. *Process biochemistry*, 2012, 43(10), 1147-1152. [<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.06.014>]
- Vílchez, C., E. Forján, M. Cuaresma, F. Bédmar, I. Garbayo et J. M. Vega. Marine carotenoids: biological functions and commercial applications. *Marine drugs*, 2011, 9(3), 319-333. [<https://doi.org/10.3390/md9030319>]
- Wainø, M. et K. Ingvorsen. Production of  $\beta$ -xylanase and  $\beta$ -xylosidase by the extremely halophilic archaeon *Halorhabdus utahensis*. *Extremophiles*, 2003, 7(2), 87-93. [<https://doi.org/10.1007/s00792-002-0299-y>]
- Wang, L., Y. Wu, J. Xie, S. Wu et Z. Wu. Characterization, antioxidant and antimicrobial activities of green synthesized silver nanoparticles from *Psidium guajava* L. leaf aqueous extracts. *Materials Science and Engineering: C*, 2018, 86, 1-8. [<https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.01.003>]
- Wang, H., S. Liu, M. Zhao, J. Cao, B. Huang et Z. Niu. Research progress on the harm of illegal addition of industrial dyes in food. *Journal of Food Safety and Quality*, 2019, 10(1), 1-7.
- Warren, J. K. *Evaporites: sediments, resources and hydrocarbons*. Edition ed. : Springer Science & Business Media, 2006. ISBN 3540323449.
- Winters, Y. D., T. Lowenstein et M. Timofeeff. Identification of carotenoids in ancient salt from Death Valley, Saline Valley, and Searles Lake, California, using laser Raman spectroscopy. *Astrobiology*, 2013, 13(11), 1065-1080. [<https://doi.org/10.1089/ast.2012.0952>]

- Xu, Q., H.-L. Cui et F. Meng. *Haloprofundus halophilus* sp. nov., isolated from the saline soil of Tarim Basin. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2019, 112(4), 553-559. [<https://doi.org/10.1007/s10482-018-1186-6>]
- Xu, X., M. Wu, Y. Wu et H. Zhang. Culturable halophilic archaeal diversity of Ayakekumu salt lake located in Xinjiang, China. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(8), 3119-3123. [[https://doi.org/10.1016/s1872-2032\(07\)60066-3](https://doi.org/10.1016/s1872-2032(07)60066-3)] Yabuzaki, J. Carotenoids. Database: structures, chemical fingerprints and distribution among organisms. Database : the journal of biological databases and curation, 2017, 2017(1), bax004. [<https://doi.org/10.1093/database/bax004>]
- Yachai, M. Carotenoid production by halophilic *Archaea* and its applications. Thèse de doctorat Université Prince of Songkla Thaïlande, 2009.
- Yang, Y., H.-L. Cui, P.-J. Zhou et S.-J. Liu. *Haloarcula amylolytica* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from Aibi salt lake in Xin-Jiang, China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(1), 103-106. [<https://doi.org/10.1099/ijs.0.64647-0>]
- Yang, Y., R. Yatsunami, A. Ando, N. Miyoko, T. Fukui, S. Takaichi et S. Nakamura. Complete biosynthetic pathway of the C50 carotenoid bacterioruberin from lycopene in the extremely halophilic archaeon *Haloarcula japonica*. *Journal of bacteriology*, 2015, 197(9), 1614-1623. [<https://doi.org/10.1128/jb.02523-14>]
- Yarza, P., P. Yilmaz, E. Pruesse, F. O. Glöckner, W. Ludwig, K.-H. Schleifer, W. B. Whitman, J. Euzéby, R. Amann et R. Rosselló-Móra. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12(9), 635-645. [<https://doi.org/10.1038/nrmicro3330>]
- Yatsunami, R., A. Ando, Y. Yang, S. Takaichi, M. Kohno, Y. Matsumura, H. Ikeda, T. Fukui, K. Nakasone et N. Fujita. Identification of carotenoids from the extremely halophilic archaeon *Haloarcula japonica*. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5, 100. [<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00100>]
- Yildiz, E., B. Ozcan et M. Caliskan. Isolation, characterization and phylogenetic analysis of halophilic archaea from a salt mine in central Anatolia (Turkey). *Polish Journal of Microbiology*, 2012, 61(2), 111-117. [<https://doi.org/10.33073/pjm-2012-014>]
- Yin, J., J.-C. Chen, Q. Wu et G.-Q. Chen. Halophiles, coming stars for industrial biotechnology. *Biotechnology Advances*, 2015, 33(7), 1433-1442. [<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.008>]
- Yoon, S.-H., S.-M. Ha, S. Kwon, J. Lim, Y. Kim, H. Seo et J. Chun. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, 67(5), 1613-1617. [<https://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>]
- Young, A. J. et G. L. Lowe. Carotenoids-Antioxidant properties. *Antioxidants*, 2018, 7(2), 28. [<https://doi.org/10.3390/antiox7020028>]
- Zafrilla, B., R. M. Martínez-Espinosa, M. A. Alonso et M. J. Bonete Biodiversity of Archaea and floral of two inland saltern ecosystems in the Alto Vinalopó Valley, Spain. *Saline systems*, 2010, 6(1), 10. [<https://doi.org/10.1186/1746-1448-6-10>]

Zaghdoudi, K. Optimisation de l'extraction des caroténoïdes à partir du persimmon (*Diospyros kaki* L.), de l'abricot (*Prunus armeniaca* L.) et de la pêche (*Prunus persica* L.): étude photophysique en vue d'une application en thérapie photodynamique (PDT). Thèse de doctorat Université de Lorraine, 2015.

Zhao, Y.-J., C.-Q. Tao, C.-L. Zeng, L. Zhu et H.-L. Cui. *Salinigranum halophilum* sp. nov., isolated from marine solar salterns. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2020, 70(3), 1648-1655. [<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003951>]

Zhang, W.-Y., Y. Meng, X.-F. Zhu et M. Wu. *Halopiger salifodinae* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a salt mine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, 63(Pt\_10), 3563-3567. [<https://doi.org/10.1099/ijms.0.050971-0>]

Zittle, C. A., E. S. Della Monica et J. H. Custer. Effect of certain salts on precipitation of casein by calcium chloride and heat. *Journal of Dairy Science*, 1957, 40(3), 280-288. [[https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(57\)94475-2](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(57)94475-2)]

Zviagintseva, I., L. Gerasimenko, N. Kostrikina, E. Bulygina et G. Zavarzin. Interaction of halobacteria and cyanobacteria in a halophilic cyanobacterial community. *Mikrobiologiya*, 1995,64(2),252-258.

# **ANNEXES**

# **ANNEXE 1.**

## **Matériel et Méthodes**

**A. Composition des réactifs et des milieux de culture utilisés durant l'expérimentation (Mueller et Hinton, 1941 ; Harley et Prescott, 2002).**

**Réactifs de la coloration de Gram**

- Solution d'acide acétique à 2 % (v/v) : 2 mL d'acide acétique ajoutés à 100 mL d'eau distillée ;
- Solution de violet de gentiane : 1 g de violet de gentiane ; 10 mL d'alcool éthylique à 95 % (v/v) ; 2 g de phénol ajoutés à 100 mL d'eau distillée ;
- Solution de lugol de Gram : 1 g d'iodure de potassium ; 1 g d'iode ajoutés à 300 mL d'eau distillée ;
- Solution de fuschine de Ziehl : 1 g de Fuschine ; 10 mL d'alcool éthylique à 95 % (v/v) ; 5 g de phénol ajoutés à 100 mL d'eau distillée.

**Mode opératoire de la coloration de Gram (1844) modifiée par Dussault (1955)**

- réaliser un frottis à partir d'une culture de 24 heures ;
- recouvrir d'une solution d'acide acétique à 2 % (v/v) et laisser agir pendant 5 minutes ;
- rincer brièvement à l'eau distillée puis recouvrir d'une solution de violet de gentiane et laisser agir durant 1 minute ;
- fixer la coloration au lugol pendant 30 secondes ;
- décolorer par l'éthanol ;
- contre-colorer par une solution de fuschine de ziehl pendant 1 minute ;
- rincer à l'eau distillée, sécher et observer à l'immersion (1000 ×).

**Réactif de Kovacs**

150 mL de N-amyl/isoamyl alcool ; 50 mL d'acide hydrochlorique concentré et 10 g de pdiméthylaminobenzaldéhyde.

**Réactif de Griess**

- solution 1 : 0,8 g d'acide sulfanilique ; 30 mL d'acide acétique ajoutés à 100 mL d'eau distillée ;
- solution 2 : 0,5 g d' $\alpha$ -naphtylamine ; 30 mL d'acide acétique ajoutés à 100 mL d'eau distillée.

**Réactif de Frazier**

15 g d' $\text{HgCl}_2$ , 20 mL d' $\text{HCl}$  concentré, compléter à 100 mL avec de l'eau distillée.

**Milieu Mueller Hinton**

- Peptone 17,5 g
- Extraits de viande 2 g
- Amidon 1,5 g
- Agar 17 g
- Eau distillée, compléter jusqu'à 1000 mL

**Milieu Marine agar**

- Peptone 5 g
- Extraits de levure 1 g
- Fe(III) citrate 0,10 g
- NaCl 19,45 g
- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,16 g
- NaSO<sub>4</sub> 3,24 g
- CaCl<sub>2</sub> 1,80 g
- MgCl<sub>2</sub> 8,80 g
- KCl 0,55 g
- KBr 0,08 g
- SrCl<sub>2</sub> 0,034 g
- H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,022 g
- Na-silicate 0,004 g
- NaF 0,0024 g
- (NH<sub>4</sub>)NO<sub>3</sub> 0,0016 g
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,008 g
- Agar 15 g
- Eau distillée, compléter jusqu'à 1000 mL

**B. Caractéristiques des souches bactériennes testées dans l'évaluation du pouvoir antibactérien des extraits caroténoïdiques étudiés.**

Caractéristiques Souches	Source d'isolement	Gram	Pathogénicité	Niveau de biosécurité
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Échantillon clinique	Négatif	Homme	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	Urines d'un patient hospitalisé (Richmond, États-Unis)	Négatif	Homme	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Hémoculture	Négatif	Homme	2
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	Échantillon clinique (Kansas, États-Unis)	Positif	Homme	2
<i>Photobacterium damsela</i> CECT 626	Ulcère cutané chez le poisson <i>Chromis punctipinnis</i> (California, États-Unis)	Négatif	Poissons, homme	1
<i>Vibrio anguillarum</i> CECT 522	Lésion ulcéreuse chez la morue de l'Atlantique : <i>Gadus morhua</i> (Norvège)	Négatif	Poissons	2
<i>Aeromonas salmonicida</i> CECT 894	Furoncle chez le saumon atlantique : <i>Salmo salar</i>	Négatif	Poissons salmonidés	2
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i> CECT 899	Sang d'anguille d'élevage : <i>Anguilla japonica</i> (Shizuoka, Japan)	Négatif	Poissons	1

# **ANNEXE 2.**

## **Résultats**

Tableau 13. Caractérisation physiologique des souches de l'étude.

Souche	Salinité (%) (p/v)		Température (°C)		pH		Souche	Salinité (%) (p/v)		Température (°C)		pH	
	Gamme	Optimum	Gamme	Optimum	Gamme	Optimum		Gamme	Optimum	Gamme	Optimum	Gamme	Optimum
<b>Ez1</b>	20-25	20	30-45	37	6,5-8,5	7,5	<b>Ez39</b>	15-25	25	30-55	37	6,0-8,0	7,0
<b>Ez2</b>	15-25	25	30-50	40	6,0-8,0	7,0	<b>Bs1</b>	15-25	20	30-45	37	6,5-8,0	7,0
<b>Ez3</b>	15-25	20	30-45	37	6,5-8,0	7,0	<b>Bs2</b>	15-30	25	30-45	37	6,5-8,0	7,0
<b>Ez4</b>	10-25	20	30-50	40	6,0-8,0	7,0	<b>Bs3</b>	15-25	20	30-50	40	6,5-8,5	7,0
<b>Ez5</b>	10-30	25	30-55	40	6,0-8,0	7,0	<b>Bs4</b>	20-25	20	30-45	37	6,5-9,0	7,0
<b>Ez6</b>	15-30	25	30-45	37	6,5-9,0	7,0	<b>Bs5</b>	15-25	20	30-55	45	6,0-9,0	7,5
<b>Ez7</b>	15-25	20	30-45	37	6,5-8,0	7,0	<b>Bs6</b>	15-25	20	30-40	35	6,5-8,5	7,0
<b>Ez8</b>	15-25	20	30-45	37	6,5-8,0	7,0	<b>Bs7</b>	15-25	20	30-55	45	6,5-9,0	7,5
<b>Ez9</b>	15-30	25	30-45	37	5,0-8,0	7,0	<b>Bs8</b>	15-25	25	30-55	45	6,0-9,0	7,0
<b>Ez10</b>	15-30	20 et 25	30-55	40	5,0-8,0	7,0	<b>BT1</b>	15-30	25	30-55	40	6,5-8,0	7,5
<b>Ez11</b>	15-30	20	30-50	40	6,5-8,5	7,5	<b>BT2</b>	15-30	25	25-45	37	6,5-9,0	7,5
<b>Ez12</b>	20-25	20	30-45	37	6,5-8,5	7,0	<b>BT3</b>	20-30	20 et 25	30-45	37	6,5-8,5	7,0
<b>Ez13</b>	15-30	20	30-45	37	6,5-9,0	7,5	<b>BT4</b>	20-30	25	30-45	37	6,5-8,5	7,0
<b>Ez14</b>	15-25	25	30-45	37	6,0-8,0	7,0	<b>BT5</b>	20-30	25	30-45	37	6,5-8,0	7,5
<b>Ez15</b>	15-30	20	30-45	37	7,0-8,5	7,0	<b>BT6</b>	15-30	20	30-45	37	7,0-8,5	8,0
<b>Ez16</b>	15-25	20	30-45	37	6,5-8,5	7,0	<b>BT7</b>	15-25	20	30-45	37	6,0-9,0	7,5
<b>Ez17</b>	15-30	20	30-45	37	6,5-8,0	7,0	<b>BT8</b>	20-30	20 et 25	30-45	37	6,5-8,0	7,0
<b>Ez18</b>	15-30	20	30-45	37	6,0-8,5	7,5	<b>BT9</b>	15-30	25	30-55	40	6,5-8,5	7,5
<b>Ez19</b>	15-30	20 et 25	30-45	37	6,5-8,5	7,5	<b>BT10</b>	20-30	25	30-45	37	6,5-8,5	7,5
<b>Ez20</b>	15-25	20	30-45	37	6,5-8,5	7,0	<b>ME1</b>	20-30	25	30-45	37	6,0-8,5	7,0
<b>Ez21</b>	15-25	20	30-45	37	6,5-8,5	7,5	<b>ME2</b>	15-30	20	30-45	37	6,5-8,5	7,0
<b>Ez22</b>	15-30	20	30-45	37	6,5-8,0	7,0	<b>ME3</b>	15-25	20	30-50	37	5,0-9,0	7,5
<b>Ez23</b>	15-25	20	30-45	40	6,0-8,0	7,0	<b>ME4</b>	20-30	20	30-45	37	6,5-8,5	7,0
<b>Ez24</b>	15-25	20	30-45	37	6,5-8,0	7,0	<b>ME5</b>	20-30	25	30-45	37	5,0-9,0	7,5
<b>Ez25</b>	15-30	20	30-45	37	6,5-9,0	7,5	<b>ME6</b>	15-30	25	30-55	40	5,0-9,0	7,0
<b>Ez26</b>	15-30	20 et 25	30-45	37	6,0-8,0	7,0	<b>ME7</b>	20-30	20	30-45	37	7,0-9,0	7,5
<b>Ez27</b>	15-30	20	30-45	37	5,0-8,0	7,0	<b>ME8</b>	20-30	25	35-50	37	5,0-9,0	7,0
<b>Ez28</b>	15-25	20	30-50	40	5,0-7,5	6,5	<b>ME9</b>	15-25	20	30-45	37	6,5-9,0	7,5
<b>Ez29</b>	15-25	20	30-40	37	6,0-8,5	7,0	<b>ME10</b>	20-25	20	30-45	37	7,0-9,0	7,5
<b>Ez30</b>	15-30	20	30-40	35	6,5-8,0	7,0	<b>ME11</b>	15-25	20	35-50	40	5,0-8,0	7,0
<b>Ez31</b>	15-30	20	30-40	37	6,5-8,0	7,0	<b>ME12</b>	20-25	20	35-50	40	6,5-8,0	7,0
<b>Ez32</b>	15-25	20	30-40	35	6,5-8,5	7,5	<b>ME13</b>	15-30	20	25-55	40	6,0-8,0	7,0
<b>Ez33</b>	15-30	20	30-45	37	7,0-8,5	7,0	<b>ME14</b>	20-30	25	30-45	37	6,5-8,5	7,0
<b>Ez34</b>	15-25	20	30-45	37	5,0-8,0	7,0	<b>ME15</b>	20-30	20	30-50	37	5,5-9,0	7,5
<b>Ez35</b>	15-25	20	30-40	35	7,0-8,5	7,5	<b>ME16</b>	15-25	20	30-55	40	5,0-9,0	7,0
<b>Ez36</b>	15-25	20	30-45	37	6,0-8,0	7,0	<b>ME17</b>	15-30	25	35-55	40	5,0-8,0	6,5
<b>Ez37</b>	15-25	20	30-55	40	5,0-8,0	6,5	<b>ME18</b>	15-30	20	30-45	37	5,0-8,0	7,0
<b>Ez38</b>	10-30	15	30-55	45	5,5-8,0	7,0	<b>ME19</b>	20-30	20	30-45	37	6,5-8,0	7,0

Tableau 13. Caractérisation physiologique des souches de l'étude (Suite).

Souche	Salinité (%) (p/v)		Température (°C)		pH		Souche	Salinité (%) (p/v)		Température (°C)		pH	
	Gamme	Optimum	Gamme	Optimum	Gamme	Optimum		Gamme	Optimum	Gamme	Optimum	Gamme	Optimum
<b>ME20</b>	20-30	25	30-45	35	7,0-9,0	7,0	<b>AW11</b>	15-30	20	30-50	37	7,0-8,5	7,5
<b>ME21</b>	20-30	20	30-45	37	6,5-9,0	7,5	<b>AW12</b>	15-30	20	30-50	37	7,0-8,5	7,5
<b>ME22</b>	15-30	25	30-55	45	5,0-9,0	7,5	<b>AW13</b>	15-30	20	30-55	37	7,0-9,0	7,5
<b>F1</b>	15-30	20	25-50	37	5,0-9,0	7,0	<b>AW14</b>	15-30	25	25-45	37	6,0-9,0	7,0
<b>F2</b>	20-30	20	25-50	37	5,5-8,0	7,0	<b>AW15</b>	15-30	20 et 25	25-50	37	5,0-9,0	7,0
<b>F3</b>	10-30	15	30-55	45	6,0-9,0	7,5	<b>AW16</b>	20-30	20	30-50	37	6,5-9,0	7,5
<b>F4</b>	15-30	20 et 25	30-50	40	5,0-9,0	7,5	<b>AW17</b>	15-30	25	30-45	37	6,5-9,0	7,5
<b>F5</b>	10-30	15	25-55	45	5,0-9,0	7,5	<b>AW18</b>	15-30	20	30-45	37	7,0-8,5	7,5
<b>AW1</b>	15-30	25	30-45	37	7,0-9,0	7,5	<b>AW19</b>	20-30	25	30-50	37	5,5-9,0	7,0
<b>AW2</b>	15-30	25	30-45	37	7,0-9,0	7,5	<b>AW20</b>	20-30	25	30-45	37	7,0-8,5	7,5
<b>AW3</b>	20-30	25	30-45	37	5,0-9,0	7,0	<b>AW21</b>	20-30	25	30-50	37	5,5-9,0	7,0
<b>AW4</b>	15-30	25	25-45	37	7,0-9,0	7,5	<b>AW22</b>	20-30	25	30-45	37	6,5-9,0	7,5
<b>AW5</b>	20-30	25	30-50	40	7,0-9,0	7,5	<b>AW23</b>	20-30	20	30-45	37	5,5-8,5	7,0
<b>AW6</b>	20-30	25	25-45	37	7,0-8,5	7,5	<b>SB1</b>	20-30	25	30-45	37	6,5-9,0	7,5
<b>AW7</b>	20-30	20 et 25	30-50	37	6,0-9,0	7,0	<b>SB2</b>	20-30	25	30-45	37	7,0-9,0	7,0
<b>AW8</b>	20-30	25 et 25	30-50	37	6,0-9,0	7,0	<b>SB3</b>	20-30	25	30-45	37	6,5-9,0	7,5
<b>AW9</b>	15-30	25	30-50	37	5,0-9,0	7,5	<b>SB4</b>	15-30	25	30-55	37	5,0-9,0	7,0
<b>AW10</b>	15-30	25	30-45	37	5,0-9,0	7,5							

**Tableau 16.** Codification des caractères phénotypiques des souches utilisés pour la construction du phénogramme.

Caractères \ Souche	AW3	AW5	AW8	AW13	AW15	AW19	AW21	AW23	BS2	BS3	BS4	BS5	BS7	BS8	BT1	BT2	BT4	BT7	BT8	BT9	EZ2	EZ5
Aspect colonie M	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Aspect colonie L	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
Pigmentation rouge	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
Pigmentation orange	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1
Pigmentation rose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Gram négatif	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Forme cellulaire en bâtonnets	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1
Forme cellulaire en cocci	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Forme cellulaire pléomorphe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0
Mode de regroupement isolé	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Mode de regroupement en chaînette	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Croissance aérobie	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Croissance anaérobie	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Croissance à salinité% (p/v):																						
10 (p/v)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
15 (p/v)	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
20 (p/v)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
25 (p/v)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
30 (p/v)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1
Salinité % optimale de croissance :																						
15 (p/v)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20 (p/v)	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
25 (p/v)	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
Croissance à T° :																						
25 °C	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
30 °C	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
35 °C	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
37 °C	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
40 °C	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
45 °C	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
50 °C	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1
55 °C	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1
60 °C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T° optimale de croissance :																						
37 °C	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
40 °C	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
45 °C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Croissance à pH :																						
5,0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5,5	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6,0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1
6,5	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7,0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7,5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8,0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8,5	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0

L : lisse ; M : muqueux ; 1 : présence du caractère ; 0 : absence du caractère ; T° : température.

Tableau 16. Codification des caractères phénotypiques des souches utilisés pour la construction du phénogramme (suite).

Souche	AW3	AW5	AW8	AW13	AW15	AW19	AW21	AW23	BS2	BS3	BS4	BS5	BS7	BS8	BT1	BT2	BT4	BT7	BT8	BT9	EZ2	EZ5
Caractères																						
Croissance à pH :																						
9,0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0
pH optimal de croissance :																						
6,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7,0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1
7,5	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0
8,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Utilisation de :																						
D(+)-Glucose	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0
D(+)-Galactose	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0
D(+)-Fructose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1
D(+)-Lactose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
D(+)-Saccharose	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D(+)-Maltose	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D(+)-Mannose	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
Cellulose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Amidon	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
L-Arginine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Alanine	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0
L-Méthionine	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Histidine	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
L-Tyrosine	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Isoleucine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Thréonine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Glutamine	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
Citrate	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
Oxalate	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
Lactate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acétate	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0
Formiate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acide ascorbique	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mannitol	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1
Glycérol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0
Fermentation du L-arginine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Production de :																						
Catalase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Oxydase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> réductase	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0
Tryptophanase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H <sub>2</sub> S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Azote gazeux	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
Production d'acides à partir de :																						
D(+)-Glucose	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0
D(+)-Galactose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

1 : présence du caractère ; 0 : absence du caractère.

**Tableau 16.** Codification des caractères phénotypiques des souches utilisés pour la construction du phénogramme (suite).

Caractère \ Souche	AW3	AW5	AW8	AW13	AW15	AW19	AW21	AW23	BS2	BS3	BS4	BS5	BS7	BS8	BT1	BT2	BT4	BT7	BT8	BT9	EZ2	EZ5
Production d'acides à partir de :																						
D(+)-Fructose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1
D(+)-Lactose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
D(+)-Saccharose	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D(+)-Mannose	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
Mannitol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1
Glycérol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
Hydrolyse de :																						
Amidon	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gélatine	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1
Caséine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tween 80	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0
Sensibilité aux antibiotiques :																						
Pénicilline G	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Chloramphénicol	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Vancomycine	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0
Gentamycine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acide nalidixique	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Erythromycine	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Cefoxitine	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

1 : présence du caractère ; 0 : absence du caractère.

**Tableau 16.** Codification des caractères phénotypiques des souches utilisés pour la construction du phénogramme (suite).

Caractères \ Souche	EZ6	EZ37	EZ38	F1	F2	F3	F4	F5	ME1	ME3	ME6	ME11	ME13	ME15	ME16	ME17	ME21	ME22	SB1	SB3	SB4
Aspect colonie M	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Aspect colonie L	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0
Pigmentation rouge	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
Pigmentation orange	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1
Pigmentation rose	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gram négatif	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Forme cellulaire en bâtonnets	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
Forme cellulaire en cocci	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
Forme cellulaire pléomorphe	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0
Mode de regroupement isolé	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Mode de regroupement en chaînette	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Croissance aérobie	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Croissance anaérobie	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Croissance à salinité% (p/v):																					
10 (p/v)	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15 (p/v)	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1
20 (p/v)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
25 (p/v)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
30 (p/v)	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1
Salinité % optimale de croissance :																					
15 (p/v)	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20 (p/v)	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1
25 (p/v)	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0
Croissance à T° :																					
25 °C	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
30 °C	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
35 °C	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
37 °C	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
40 °C	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
45 °C	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
50 °C	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1
55 °C	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
60 °C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T° optimale de croissance :																					
37 °C	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1
40 °C	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0
45 °C	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Croissance à pH :																					
5,0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1
5,5	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1
6,0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1
6,5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7,0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7,5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8,0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

L : lisse ; M : muqueux ; 1 : présence du caractère ; 0 : absence du caractère ; T° : température.

**Tableau 16.** Codification des caractères phénotypiques des souches utilisés pour la construction du phénogramme (suite).

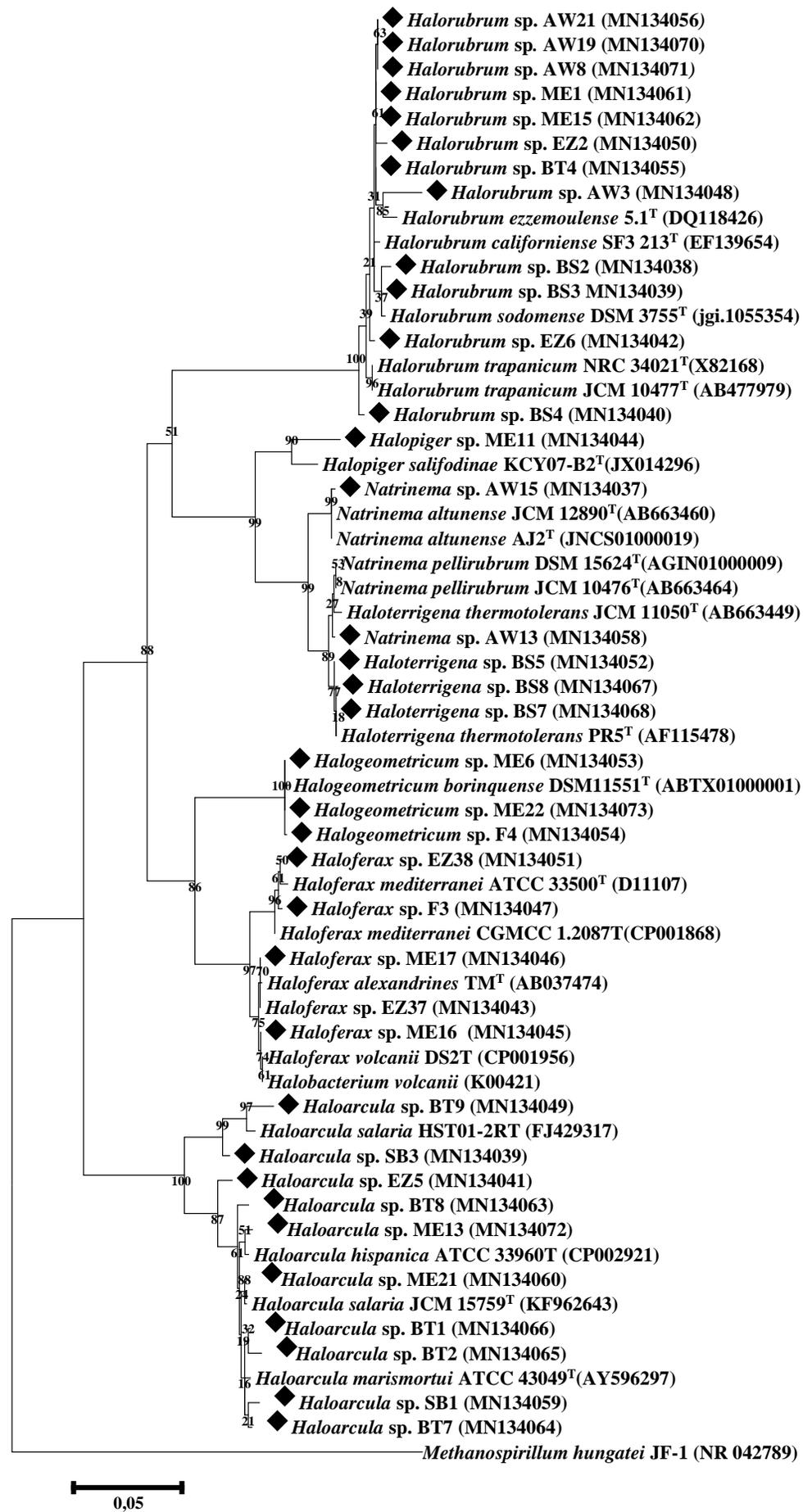
Souche	EZ6	EZ37	EZ38	F1	F2	F3	F4	F5	ME1	ME3	ME6	ME11	ME13	ME15	ME16	ME17	ME21	ME22	SB1	SB3	SB4
Caractères																					
Croissance à pH :																					
8,5	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1
9,0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1
pH optimal de croissance :																					
6,5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
7,0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1
7,5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
8,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Utilisation de :																					
D(+)-Glucose	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1
D(+)-Galactose	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0
D(+)-Fructose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
D(+)-Lactose	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
D(+)-Saccharose	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0
D(+)-Maltose	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
D(+)-Mannose	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
Cellulose	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Amidon	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
L-Arginine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Alanine	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0
L-Méthionine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Histidine	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1
L-Tyrosine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Isoleucine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Thréonine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Glutamine	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1
Citrate	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1
Oxalate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
Lactate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acétate	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0
Formiate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acide ascorbique	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mannitol	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Glycérol	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Fermentation du L-arginine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Production de :																					
Catalase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Oxydase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> réductase	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0
Tryptophanase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H <sub>2</sub> S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Azote gazeux	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0

1 : présence du caractère ; 0 : absence du caractère.

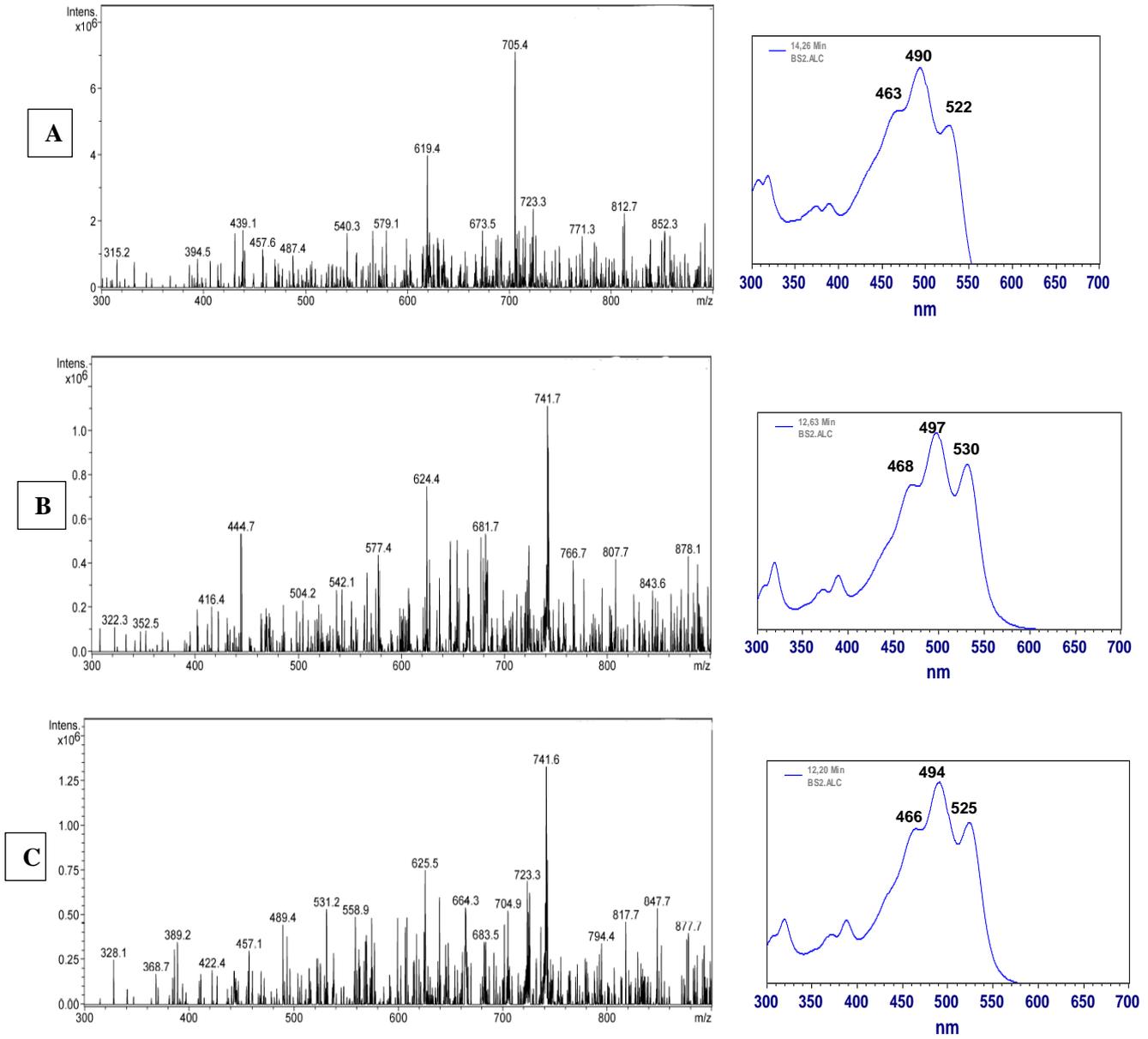
**Tableau 16.** Codification des caractères phénotypiques des souches utilisés pour la construction du phénogramme (suite).

Caractère \ Souche	EZ6	EZ37	EZ38	F1	F2	F3	F4	F5	ME1	ME3	ME6	ME11	ME13	ME15	ME16	ME17	ME21	ME22	SB1	SB3	SB4
Production d'acides à partir de :																					
D(+)-Glucose	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1
D(+)-Galactose	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0
D(+)-Fructose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
D(+)-Lactose	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
D(+)-Saccharose	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0
D(+)-Mannose	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Mannitol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
Glycérol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hydrolyse de :																					
Amidon	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0
Gélatine	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1
Caséine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tween 80	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
Sensibilité aux antibiotiques :																					
Pénicilline G	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Chloramphénicol	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Vancomycine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gentamycine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acide nalidixique	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Erythromycine	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1
Cefoxitine	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0

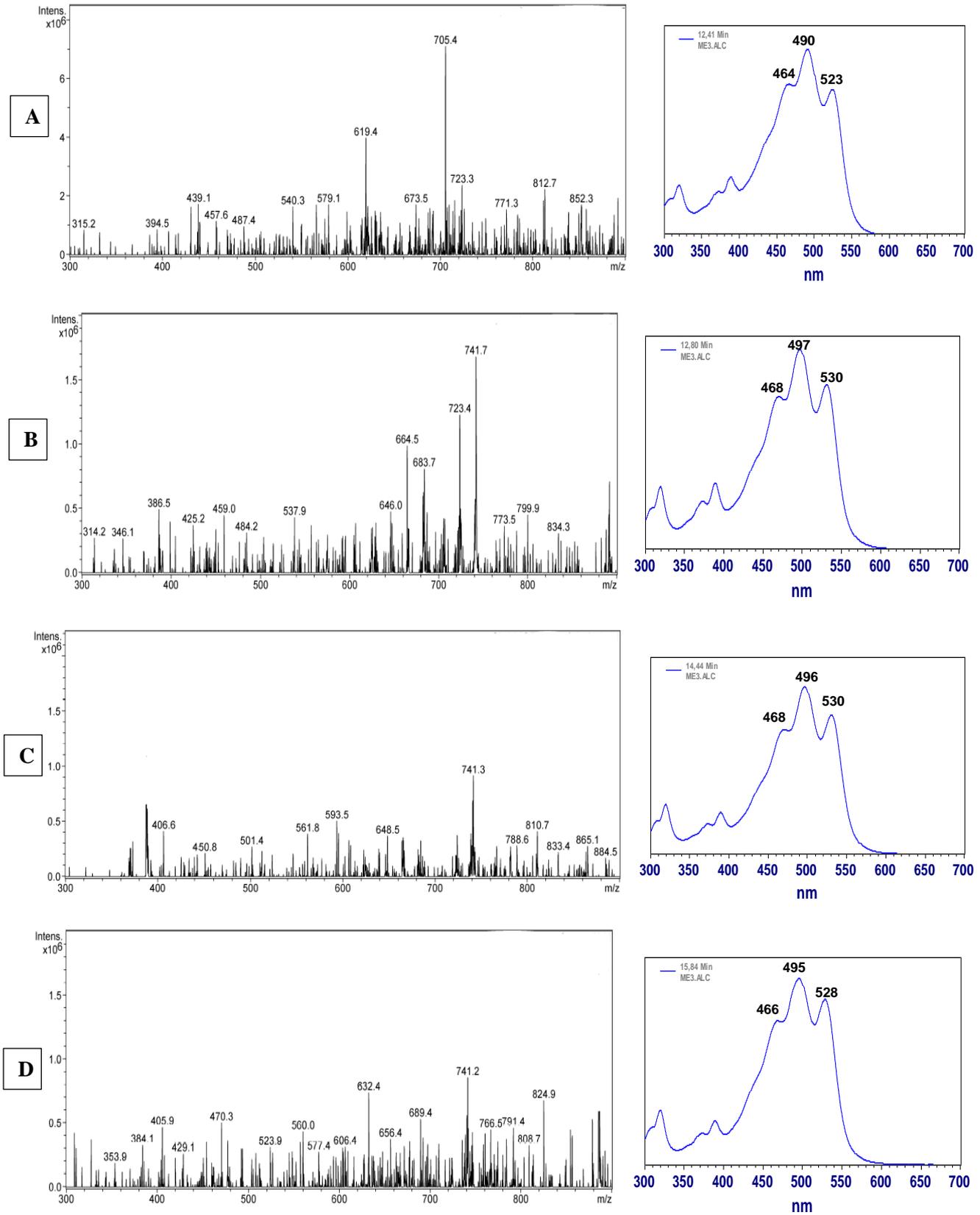
1 : présence du caractère ; 0 : absence du caractère.



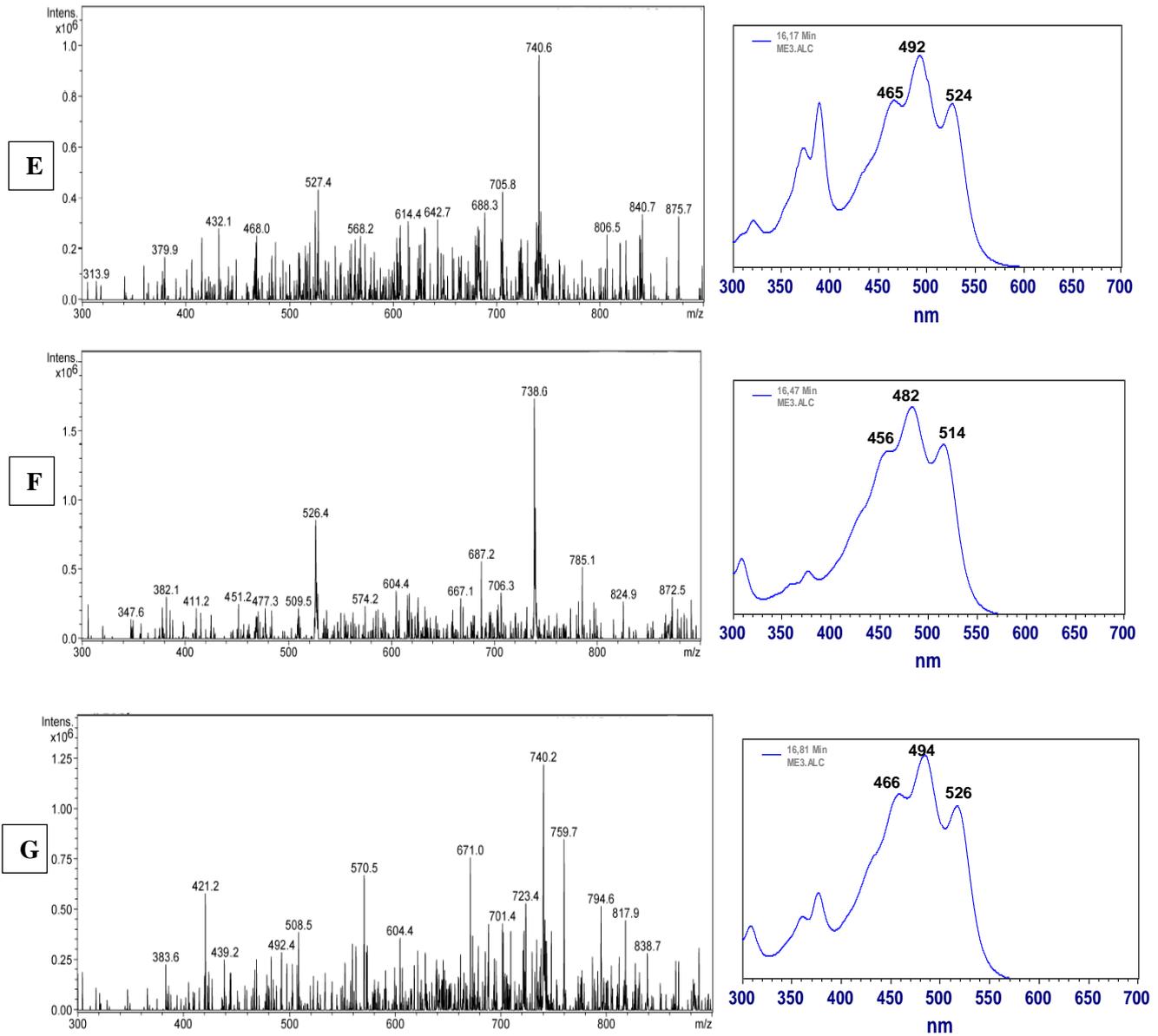
**Figure 28.** Arbre phylogénétique construit avec la méthode du maximum de vraisemblance et basé sur les séquences du gène de l'ARNr 16S des souches de l'étude (marquées par des losanges noirs) et des souches types proches. Les numéros d'accèsion des séquences sur ENA/Genbank/DDBJ sont indiqués entre parenthèses. La séquence du gène codant l'ARNr 16S de *Methanospirillum hungatei* JF-1<sup>T</sup> est utilisée comme out group.



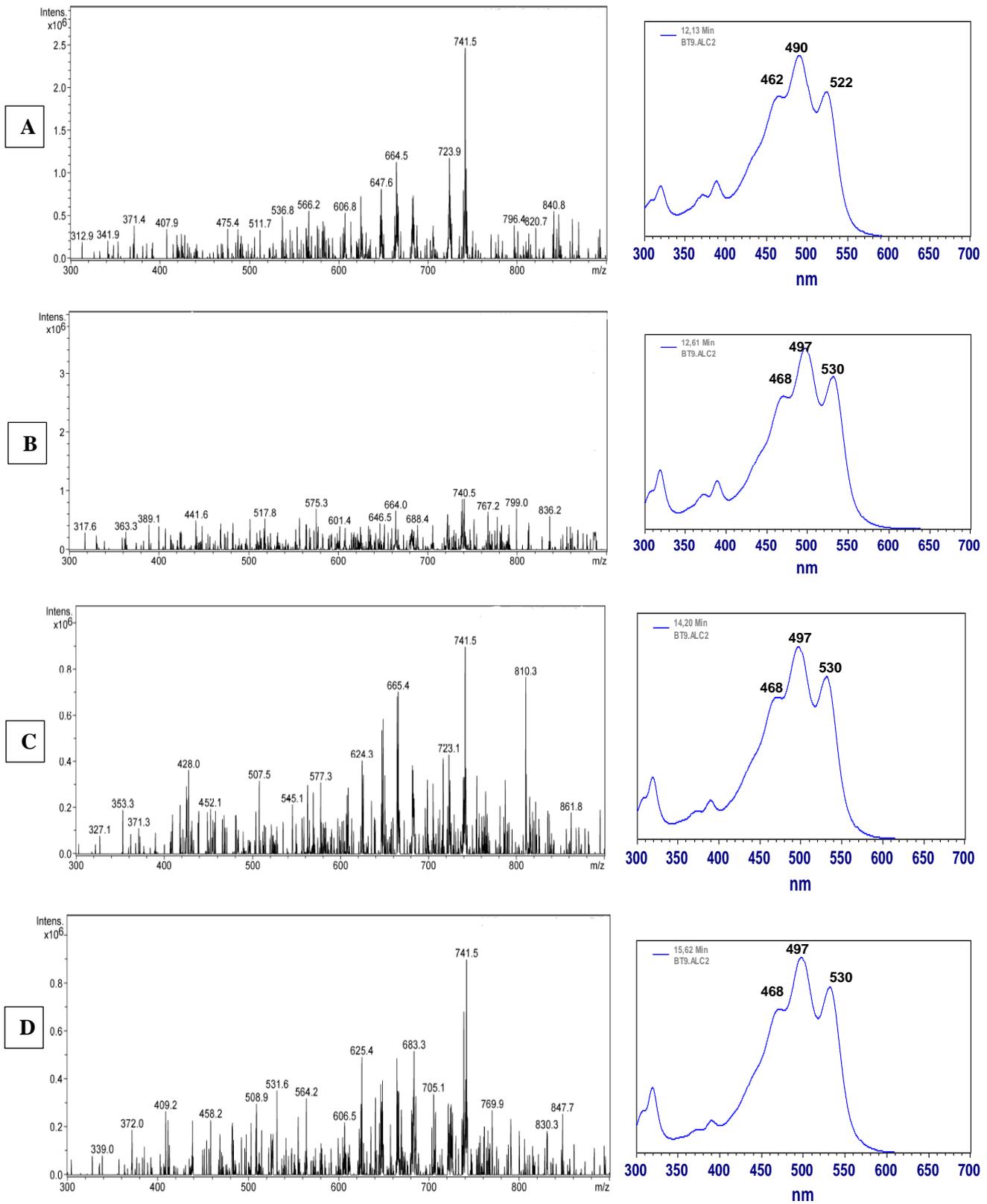
**Figure 30.** Spectres d'absorption visibles et de masse correspondant aux composants de l'extrait caroténoïdique de la souche *Halorubrum* sp. BS2. A : pic 1 ; B : pic 2 ; C : pic 3.



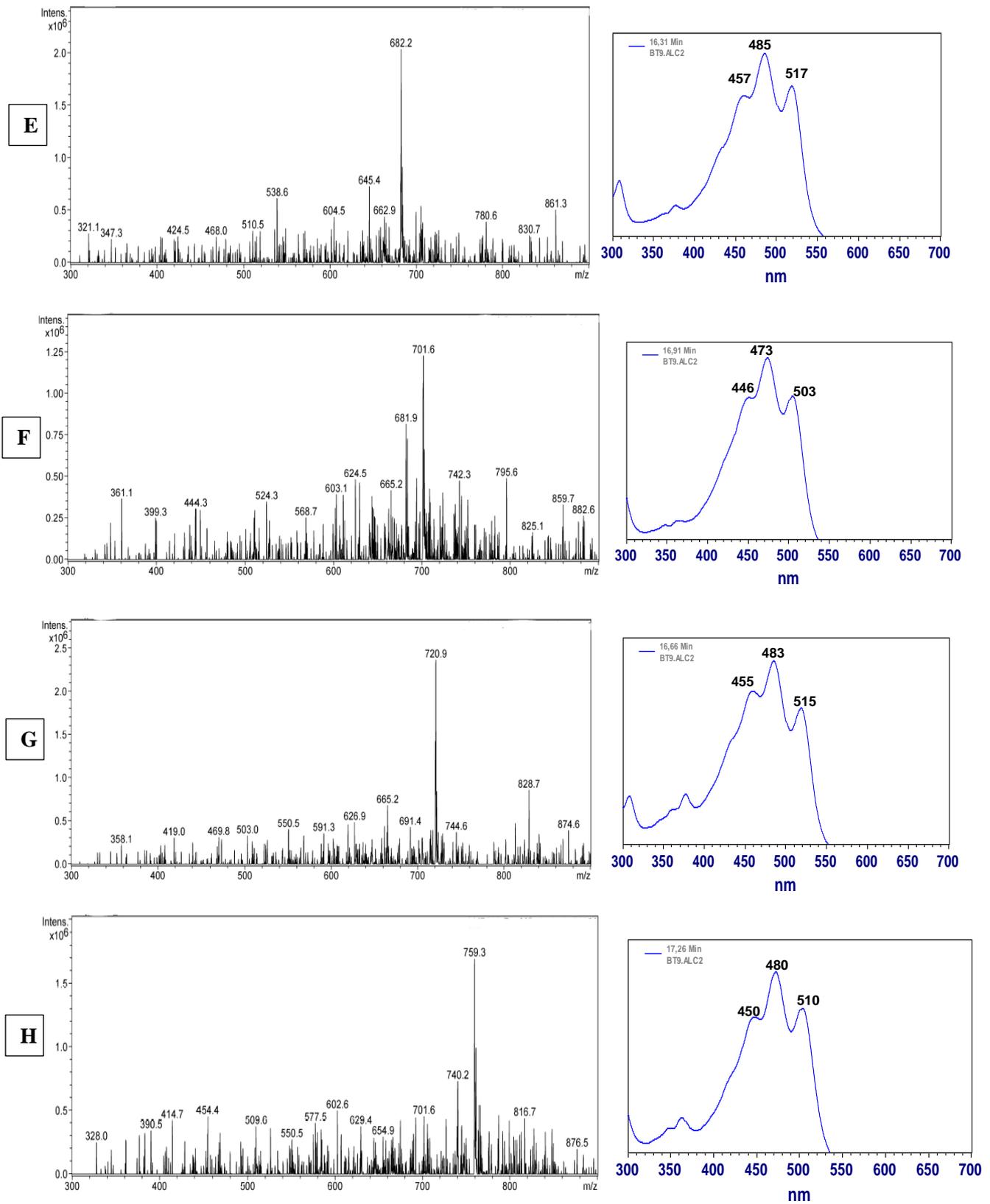
**Figure 32.** Spectres d'absorption visibles et de masse correspondant aux composants de l'extrait caroténoïdique de la souche *Halogeometricum* sp. ME3. A : pic 1 ; B : pic 2 ; C : pic 3 ; D : pic 4.



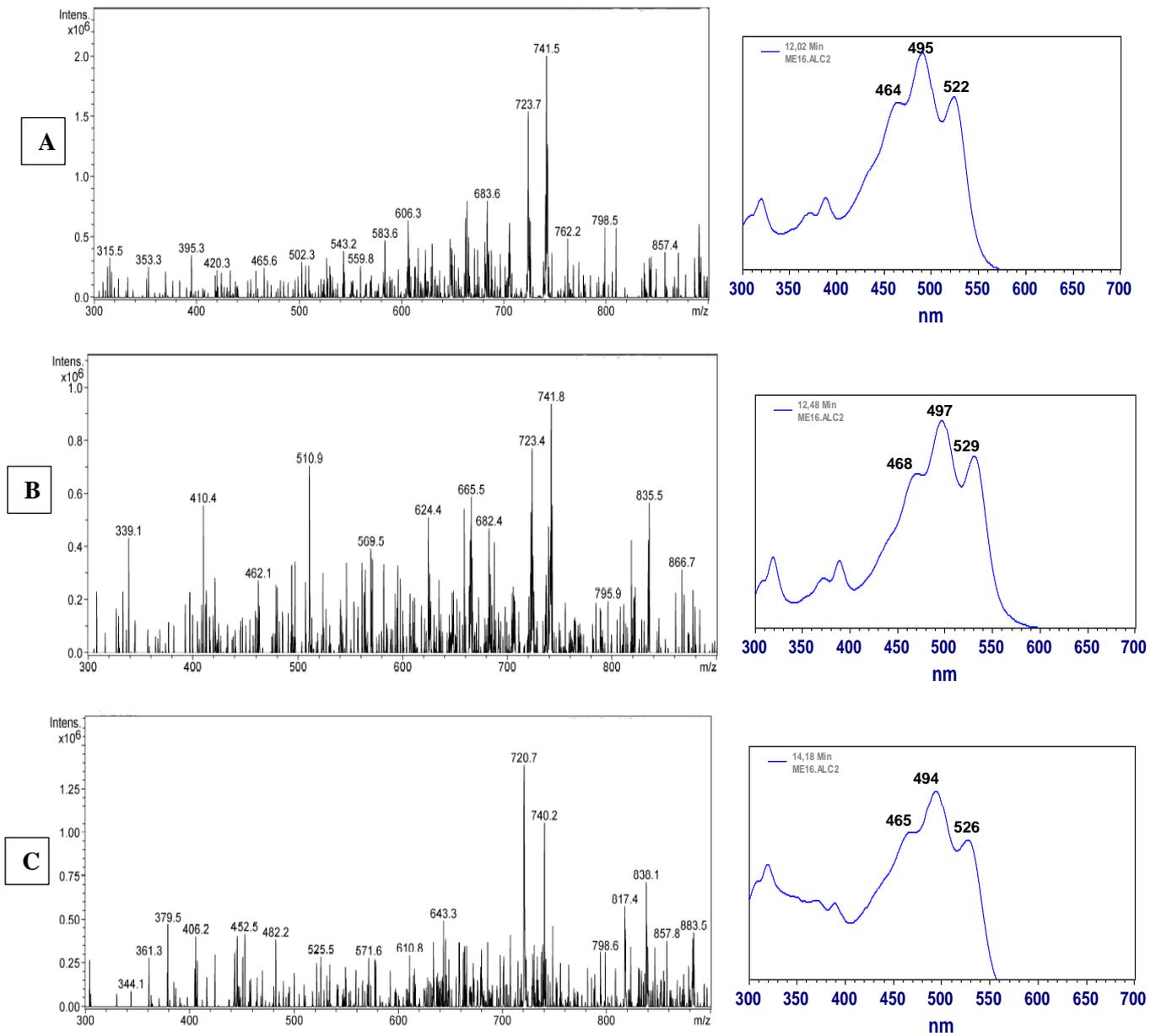
**Figure 32.** Spectres d'absorption visibles et de masse correspondant aux composants de l'extrait caroténoïdique de la souche *Halogeometricum* sp. ME3. E : pic 5 ; F : pic 6 ; G : pic 7 (suite).



**Figure 34.** Spectres d'absorption visibles et de masse correspondant aux composants de l'extrait caroténoïdique de la souche *Haloarcula* sp. BT9. A : pic 1 ; B : pic 2 ; C : pic 3 ; D : pic 4.



**Figure 34.** Spectres d'absorption visibles et de masse correspondant aux composants de l'extrait caroténoïdique de la souche *Haloarcula* sp. BT9. E : pic 5 ; F : pic 6 ; G : pic 7 ; H : pic 8 (suite).



**Figure 36.** Spectres d'absorption visibles et de masse correspondant aux composants de l'extrait caroténoïdique de la souche *Haloferax* sp. ME16. A : pic 1 ; B : pic 2 ; C : pic 3.

Tableau 22. Valeurs des pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• par les extraits caroténoïdiques testés.

Concentrations µg/mL		Échantillon	Pourcentage d'inhibition (%)				
			Ext BS2	Ext ME16	Ext BT9	Ext ME3	Ac asc
3	E1		20,94	5,91	0,00	0,00	5,77
	E2		18,76	4,13	0,00	0,00	6,14
	E3		18,72	6,28	0,00	0,00	6,02
	$\bar{X}$		19,74	5,44	0,00	0,00	5,97
	ET		1,27	1,15	0,00	0,00	0,18
9	E1		67,01	9,35	0,00	0,00	11,16
	E2		66,25	10,15	0,00	0,00	11,52
	E3		68,09	9,56	0,00	0,00	11,29
	$\bar{X}$		67,11	9,68	0,00	0,00	11,32
	ET		0,92	0,41	0,00	0,00	0,18
18	E1		98,04	21,30	9,20	0,00	16,68
	E2		99,88	23,53	5,13	0,00	16,91
	E3		99,16	20,02	7,39	0,00	16,31
	$\bar{X}$		99,02	21,61	7,24	0,00	16,63
	ET		0,92	1,77	2,03	0,00	0,30
40	E1		100,00	39,16	15,51	9,68	29,10
	E2		100,00	39,77	14,55	6,13	29,86
	E3		100,00	38,97	12,55	7,12	29,98
	$\bar{X}$		100,00	39,30	14,20	7,67	29,64
	ET		0,00	0,41	1,51	1,83	0,47
80	E1		100,00	52,43	27,96	ND	31,71
	E2		100,00	56,57	27,56	ND	32,20
	E3		100,00	55,83	30,94	ND	32,46
	$\bar{X}$		100,00	54,94	28,85	ND	32,12
	ET		0,00	2,20	1,81	ND	0,38
120	E1		100,00	66,93	48,90	27,86	58,59
	E2		100,00	67,80	49,34	28,40	58,90
	E3		100,00	66,50	44,96	28,77	58,56
	$\bar{X}$		100,00	66,74	47,73	28,34	58,68
	ET		0,00	1,16	2,41	0,45	0,18
200	E1		100,00	95,40	72,47	64,01	72,64
	E2		100,00	97,48	72,05	66,57	73,14
	E3		100,00	98,75	73,86	65,17	73,52
	$\bar{X}$		100,00	97,21	72,79	65,25	73,10
	ET		0,00	1,69	0,94	1,28	0,44
240	E1		100,00	100,00	99,26	81,85	94,72
	E2		100,00	99,88	100,00	79,48	93,60
	E3		100,00	100,00	100,00	81,15	93,85
	$\bar{X}$		100,00	99,96	99,75	80,82	94,05
	ET		0,00	0,06	0,42	1,21	0,58
320	E1		100,00	100,00	100,00	99,98	99,70
	E2		100,00	100,00	100,00	100,00	98,82
	E3		100,00	100,00	100,00	100,00	99,65
	$\bar{X}$		100,00	100,00	100,00	99,99	99,39
	ET		0,00	0,00	0,00	0,01	0,49

Ext : extrait caroténoïdique ; ac asc : acide ascorbique ; E : essai ;  $\bar{X}$  : moyenne ; ET : écart type.

Tableau 24. Valeurs du pourcentage d'inhibition du radical libre ABTS<sup>•+</sup> par les extraits caroténoïdiques testés.

Concentrations ( $\mu\text{g/mL}$ )		Échantillon	Pourcentage d'inhibition (%)				
			Ext BS2	Ext ME16	Ext BT9	Ext ME3	Ac asc
3	E1		25,49	10,93	0,00	0,00	6,10
	E2		27,48	11,18	0,00	0,00	6,39
	E3		25,68	12,20	0,00	0,00	6,25
	$\bar{X}$		26,22	11,43	0,00	0,00	6,94
	ET		1,09	0,67	0,00	0,00	0,11
9	E1		83,01	20,19	0,00	0,00	20,53
	E2		80,95	19,73	0,00	0,00	20,08
	E3		80,26	21,15	0,00	0,00	20,98
	$\bar{X}$		81,40	20,35	0,00	0,00	20,53
	ET		1,43	0,72	0,00	0,00	0,45
18	E1		99,70	32,15	1,30	0,00	33,03
	E2		99,85	31,39	1,12	0,00	30,80
	E3		99,51	32,82	1,25	0,00	32,14
	$\bar{X}$		99,68	32,12	1,22	0,00	31,99
	ET		0,17	0,71	0,09	0,00	1,12
40	E1		100,00	44,49	7,30	9,42	37,74
	E2		100,00	50,33	8,17	10,89	37,44
	E3		100,00	47,96	7,73	9,65	37,10
	$\bar{X}$		100,00	47,59	7,73	9,98	37,42
	ET		0,00	2,93	0,43	0,19	0,32
80	E1		100,00	59,04	28,08	ND	70,23
	E2		100,00	56,81	28,69	ND	72,02
	E3		100,00	62,10	28,79	ND	70,98
	$\bar{X}$		100,00	59,31	28,52	ND	71,07
	ET		0,00	2,65	0,38	ND	0,89
120	E1		100,00	68,56	40,25	37,57	75,03
	E2		100,00	67,17	45,62	43,08	74,51
	E3		100,00	67,45	40,40	42,13	76,07
	$\bar{X}$		100,00	67,72	42,09	40,92	75,20
	ET		0,00	0,73	3,05	2,9	0,79
200	E1		100,00	97,49	88,62	68,23	98,80
	E2		100,00	94,19	88,14	68,23	98,95
	E3		100,00	94,29	91,77	68,50	99,10
	$\bar{X}$		100,00	95,32	89,51	68,32	98,95
	ET		0,00	1,87	1,97	0,15	0,15
240	E1		100,00	99,56	99,54	71,69	99,27
	E2		100,00	99,88	99,96	74,68	99,12
	E3		100,00	99,60	99,97	76,69	99,27
	$\bar{X}$		100,00	99,34	99,15	74,35	99,22
	ET		0,00	0,40	0,73	2,51	0,08
320	E1		100,00	100,00	100,00	98,74	99,41
	E2		100,00	100,00	100,00	97,95	99,85
	E3		100,00	100,00	100,00	99,05	99,70
	$\bar{X}$		100,00	100,00	100,00	98,58	99,65
	ET		0,00	0,00	0,00	0,56	0,22

Ext : extrait caroténoïdique ; ac asc : acide ascorbique ; E : essai ;  $\bar{X}$  : moyenne ; ET : écart type.

**Tableau 27.** Valeurs de densité optique à 600 nm et du taux de production des caroténoïdes de la souche *Halorubrum* sp. BS2 sous différentes salinités, températures, vitesses d'agitation et intensités lumineuses.

Paramètres		Temps (jours)		0	1	2	3	4	5	6	7
		0	1	2	3	4	5	6	7		
Salinité % (p/v)	15	DO (600 nm)	0,237	ND	0,406	0,834	1,155	1,780	2,283	2,726	
		ET	0,002	ND	0,099	0,085	0,014	0,089	0,058	0,116	
		Prod (µg/mL)	0,000	ND	1,270	1,490	2,296	3,725	4,014	5,597	
		ET	0,000	ND	0,042	0,005	0,087	0,096	0,033	0,028	
	20	DO (600 nm)	0,243	ND	0,582	2,256	3,050	3,150	3,446	3,723	
		ET	0,006	ND	0,053	0,228	0,095	0,050	0,100	0,075	
		Prod (µg/mL)	0,000	ND	2,330	4,070	5,480	8,584	9,555	17,217	
		ET	0,000	ND	0,042	0,010	0,073	0,065	0,021	0,065	
	25	DO (600 nm)	0,241	ND	0,524	2,303	2,900	3,160	3,786	4,290	
		ET	0,004	ND	0,055	0,052	0,100	0,020	0,021	0,096	
		Prod (µg/mL)	0,000	ND	3,274	5,670	6,296	8,677	10,187	17,593	
		ET	0,000	ND	0,023	0,015	0,006	0,030	0,015	0,225	
	30	DO (600 nm)	0,259	ND	0,426	1,690	2,660	2,840	3,110	3,393	
		ET	0,002	ND	0,087	0,175	0,036	0,072	0,121	0,083	
		Prod (µg/mL)	0,000	ND	2,070	2,751	5,029	6,244	8,397	8,717	
		ET	0,000	ND	0,004	0,029	0,029	0,057	0,050	0,040	
Vitesse d' agitation (tpm)	0	DO (600 nm)	0,249	0,283	ND	0,655	0,687	0,888	1,174	1,240	
		ET	0,002	0,012	ND	0,011	0,080	0,070	0,010	0,045	
		Prod (µg/mL)	0,000	0,755	ND	1,050	1,370	1,620	1,810	2,120	
		ET	0,000	0,011	ND	0,167	0,017	0,030	0,020	0,010	
	100	DO (600 nm)	0,220	0,920	ND	3,160	3,230	3,316	3,520	3,660	
		ET	0,003	0,022	ND	0,032	0,057	0,032	0,026	0,110	
		Prod (µg/mL)	0,000	1,631	ND	7,730	11,200	13,520	15,750	17,080	
		ET	0,000	0,016	ND	0,028	0,055	0,400	0,063	0,073	
	200	DO (600 nm)	0,219	0,945	ND	3,310	3,433	3,523	3,840	3,873	
		ET	0,002	0,023	ND	0,010	0,025	0,048	0,030	0,011	
		Prod (µg/mL)	0,000	1,890	ND	10,030	12,15	15,790	17,340	19,867	
		ET	0,000	0,023	ND	0,011	0,084	0,300	0,040	0,022	
	300	DO (600 nm)	0,220	1,045	ND	3,560	3,660	3,716	3,940	3,993	
		ET	0,005	0,018	ND	0,046	0,026	0,070	0,050	0,015	
		Prod (µg/mL)	0,000	2,277	ND	11,720	17,350	21,620	21,910	22,590	
		ET	0,000	0,273	ND	0,040	0,210	0,127	0,028	0,260	
Température (°C)	30	DO (600 nm)	0,237	0,917	2,030	2,640	3,120	ND	3,690	3,480	
		ET	0,002	0,005	0,052	0,079	0,081	ND	0,058	0,010	
		Prod (µg/mL)	0,000	1,552	3,811	5,059	8,259	ND	13,082	15,187	
		ET	0,000	0,028	0,078	0,006	0,530	ND	0,011	0,050	
	37	DO (600 nm)	0,231	0,866	2,160	3,320	4,096	ND	4,136	4,832	
		ET	0,001	0,003	0,026	0,146	0,047	ND	0,020	0,032	
		Prod (µg/mL)	0,000	1,871	3,913	10,462	14,770	ND	18,044	24,36	
		ET	0,000	0,073	0,011	0,017	0,017	ND	0,112	1,260	
	42	DO (600 nm)	0,238	0,892	2,170	3,250	3,696	ND	3,700	4,266	
		ET	0,005	0,007	0,060	0,006	0,058	ND	0,043	0,032	
		Prod (µg/mL)	0,000	1,559	3,856	7,755	9,570	ND	15,232	20,070	
		ET	0,000	0,028	0,097	0,166	0,049	ND	0,012	0,196	
	Intensité lumineuse (µEm <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	0	DO (600 nm)	0,231	0,590	1,396	2,300	3,230	ND	3,760	3,950
			ET	0,001	0,004	0,035	0,026	0,056	ND	0,026	0,020
			Prod (µg/mL)	0,000	ND	2,760	5,890	7,860	ND	13,680	15,220
			ET	0,000	ND	0,006	0,049	0,230	ND	0,340	0,110
100		DO (600 nm)	0,231	0,516	1,933	2,760	3,230	ND	3,910	4,010	
		ET	0,001	0,003	0,020	0,035	0,052	ND	0,050	0,015	
		Prod (µg/mL)	0,000	ND	3,350	8,170	13,030	ND	19,810	21,690	
		ET	0,000	ND	0,025	0,011	0,130	ND	0,120	0,170	
260		DO (600 nm)	0,238	0,971	2,403	3,076	3,900	ND	4,070	4,250	
		ET	0,005	0,011	0,104	0,020	0,026	ND	0,075	0,100	
		Prod (µg/mL)	0,000	ND	5,900	12,950	16,280	ND	25,750	25,86	
		ET	0,000	ND	0,010	0,049	0,160	ND	0,130	0,170	

Prod : taux de production des caroténoïdes ; ET : écart type ; tpm : tour par minute ; ND : non déterminé.

**Annexe 3.**  
**Production scientifique**

# Bioprospecting and characterization of pigmented halophilic archaeal strains from Algerian hypersaline environments with analysis of carotenoids produced by *Halorubrum* sp. BS2

Kaouther Sahli<sup>1</sup> | Mohamed A. Gomri<sup>1</sup>  | Julia Esclapez<sup>2</sup> | Patricia Gómez-Villegas<sup>3</sup> | Oulaya Ghennai<sup>1</sup> | María-José Bonete<sup>2</sup> | Rosa León<sup>3</sup> | Karima Kharroub<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Recherche Biotechnologie et Qualité des Aliments (BIOQUAL), Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires (INATAA), Université Frères Mentouri Constantine 1 (UFMC1), Constantine, Algeria

<sup>2</sup>Agrochemistry and Biochemistry Department, Biochemistry and Molecular Biology Division, Faculty of Science, University of Alicante, Alicante, Spain

<sup>3</sup>Laboratory of Biochemistry, Faculty of Experimental Sciences, Marine International Campus of Excellence (CEIMAR), University of Huelva, Huelva, Spain

## Correspondence

Mohamed A. Gomri, Équipe Métabolites des Extremophiles (METEX), Laboratoire de Recherche Biotechnologie et Qualité des Aliments (BIOQUAL), Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires (INATAA), Université Frères Mentouri Constantine 1 (UFMC1), Route de Ain El Bey, 25000 Constantine, Algeria.  
Email: gomrima@umc.edu.dz

## Funding information

European Research Grant, Grant/Award Number: INTERREG VA POCTEP-055 ALGARED\_PLUS\_5E; Universidad de Alicante, Grant/Award Number: VIGROB-016

## Abstract

A set of 110 extremely halophilic archaeal strains were isolated from seven distinct saline habitats located in different regions of Algeria. The physicochemical characterization of the samples showed that these habitats were thalassohaline. The carotenoid production from isolated strains varied from 0.1 to 3.68 µg/ml. Based on their physiological characteristics and pigment production, 43 strains were selected and identified by means of phenotypic tests and 16S ribosomal RNA gene sequencing. Phylogenetic analysis indicated that the isolates corresponded to the class Halobacteria and were closely related to genera *Halorubrum*, *Haloarcula*, *Haloferax*, *Natrinema*, *Halogeometricum*, *Haloterrigena*, and *Halopiger*. Carotenoids of the highest producer, strain *Halorubrum* sp. BS2 were identified using high-performance liquid chromatography–diode array detector and liquid chromatography–mass spectrometry. Bacterioruberin and bisanhydrobacterioruberin were the predominant carotenoids. The scavenging activity of these carotenoids reached 99% at a concentration of 18 µg/ml, which was much higher than that of ascorbic acid used as a reference compound. These carotenoids also exhibited significant antibacterial activities against four human-pathogenic strains and four fish-pathogenic strains. Variations in salinity, agitation rate, temperature, and light intensity were found to influence growth and carotenoid production of *Halorubrum* sp. BS2. Our results suggest that halophilic archaea represent a potential source for carotenoids, which are characterized by high antioxidant and antibacterial activities.

## KEYWORDS

Algeria, antibacterial, antioxidant, carotenoids, haloarchaea

## 1 | INTRODUCTION

Hypersaline environments are distributed in a wide range of aquatic and terrestrial ecosystems including salt and soda lakes, deep-sea brine pools, coastal lagoons, and saline soils [1]. They are often harbored by a great variety of halophilic microorganisms [2]. Halophilic archaea represent a major part of microbial communities inhabiting these ecosystems. They are known to be a potential source of unique and stable biomolecules with biotechnological interest such as carotenoids, enzymes, biodegradable polyesters, exopolysaccharides, and so forth [3,4]. Haloarchaeal carotenoids have received great interest due to their various potential applications and more importantly their beneficial effects on human health. They present higher antioxidant ability when compared with other commercially available carotenoids, such as  $\beta$ -carotene. They have also shown interesting antihemolytic and anticancer activities [5,6].

Algeria has a large number of hypersaline lakes (Chotts and Sabkha) spread out from the coastal area to the northern Saharan fringes and across the High Plateaux. They are characterized by a high biological diversity and constitute geological reservoirs harboring various populations of halophiles [7]. Many studies

on microbiota and fauna of these ecosystems have been carried out [8]. However, there have been only a few reports on halophilic archaea [9–12] and none of the studies focused on carotenoids produced by these microorganisms and their biological effects.

In the present work, we first describe the isolation and the characterization of pigmented halophilic archaea from different Algerian hypersaline environments with prospecting for their carotenoids production. Second, we present the results of the identification of carotenoids produced by a selected strain using high-performance liquid chromatography–diode array detector (HPLC–DAD) and liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) and the study of their antioxidant and antibacterial activities to determine their biomedical potential.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Collection of samples

Samples were taken between October 2016 and February 2017 from seven Algerian hypersaline environments including solar saltern and natural salt lakes (Figure 1): Sebkhia Ezzemoul (Ain M'lila), Sebkhia Bazer Sakra (Setif), Sebkhia Ain Oulmene (Setif), and

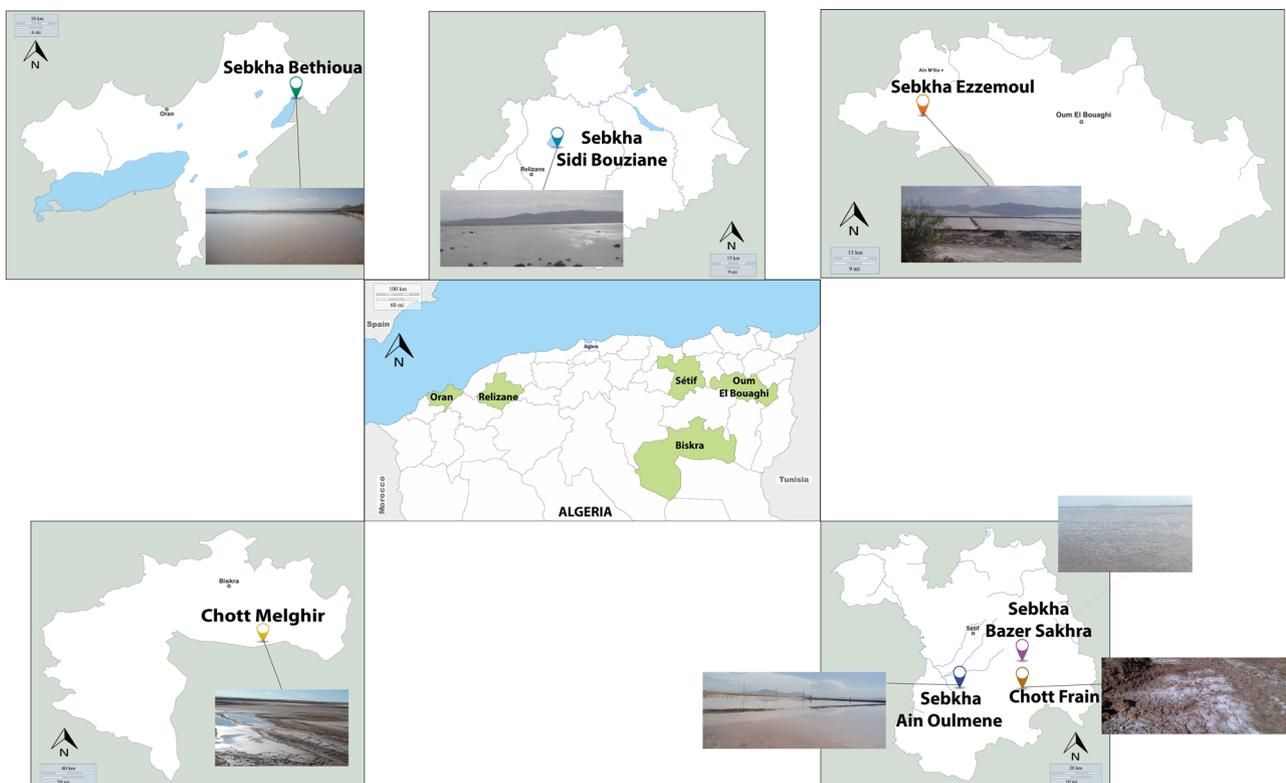


FIGURE 1 Location of sampling sites

Chott Frain (Setif) in northeastern Algeria, Sebkhia Bethioua (Oran) and Sebkhia Sidi Bouziane (Relizane) in northwestern Algeria, and Chott Melghir (Biskra) northeast of the Algerian Sahara. These wetlands are Ramsar sites with the exception of Chott Frain and Sebkhia Sidi Bouziane; their water supply is highly dependent on rainfall and most of them are waterless during the dry season occurring in summer from June to August. Brine and salt samples were collected in sterile bottles from 19 points of these sites, and were delivered to the laboratory in a cool box. pH and temperature were measured *in situ* and the ionic composition was determined in the chemistry laboratory of the national company of salts, Algeria.

## 2.2 | Growth media and culture conditions

Strains were isolated in modified growth medium (MGM) containing (per liter) 5 g peptone, 1 g yeast extract with a final total salt concentration of 23% (w/v). The stock of total salt at 30% w/v was prepared as described by Subow [13] and modified by Dyall-Smith [14] as 240 g NaCl, 30 g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 34 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.5 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, and 7 g KCl; pH was adjusted to 7.5. For solid medium, 20 g/L agar was added. Water and salt samples were diluted in sterile 23% w/v NaCl solution and a series of dilutions were made. Aliquots (100 µl) of 10<sup>-1</sup> to 10<sup>-4</sup> dilutions were plated onto the isolation media. The Petri dishes were incubated at 37°C. After 2 weeks of incubation, a collection of 110 colonies chosen on the basis of their different macroscopic characteristics were picked and restreaked several times to obtain pure cultures.

## 2.3 | Morphological and physiological properties

Colony appearance and pigmentation were determined on solid media after incubation at 37°C for 7 days. Gram staining was performed by using acetic acid-fixed samples, as described by Dussault [15].

Temperature, Salinity, and pH ranges for growth were determined by inoculating the cultures on MGM solid medium and incubating at various temperatures (25°C, 30°C, 35°C, 37°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, and 60°C), salinities (10–30% w/v) with an interval of 5% (w/v), and pH (4–9) with 0.5 intervals.

## 2.4 | Screening for the highest carotenoid-producing strain

Each strain was inoculated in 5 ml of MGM at 23% (w/v) and incubated on a rotary shaker at 200 rpm for 7 days at 37°C. After incubation, 1 ml of each culture was adjusted to an absorbance of 1.0 at 600 nm with 23% (w/v) sterile MGM and was then inoculated into 20 ml of the MGM in 50-ml Erlenmeyer flasks. The flasks were incubated in a rotary shaker at 200 rpm for 7 days at 37°C.

The extraction of pigments was performed as described by Asker and Ohta [16]. A volume of 5 ml of culture broth was centrifuged at 8,000g for 10 min. The harvested cells were resuspended in distilled water, and then the pigments were extracted with methanol. Extracted pigments were scanned in the wavelength region of 300–700 nm using a UV-Vis spectrophotometer (Beckman/DU 800) to determine the maximum absorption wavelength. The total concentration of carotenoids was determined by measuring the optical density (OD) of the samples at  $\lambda_{\max} = 488 \pm 2$  nm and calculated according to the formula proposed by Britton et al. [17]. The absorption coefficient value used was 2,660.

## 2.5 | Selection of strains and phenotypic characterization

On the basis of their physiological characteristics and the pigment content, 43 strains were selected to be characterized. Phenotypic characterization tests were carried out according to the proposed minimal standards for the description of new taxa in the order Halobacteriales [18].

Catalase production was determined by adding 1% (w/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to colonies on solid medium [19]. The presence of oxidase was detected on oxidase disks (Sigma-Aldrich). Indole production and nitrate reduction were tested according to Ozcan et al. [20]. The formation of gaseous products from nitrate was detected by the presence of gas bubbles in Durham tubes [21]. Production of H<sub>2</sub>S was tested by growing the isolates in MGM agar supplemented with 0.5% (w/v) Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [22]. Anaerobic growth in the presence of L-arginine was tested according to Oren and Litchfield [23].

Utilization of sugars, sugar alcohols, amino acids, and organic acids as the sole source of carbon or/and nitrogen and acid production from carbohydrates were tested according to Oren et al. [18]. Antibiotic sensitivity was examined by spreading archaeal suspensions on MGM 23% (w/v) solid medium and applying antibiotic discs: penicillin G (1 IU), chloramphenicol (10 µg), vancomycin (5 µg), gentamicin (10 µg), nalidixic acid (30 µg), erythromycin (2 µg), cefoxitin (30 µg) [19].

## 2.6 | Screening of extracellular hydrolytic enzymes

Selected strains were tested qualitatively for the production of extracellular enzymes on MGM 23% (w/v) solid medium. Amylase production was determined using a growth medium containing 1% (w/v) soluble starch [19]. Casein hydrolysis was detected by observing the formation of clear zones around colonies on agar media containing 1% (w/v) casein [24]. Lipase activity was determined by the presence of an opaque halo around the colonies grown on solid medium supplemented with 1% (w/v) of Tween-80 [25]. Gelatin hydrolysis was checked by the development of clear zones around the growth area after flooding the colonies with 15% (w/v) HgCl<sub>2</sub>, in 20% (v/v) concentrated HCl [26].

## 2.7 | Molecular identification

Genomic DNA was extracted from cells using the GeneJET Genomic Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), following the instructions of the manufacturer. Quantification of the genomic DNA and the assessment of its purity were carried out by a Nanodrop Spectrophotometer ND-1000 (Thermo Fisher Scientific).

The 16S ribosomal RNA (rRNA) gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using archaeal-specific primers: 21F (5'TTCCGGTTGATCC TGCCGGA-3') and 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACG ACTT-3'). PCR amplifications were performed using 25 µl reaction mixtures containing 10 pmol of each primer, 5 µl of PCR buffer (Bioline), 0.5 µl dimethyl sulfoxide, 0.5 U (1.25) Taq DNA Polymerase (Bioline) and 100–200 ng DNA template [27]. The PCR program used was as follows: 5 min denaturing step at 95°C in the first cycle, followed by 35 cycles of 1 min denaturation at 95°C, 1 min annealing at 52°C, 2 min elongation at 72°C with a final extension step at 72°C for 8 min. The quality of PCR products was checked by electrophoresis on 1% agarose gel which were then purified and sequenced by Stab Vida services (Lisbon, Portugal) using primers 21F and 1492R.

The resulting sequences were compared with reference 16S rRNA gene sequences available in Ez-BioCloud database version 11/2019 [28]. Multiple sequence alignments were performed with MEGA software version 7 using the Clustal W algorithm [29]. Phylogenetic tree was constructed with MEGA7 program package [30] using neighbor-joining [31] and maximum composite likelihood models [32] with 1,000 bootstrap replications.

## 2.8 | Nucleotide accession numbers

Nucleotide sequences have been deposited in the NCBI database under accession numbers MN134037 to MN134073 and MN241524 to MN241530.

## 2.9 | HPLC–DAD and LC–MS analysis of carotenoids produced by a selected strain

Carotenoids produced by a selected strain, which exhibited the highest carotenoid-producing ability, were extracted and quantified as described previously, and then filtered through 0.45-µm pore size membrane filters. Chromatographic analysis was performed on a Merck-Hitachi LaChrom Elite HPLC system equipped with diode array detector (L-2455) and gradient pump (L-7100). Separation of carotenoids was carried out using an RP-18 column and a flow rate of 1 ml/min. The mobile phase consisted of solvent A (ethyl acetate) and solvent B (acetonitrile/water [9:1 v/v]) and the gradient elution program was as follows: 0–16 min, 0–60% A; 16–30 min, 60% A; 30–35 min, 100% B. Injection volume was 100 µl. Chromatograms were recorded at 450 nm.

To determine the mass spectra of the different compounds, an Agilent 1100 Series LC/MSD Trap SL system was used, equipped with an electrospray ionization source operating in positive scan mode (*m/z* range of 300–900). The mass spectrometer parameters were set as follows: nebulizer pressure was 50 psi, drying gas flow was 10 L/min, gas temperature was 35°C and the capillary voltage was 4,000 V. The identification of carotenoids was performed by comparing retention time, UV spectra, and the characteristics of the mass spectra (protonated molecule ([M + H]<sup>+</sup>) and its tandem mass spectrometry [MS/MS] fragments).

## 2.10 | Antioxidant activity

DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) assays were used to evaluate antioxidant activity of carotenoids. DPPH radical scavenging assay was performed according to the method of Hou and Cui [6] with some modifications. The carotenoid solution was prepared at different concentrations. Twenty-five microliters of each concentration was mixed with 1 ml of 100 µM DPPH (prepared with methanol). The control was prepared with 25 µl of methanol in 1 ml of 100 µM DPPH. After 5 min in the dark, the absorbance was measured at 517 nm against methanol as a blank.

The percentage of DPPH scavenging was calculated as follows: (%) = [(A control – A sample)/A control] × 100.

The ABTS assay was based on the method of Thaipong et al., [33] slightly modified. Briefly, 25 µl of each concentration was added to 1 ml of ABTS solution previously prepared, and then incubated for 5 min. The control was prepared by adding 25 µl of methanol in place of the sample. The absorbance was taken at 734 nm and the scavenging activity was calculated as follows: (%) = [(A control – A sample)/A control] × 100. All these experiments were performed in triplicate.

### 2.11 | Antibacterial activity

The antibacterial activity of carotenoids was evaluated by disk diffusion assay [34] against four strains pathogenic to humans (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*) and four strains pathogenic to fish (*Pseudomonas anguilliseptica*, *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum*, *Photobacterium damsela*). Inocula of test strains (adjusted to a turbidity of 0.5 McFarland standard) were inoculated onto agar plates. Sterile 6-mm Whatman filter paper discs were placed on the plates and impregnated with 40 µl of carotenoids dissolved in methanol at a concentration of 40 µg/ml. The plates were incubated for 24 h at 37°C for the human-pathogenic bacteria and at 25°C for the fish-pathogenic bacteria. Inhibitions zones were measured to evaluate antibacterial activity. Gentamicin and dicentracin (fish antimicrobial peptide) were used as positive control. Disk impregnated with methanol was used as a negative control. Experiments were carried out in triplicate.

### 2.12 | Effect of cultural conditions on growth and carotenoids production

Growth and total carotenoids content in the selected strain were evaluated under different salt concentrations, agitation rate, temperature, and light intensity. Carotenoid production was determined as described previously and growth was quantified by measuring the OD at 600 nm. An initial culture under standard conditions (MGM medium; 37°C and 100 rpm) was used as preinoculum in all the experiments. A volume of 3 ml of preinoculum was added to 50 ml of culture medium in 250 ml flasks. The culture was incubated for 7 days. Only one parameter was changed each time and the other parameter values were kept constant. Samples were taken at different time

intervals and growth and total carotenoids content were measured. Measurements were made in triplicate.

## 3 | RESULTS

### 3.1 | Physicochemical analysis of brine and salt samples

Brine and salt samples were collected from 19 different points of seven hypersaline lakes located in northeastern and northwestern Algeria (Figure 1). All samples were neutral to alkaline with pH values ranging from 6.88 to 8.40 (Table S1). The physicochemical characteristics of all samples are presented in Table S2. Sodium and chloride were the main ions. The concentration of chloride ions exceeded that of sodium ions. Magnesium and sulfate ions were less abundant and low concentrations of calcium were also detected.

### 3.2 | Cell and colony morphology

A total of 110 archaeal strains were isolated from the seven sites: Ezzemoul (39 strains), Ain Oulmene (23 strains), Melghir (21 strains), Bethioua (10 strains), Baser Sakra (8 strains), Frain (5 strains), and Sidi Bouziane (4 strains). All isolates produced on solid media circular colonies of 1–2 mm in diameter, convex with entire edges. Pigmentation ranged from pale pink to dark red. The cells observed by photonic microscopy were Gram negative and had different forms varying from rods, cocci to pleomorphic rods. All isolates were extreme halophiles requiring at least 15% (w/v) salinity and grew optimally at 20–25% (w/v). The optimum temperature for growth ranged from 37°C to 42°C and some strains were able to grow at 55°C. The pH range for growth was between 5.0 and 9.0 and all isolates grew optimally at pH 7.0–7.5 (Table S3).

### 3.3 | UV-Vis spectrum of carotenoids and total carotenoid content

Carotenoid extract from all selected strains gave identical absorption spectra characterized by three-fingered peaks with absorption maxima at about 460, 490, and 520 nm and two *cis* absorption maxima at around 317 and 388 nm, which correspond to bacterioruberin and its derivatives [17].

The carotenoid production of the isolated strains was in the range of 0.1–3.68 µg/ml (Table S4). Strain BS2 exhibited the highest carotenoid-producing ability

at  $3.68 \pm 0.05 \mu\text{g/ml}$ , followed by AW21 and BT4 at  $3.20 \pm 0.01$  and  $2.97 \pm 0.01 \mu\text{g/ml}$ , respectively.

### 3.4 | Selection and characterization of halophilic archaea

From a total of 110 isolates, 43 strains were selected on the basis of their physiological characteristics and pigment production and were phenotypically and genotypically characterized.

All selected strains showed positive catalase and oxidase reactions, the majority of the isolates reduced nitrate to nitrite, while a few produced gas from nitrate. Only one strain produced hydrogen sulfide from sodium thiosulfate and none produced indole. No anaerobic growth was observed in any strain in the presence of L-arginine. Different reactions were noted for the utilization of substrates as the sole carbon, energy, and nitrogen sources and for the production of acids from carbohydrates. All isolates were resistant to antibiotics that target peptidoglycan layer (penicillin G and gentamycin) and sensitive to chloramphenicol, whereas the sensitivity toward vancomycin, nalidixic acid, erythromycin, and cefoxitin was variable.

The selected isolates were tested for their ability to produce extracellular enzymes including amylase, protease, and lipase. At least one hydrolytic enzyme was found in 32 strains and combined hydrolytic activities were detected in many strains. Strains able to hydrolyze gelatin and Tween-80 were the most abundant (48% and 45% of the isolates, respectively). Ability to hydrolyze starch was detected in 22% of the tested strains and neither of them hydrolyzed casein.

Biochemical properties of the strains are presented in Table S5.

### 3.5 | Molecular identification and phylogenetic analysis

Sequences of 16S rRNA genes were compared with those present in the EzBiocloud database (Table 1). Results showed that the isolated archaea corresponded to Halorubraceae, Haloarculaceae, Haloferaceae, and Natribaceae families and were closely related to seven genera with 96.7–99.9% of sequence similarity to the type strains. *Halorubrum* was the dominant group (32.6%), followed by *Haloarcula* (23.3%), *Haloferax* (13.9%), *Natrinema* (11.6%), *Halogeometricum* (9.3%), *Haloterrigena* (7.0%), and *Halopiger* (2.3%). The phylogenetic analysis is shown in Figure 2. Results confirmed

that 43 strains belonged to the same respective seven archaeal genera cited above.

### 3.6 | Characterization of carotenoids produced by strain BS2

Strain BS2 which showed the highest carotenoid content was affiliated with *Halorubrum sodomense* species. Carotenoids occurring in this strain were extracted and identified based on their chromatographic and spectroscopic characteristics. HPLC–DAD analysis revealed three major peaks with an almost identical absorption spectrum which corresponds to bacterioruberin and its derivatives [17]. Mass spectrometric analysis revealed that peak 2 and 3 had the same molecular weight and were tentatively identified as bacterioruberin with  $[M + H]^+$  at  $m/z$  741. Peak 1 showed a  $[M + H]^+$  ion at  $m/z$  705.5 corresponding to bisanhydrobacterioruberin [20]. Retention time, UV–Vis wavelength maxima ( $\lambda_{\text{max}}$ ), and the most abundant MS/MS fragment ions obtained in positive mode for the different isolated carotenoids are shown in Table 2.

### 3.7 | Antioxidant activity

DPPH and ABTS assays were used to evaluate the antioxidant activity of carotenoids extracted from *Halorubrum* sp. BS2. A positive response was obtained with both assays, attesting the capacity of these molecules to act as antioxidant agents through the transfer of electrons to radical species. The scavenging capacity of both reactive species was found to be dose-dependent, increasing with carotenoid concentration and reaching 99% at a concentration of  $18 \mu\text{g/ml}$  (Figure 3). Ascorbic acid used as a standard showed relatively low scavenging capacity compared with the extracted carotenoids, indicating the higher antioxidant potential of carotenoids derived from the halophilic archaeon *Halorubrum* sp. BS2.

### 3.8 | Antibacterial activity

Antibacterial activity of methanolic carotenoids extracts was estimated by agar disk diffusion method. The results revealed that carotenoids produced by *Halorubrum* sp. BS2 had antibacterial activity against all tested pathogenic bacteria. They showed strong growth inhibition against *E. coli*, *K. pneumonia*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*; the zone of inhibition was between 13 and 15 mm. However, relatively smaller zones of inhibition were observed

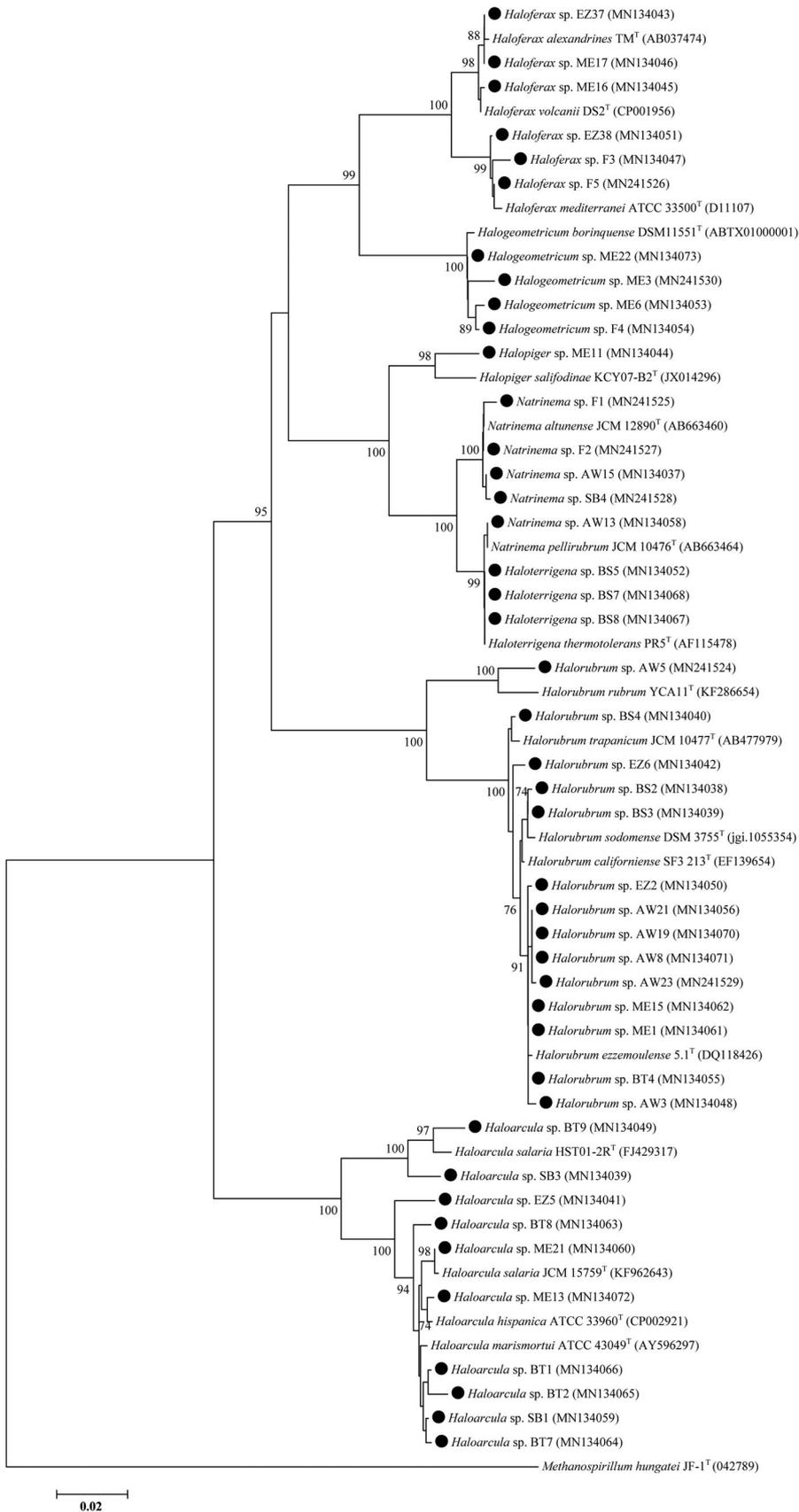
**TABLE 1** Results of the nBLAST alignment with the EzBioCloud database version 11/2019

Strain	Isolation site	Access number	Sequence length (bp)	Taxon (type strain)	Similarity (%)	Coverage (%)
AW3	Ain Oulmene	MN134048	1,240	<i>Halorubrum ezzemoulense</i> 5.1 (DQ118426)	97.0	97.1
AW5	Ain Oulmene	MN241524	1,285	<i>Halorubrum rubrum</i> YC87 (JQ237124)	97.2	100
AW8	Ain Oulmene	MN134071	1,357	<i>Halorubrum californiense</i> SF3 213 (EF139654)	99.2	100
AW13	Ain Oulmene	MN134058	1,375	<i>Natrinema pellicurubrum</i> DSM 15624 (AGIN01000009)	99.4	100
AW15	Ain Oulmene	MN134037	1,373	<i>Natrinema altunense</i> AJ2 (JNCS010000019)	99.3	100
AW19	Ain Oulmene	MN134070	1,358	<i>H. californiense</i> SF3 213 (EF139654)	99.2	100
AW21	Ain Oulmene	MN134056	1,376	<i>H. californiense</i> SF3 213 (EF139654)	98.7	100
AW23	Ain Oulmene	MN241529	1,358	<i>H. californiense</i> SF3 213 (EF139654)	99.1	100
BS2	Bazer Sakra	MN134038	1,371	<i>Halorubrum sodomense</i> DSM 3755 (jgi.10555354)	99.1	100
BS3	Bazer Sakra	MN134039	1,362	<i>H. sodomense</i> DSM 3755 (jgi.10555354)	99.5	100
BS4	Bazer Sakra	MN134040	1,371	<i>Halorubrum trapanicum</i> NRC 34021 (X82168)	98.9	100
BS5	Bazer Sakra	MN134052	1,366	<i>Haloterrigena thermotolerans</i> PR 5 (AF115478)	99.9	100
BS7	Bazer Sakra	MN134068	1,381	<i>H. thermotolerans</i> PR 5 (AF115478)	99.7	100
BS8	Bazer Sakra	MN134067	1,360	<i>H. thermotolerans</i> PR 5 (AF115478)	99.7	100
BT1	Bethioua	MN134066	1,367	<i>Haloarcula marismortui</i> ATCC 43049 (AY596297)	99.4	100
BT2	Bethioua	MN134065	1,350	<i>H. marismortui</i> ATCC 43049 (AY596297)	99.1	100
BT4	Bethioua	MN134055	1,358	<i>H. californiense</i> SF3 213 (EF139654)	99.1	100
BT7	Bethioua	MN134064	1,357	<i>H. marismortui</i> ATCC 43049 (AY596297)	99.4	100
BT8	Bethioua	MN134063	1,361	<i>Haloarcula hispanica</i> ATCC 33960 (CP002921)	99.0	100
BT9	Bethioua	MN134049	1,314	<i>H. marismortui</i> ATCC 43049 (AY596297b)	98.3	100
EZ2	Ezzemoul	MN134050	1,303	<i>H. californiense</i> SF3 213 (EF139654)	98.4	100
EZ5	Ezzemoul	MN134041	1,365	<i>H. hispanica</i> ATCC 33960 (CP002921)	98.5	100
EZ6	Ezzemoul	MN134042	1,359	<i>H. trapanicum</i> NRC 34021(X82168)	99.1	100
EZ37	Ezzemoul	MN134043	1,376	<i>Haloferax alexandrinus</i> TM (AB037474)	99.5	100
EZ38	Ezzemoul	MN134051	1,322	<i>Haloferax mediterranei</i> CGMCC 1.2087 (CP001868)	98.1	100
F1	Frain	MN241525	1,358	<i>N. altunense</i> AJ2 (JNCS010000019)	99.5	100
F2	Frain	MN241527	1,366	<i>N. altunense</i> AJ2 (JNCS010000019)	99.4	100

TABLE 1 (Continued)

Strain	Isolation site	Access number	Sequence length (bp)	Taxon (type strain)	Similarity (%)	Coverage (%)
F3	Frain	MN134047	1,287	<i>H. mediterranei</i> CGMCC 1.2087 (CP001868)	98.9	100
F4	Frain	MN134054	1,290	<i>Halogetomicrum borinquense</i> DSM 11551 (ABTX01000001)	98.8	100
F5	Frain	MN241526	1,329	<i>H. mediterranei</i> CGMCC 1.2087 (CP001868)	99.6	100
ME1	Melghir	MN134061	1,357	<i>H. californiense</i> SF3 213 (EF139654)	99.3	100
ME3	Melghir	MN241530	1,049	<i>H. borinquense</i> DSM 11551 (ABTX01000001)	98.9	100
ME6	Melghir	MN134053	1,288	<i>H. borinquense</i> DSM 11551 (ABTX01000001)	98.9	100
ME11	Melghir	MN134044	1,375	<i>Halopiger salifodinae</i> KCY07-B2 (JX014296)	96.7	100
ME13	Melghir	MN134072	1,354	<i>H. hispanica</i> ATCC 33960 (CP002921)	99.5	100
ME15	Melghir	MN134062	1,351	<i>H. californiense</i> SF3 213 (EF139654)	99.3	100
ME16	Melghir	MN134045	1,377	<i>Haloferax volcanii</i> DS2 (CP001956)	99.6	100
ME17	Melghir	MN134046	1,354	<i>H. alexandrinus</i> TM (AB037474)	99.5	100
ME21	Melghir	MN134060	1,337	<i>H. marismortui</i> ATCC 43049 (AY596297)	99.4	100
ME22	Melghir	MN134073	1,366	<i>H. borinquense</i> DSM 11551 (ABTX01000001)	99.1	100
SB1	Sidi Bouziane	MN134059	1,360	<i>H. marismortui</i> ATCC 43049 (AY596297)	99.1	100
SB3	Sidi Bouziane	MN134057	1,359	<i>Haloarcula salaria</i> HST01-2R (FJ429317)	98.0	100
SB4	Sidi Bouziane	MN241528	1,295	<i>N. altunense</i> AJ2 (JNCS010000019)	99.5	100

Abbreviation: bp, base pair.

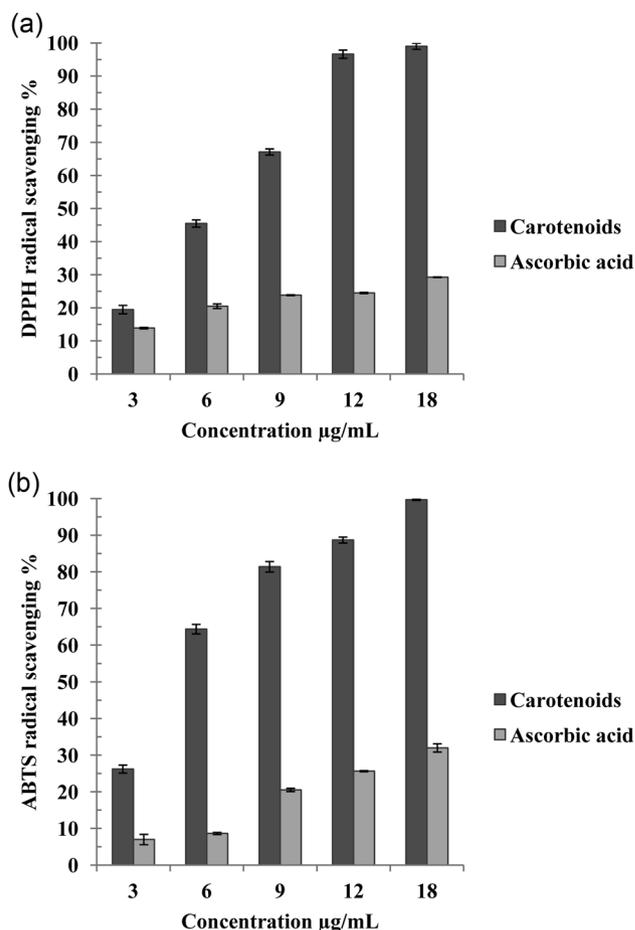


**FIGURE 2** Phylogenetic tree based on 16S ribosomal RNA gene sequences showing the position of the isolated strains (marked by black circle) with respect to other members of the class Halobacteria. The sequence of *Methanospirillum hungatei* JF-1<sup>T</sup> was used as an outgroup. GenBank accession numbers are shown in parentheses. The phylogenetic tree was constructed using MEGA7 program, based on neighbor-joining and maximum composite likelihood models with 1,000 bootstrap replications; only bootstrap values >70% are indicated. The scale bar represents 0.02 nucleotide changes per position

**TABLE 2** Characteristics of carotenoids produced by *Halorubrum* sp. BS2 determined using HPLC-DAD and LC-MS techniques

Tentative Peak identification	Retention time (min)	UV-Vis absorption maxima (nm)	Molecular ion ( $m/z$ ) M+	Fragments profile
1 BABR	12.20	463, 490, 522	705.4	673.5, 619.4, 579.1, 540.3, 487.4, 439.1, 394.5, 315.2
2 BR	12.63	468, 497, 530	741.7	681.1, 624.4, 577.4, 542.1, 504.2
3 BR	14.26	466, 494, 525	741.6	444.7, 416.4, 352.5, 322.3 723.3, 704.9, 683.5, 664.3, 625.5, 558.9, 531.2, 489.4, 457.1, 422.4, 389.2, 368.7, 328.1

Abbreviations: BABR: bisanhydrobacterioruberin; BR: bacterioruberin; HPLC-DAD: high-performance liquid chromatography-diode array detector; LC-MS, liquid chromatography-mass spectrometry.



**FIGURE 3** Radical scavenging activity of carotenoid extracts from *Halorubrum* sp. BS2 against (a) DPPH and (b) ABTS. Data are represented as mean of three replicates. ABTS, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid); DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

against *P. anguilliseptica*, *A. salmonicida*, *V. anguillarum*, *P. damsela*. The results are presented in Table 3.

### 3.9 | Effect of different culture conditions on *Halorubrum* sp. BS2 growth and carotenoid production

Results obtained for the effect of cultural conditions on the growth and carotenoid production by *Halorubrum* sp. BS2 are shown in Figure 4. The maximum growth and carotenoid contents were obtained at salinity of 25% (w/v) whereas slightly lower values were observed at 20% (w/v). The archaeon was able to grow at good rates at salinities of 15% and 30% (w/v). However, the carotenoid production was significantly decreased under these salt concentrations. Growth and carotenoid content were greatly influenced by the agitation rate; they increased remarkably with increasing agitation speed and the

**TABLE 3** Diameter of inhibition zone (mm) of carotenoid extracts from *Halorubrum* sp. BS2

Test strain	Human-pathogenic strains				Fish-pathogenic strains			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>	<i>Photobacterium damsela</i>
Carotenoid extract	13.66 ± 1.52	15 ± 2.64	15.33 ± 1.52	15.66 ± 2.08	3 ± 1	0.33 ± 0.57	3.4 ± 0.7	1.5 ± 0.7
Gentamicin	25 ± 0.0	21 ± 0.0	13 ± 0.0	28 ± 0.0	...	...	...	...
Dicentracin	...	...	...	...	9 ± 0.0	0.1 ± 0.0	9 ± 0.0	6 ± 0.0
Negative control	0	0	0	0	0	0	0	0

Note: Data show mean ± SD from three replicates.  
Abbreviation: SD, standard deviation.

highest values were obtained at 300 rpm and little growth and pigmentation were observed in nonagitated cultures. The optimal temperature for growth and carotenoid production was 37°C but significant growth and carotenoid contents were also observed at 30°C and 42°C. Light intensity had no significant effect on growth, but it influenced the carotenoid content, which was about 66% higher in cells illuminated with light intensities of 260  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  than in cells grown in the dark.

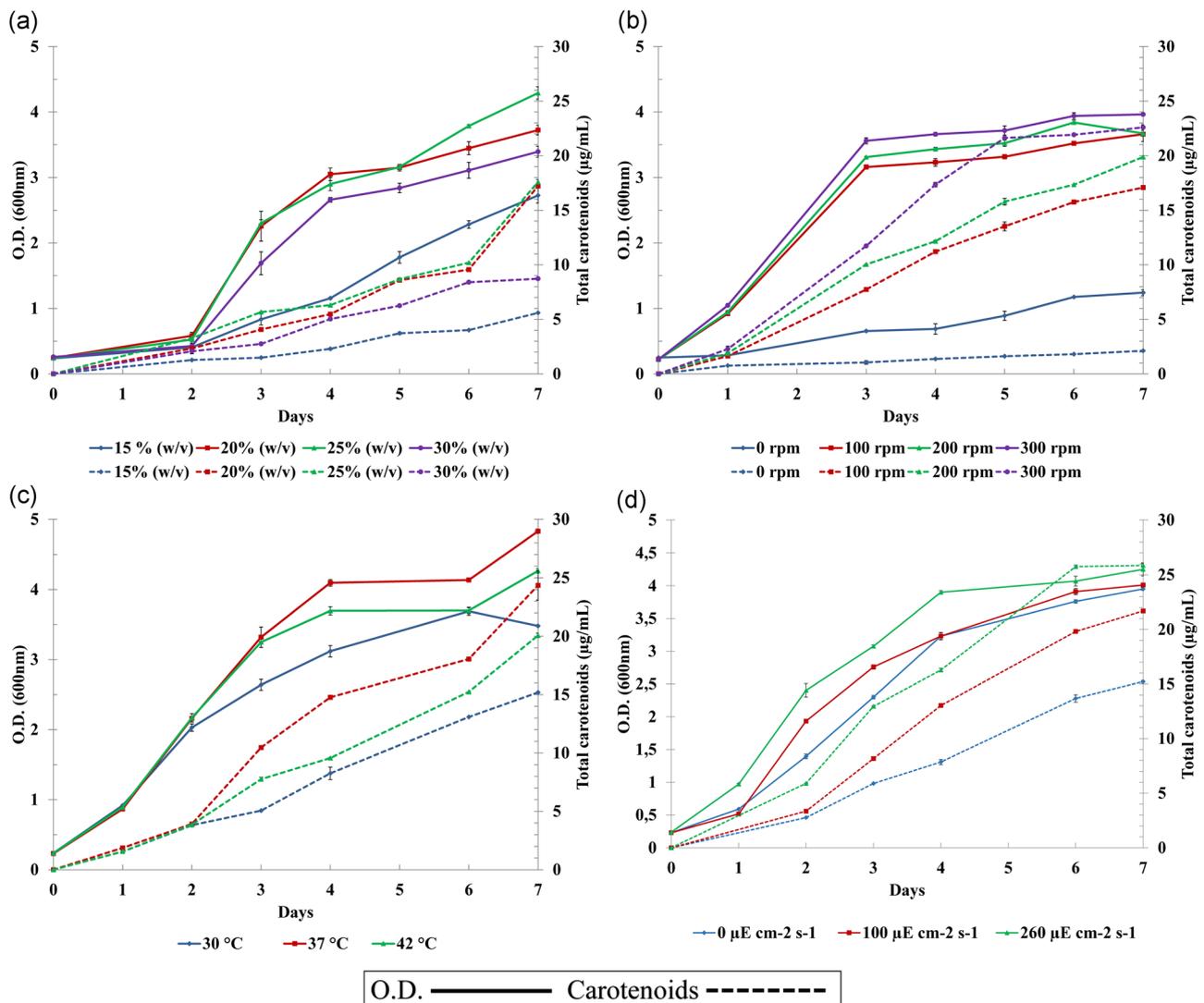
## 4 | DISCUSSION

The aim of this study was to isolate and characterize pigmented halophilic archaea from different Algerian hypersaline environments with prospecting for their carotenoids production.

Physicochemical analysis of the samples showed that sodium and chloride were the main ions, which is similar to many hypersaline environments around the world such as the Great Salt Lake (USA) [35]. The studied sites are not connected to the sea but the composition of their water is similar to that of seawater with NaCl as the main salt; therefore, they can be considered as thalassohaline [35].

Phylogenetic analysis of the selected strains showed that they were affiliated with the class Halobacteria, and were classified into 16 species representing seven genera. In general terms, the diversity of halophilic archaea found in the studied environments was similar to that reported for other hypersaline habitats [36,37]. However, the dominant groups were different. In our study, *Halorubrum* was the dominant group followed by *Haloarcula*. Such dominance was also found in other salt lakes in Spain [38], Turkey [20], and Iran [39]. The abundance of these two groups indicates that they can be more adapted to the environmental conditions compared with other groups. In contrast, Elvie Bardavid et al. [40] noted that the dominance of strains belonging to *Halorubrum* and *Haloarcula* genera is attributed to the ease with which they grow under laboratory conditions rather than to their high abundance in the system.

Enzymes from halophilic archaea offer important opportunities in many biotechnological applications since they are active and stable in saline media, where generally the structure and the function of other enzymes are critically affected [4]. Therefore, we tested 43 strains for their ability to produce hydrolytic enzymes and found that the majority of them produced at least one hydrolytic enzyme with lipase being the most common hydrolytic activity. The results were in agreement with those found in previous studies [11,37]. However, other authors reported that amylase activity was the most common [10,12].



**FIGURE 4** Growth and total carotenoids content in *Halorubrum* sp. BS2 under different (a) salt concentrations; (b) agitation rates; (c) temperatures; and (d) light intensities. OD, optical density

Halophilic archaea represent a promising natural source of carotenoids. However, there is little information in the literature about these molecules and their biological effects. In this study, we have studied carotenoids produced by *Halorubrum* sp. BS2. Bacterioruberin was the main C50 carotenoid detected, followed by its derivative bisanhydrobacterioruberin. These results are in accordance with the literature. In fact, most haloarchaea synthesize C50 carotenoids including bacterioruberin (as the most abundant C50 carotenoids in most haloarchaeal species) and its precursors (2-isopentenyl-3,4-dehydrorhodopin, bisanhydrobacterioruberin, and monoanhydrobacterioruberin) [41].

Carotenoids extracted from *Halorubrum* sp. BS2 showed high antioxidant capacity, which was much more effective than that of the standard antioxidant ascorbic acid. Similar results were found with *Haloterrigena turkmenica*,

*Halococcus morrhuae*, *Halobacterium salinarum*, *Haloquadratum walsbyi*, *Haloquadratum rubrum*, and *Haloferax volcanii*. The antioxidant capacities of carotenoids produced by these strains were important and significantly higher than the standards  $\beta$ -carotene and ascorbic acid [6,42,43]. This remarkable antioxidant capacity is related to the number of conjugated double bonds and the presence of hydroxyl groups. Bacterioruberin contains 13 conjugated double bonds and four hydroxyl groups versus the 9 conjugated double bonds and no oxygen atoms in  $\beta$ -carotene [42]. Carotenoids produced by halophilic archaea thus represent potent antioxidant agents that could benefit human health and have potential use in industrial technology [5].

Carotenoids produced by *Halorubrum* sp. BS2 were also tested for their antibacterial activity against several pathogenic bacteria for humans and for fish. To the best of our knowledge, this is the first report of the antibacterial

capacity of carotenoids produced by extremely halophilic archaea. Carotenoids in our study showed inhibitory effects against all tested strains and thus offer promising avenues for various pharmaceutical applications.

Nutritional and physical factors may influence the carotenoid synthesis by halophilic archaea. In our study, we have investigated the effect of salt concentration, agitation rate, temperature, and light intensity on the growth and carotenoid production of *Halorubrum* sp. BS2. Results showed that growth and pigment production enhance remarkably with increasing salinity, reaching the maximum values at a salinity of 25% (w/v). Similarly *Haloferax alexandrinus* TMT cultivated in media between 0% and 35% (w/v) NaCl showed higher carotenoid production at 25% (w/v) [16]. This is due to the fact that haloarchaea respond to osmotic stress by producing carotenoids. As bacterioruberin was proposed to act as cellular membrane reinforcement as it increases membrane rigidity, decreases water permeability, and allows permeability to oxygen [5].

In contrast, *H. volcanii* WFD11 and *Halobacterium* SP-2 exhibited an increase in pigmentation as salinity decreased and produced the highest pigment concentration at 15% (w/v) [44,45].

Agitation rates had the greatest effect on growth and carotenoid content in *Halorubrum* sp. BS2. Similar results were found with *Halorubrum* sp. SH1 and *Haloferax mediterranei* [46,47]. This is explained by the fact that rising agitation speed increases the oxygen transfer rate and thus provides good aeration which promotes both growth and carotenoid biosynthesis [48].

Light is important for the regulation of carotenoid synthesis in many types of microorganisms. We found that light had no significant effect on biomass concentration of *Halorubrum* sp. BS2. However, the carotenoid content increases with the increase in light intensity. Likewise, El-Sayed et al. [49] and de la Vega et al. [46] found that *H. salinarum* JCM10927 and *Halorubrum* sp. SH1 grown in light showed higher carotenoid content than when cultured in the dark. Contrastingly, *H. alexandrinus* TM and *H. mediterranei* ATCC 33500T showed no difference in pigmentation when cultivated in the absence or in the presence of light [16,47]. The observed increase in pigmentation with the increase in light intensity could be interpreted as a response to environmental stress. In fact, red carotenoids have been proposed to be cryoradiation and solar radiation protectants [50].

The present study focuses on carotenoid production by halophilic archaea inhabiting Algerian hypersaline environments (Chott and Sebkh). Some isolated strains were shown to be good producers of carotenoids as well as hydrolytic enzymes. Significant antioxidant and antibacterial activities were noted for carotenoids produced by *Halorubrum* sp. BS2, reinforcing the idea

that halophilic archaea represent a promising source of biomolecules with high biotechnological potential.

Based on 16S rRNA gene sequences, some strains exhibited  $\leq 97\%$  similarity with their closest relatives and might possibly constitute the basis for the description of a new haloarchaeal taxon in future work using a more complete polyphasic analysis.

## ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Aouchiche Fouzia from the national company of salt for helping us to collect and analyze the samples. This study was supported by the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research, European Research Grant (INTERREG VA POCTEP-055 ALGARED\_PLUS\_5E) and the group (VIGROB-016) Universidad de Alicante.

## CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that there are no conflict of interests.

## ORCID

Mohamed A. Gomri  <http://orcid.org/0000-0003-0347-3412>

## REFERENCES

- [1] Rich VI, Maier RM. Aquatic environments. In: Pepper IL, Gerba CP, Gentry TJ, editors. Environmental microbiology. 3rd ed. San Diego, CA: Academic Press; 2015. p. 111-38.
- [2] Oren A. Diversity of halophiles. In: Horikoshi K, editor. Extremophiles handbook. Tokyo, Japan: Springer; 2011. p. 309-25.
- [3] Oren A. Approaches toward the study of halophilic microorganisms in their natural environments: who are they and what are they doing? In: Vreeland RH, editor. Advances in understanding the biology of halophilic microorganisms. Dordrecht, the Netherlands: Springer; 2012. p. 1-33.
- [4] Kumar V, Tiwari SK. Halocin diversity among halophilic Archaea and their applications. In: Satyanarayana T, Johri BN, Das SK, editors. Microbial diversity in ecosystem sustainability and biotechnological applications: volume 1 microbial diversity in normal & extreme environments. Singapore, Singapore: Springer; 2019. p. 497-532.
- [5] Giani M, Garbayo I, Vilchez C, Martínez-Espinosa RM. Haloarchaeal carotenoids: healthy novel compounds from extreme environments. Mar Drugs. 2019;17:524.
- [6] Hou J, Cui H-L. In vitro antioxidant, antihemolytic, and anticancer activity of the carotenoids from halophilic Archaea. Curr Microbiol. 2017;75:266-71.
- [7] Demnati F, Samraoui B, Allache F, Sandoz A, Ernoul L. A literature review of Algerian salt lakes: values, threats and implications. Environ Earth Sci. 2017;76:127.
- [8] Menasria T, Monteoliva-Sánchez M, Benammar L, et al. Culturable halophilic bacteria inhabiting Algerian saline ecosystems: a source of promising features and potentialities. World J Microbiol Biotechnol. 2019;35:132.

- [9] Kebbouche-Gana S, Gana ML, Khemili S, et al. Isolation and characterization of halophilic Archaea able to produce biosurfactants. *J Ind Microbiol Biot.* 2009;36:727-38.
- [10] Kharroub K, Gomri M, Aguilera M, Monteoliva-Sánchez M. Diversity of hydrolytic enzymes in haloarchaea isolated from Algerian sabkhas. *Afr J Microbiol Res.* 2014;8:3992-4001.
- [11] Quadri I, Hassani II, l'Haridon S, Chalopin M, Hacène H, Jebbar M. Characterization and antimicrobial potential of extremely halophilic archaea isolated from hypersaline environments of the Algerian Sahara. *Microbiol Res.* 2016;186-187:119-31.
- [12] Menasria T, Aguilera M, Hocine H, et al. Diversity and bio-prospecting of extremely halophilic archaea isolated from Algerian arid and semi-arid wetland ecosystems for halophilic-active hydrolytic enzymes. *Microbiol Res.* 2018;207:289-98.
- [13] Subow N. Oceanographical tables. Moscow: Commissariat of Agriculture of USSR; 1931.
- [14] Dyll-Smith M. The halohandbook: protocols for haloarchaeal genetics. Melbourne: University of Melbourne; 2009.
- [15] Dussault H. An improved technique for staining red halophilic bacteria. *J Bacteriol.* 1955;70:484-5.
- [16] Asker D, Ohta Y. Production of canthaxanthin by extremely halophilic bacteria. *J Biosci Bioeng.* 1999;88:617-21.
- [17] Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H. Carotenoids: Vol.1B: spectroscopy. Basel, Switzerland: Birkhäuser-Verlag; 1995.
- [18] Oren A, Ventosa A, Grant WD. Proposed minimal standards for description of new taxa in the order Halobacteriales. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1997;47:233-8.
- [19] Montalvo-Rodriguez R, Vreeland RH, Oren A, Kessel M, Betancourt C, López-Garriga J. Halogeometricum borinquense gen. nov., sp. nov., a novel halophilic archaeon from Puerto Rico. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1998;48:1305-12.
- [20] Ozcan B, Ozcengiz G, Coleri A, Cokmus C. Diversity of halophilic Archaea from six hypersaline environments in Turkey. *J Microbiol Biotechnol.* 2007;17:745-52.
- [21] Hayward AC. Detection of gas production from glucose by heterofermentative lactic acid bacteria. *Microbiology.* 1957;16:9-15.
- [22] Elshahed MS, Savage KN, Oren A, Gutierrez MC, Ventosa A, Krumholz LR. Haloferax sulfurifontis sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a sulfide- and sulfur-rich spring. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004;54:2275-9.
- [23] Oren A, Litchfield CD. A procedure for the enrichment and isolation of Halobacterium. *FEMS Microbiol Lett.* 1999;173:353-8.
- [24] Holding AJ, Collee JG. Routine biochemical tests. In: Norris JR, Ribbons DW, editors. *Methods in microbiology.* New York, NY: Academic Press; 1971. p. 1-32.
- [25] Gutiérrez C, González C. Method for simultaneous detection of proteinase and esterase activities in extremely halophilic bacteria. *J Appl Microbiol.* 1972;24:516-7.
- [26] Frazier WC. A method for the detection of changes in gelatin due to bacteria. *J Infect Dis.* 1926;39:302-9.
- [27] López-García P, Gaill F, Moreira D. Wide bacterial diversity associated with tubes of the vent worm *Riftia pachyptila*. *Environ Microbiol.* 2002;4:204-15.
- [28] Yoon SH, Ha SM, Kwon S, et al. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2017;67:1613-7.
- [29] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994;22:4673-80.
- [30] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol.* 2016;33:1870-4.
- [31] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987;4:406-25.
- [32] Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:11030-5.
- [33] Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Hawkins Byrne D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J Food Compost Anal.* 2006;19:669-75.
- [34] Suresh M, Renugadevi B, Brammavidhya S, Iyapparaj P, Anantharaman P. Antibacterial activity of red pigment produced by *Halolactibacillus alkaliphilus* MSR1—an isolate from seaweed. *Appl Biochem Biotechnol.* 2015;176:185-95.
- [35] Oren A. Ecology of halophiles. In: Horikoshi K, editor. *Extremophiles handbook.* Tokyo, Japan: Springer; 2011. p. 343-61.
- [36] Luque R, González-Domenech CM, Llamas I, Quesada E, Béjar V. Diversity of culturable halophilic archaea isolated from Rambla Salada, Murcia (Spain). *Extremophiles.* 2012;16:205-13.
- [37] Rasooli M, Amoozegar MA, Akhavan Sepahy A, Babavalian H, Tebyanian H. Isolation, identification and extracellular enzymatic activity of culturable extremely halophilic archaea and bacteria of IncheBoroun Wetland. *Int Lett Nat Sci.* 2016;56:40-51.
- [38] Ochsenreiter T, Pfeifer F, Schleper C. Diversity of Archaea in hypersaline environments characterized by molecular-phylogenetic and cultivation studies. *Extremophiles.* 2002;6:267-74.
- [39] Naghoni A, Emtiazi G, Amoozegar MA, et al. Microbial diversity in the hypersaline Lake Meyghan, Iran. *Sci Rep.* 2017;7:11522.
- [40] Elevi Bardavid R, Khristo P, Oren A. Interrelationships between Dunaliella and halophilic prokaryotes in saltern crystallizer ponds. *Extremophiles.* 2008;12:5-14.
- [41] Rodrigo-Baños M, Garbayo I, Vilchez C, Bonete MJ, Martínez-Espinosa RM. Carotenoids from Haloarchaea and their potential in biotechnology. *Mar Drugs.* 2015;13:5508-32.
- [42] Mandelli F, Miranda VS, Rodrigues E, Mercadante AZ. Identification of carotenoids with high antioxidant capacity produced by extremophile microorganisms. *World J Microbiol Biotechnol.* 2012;28:1781-90.
- [43] Squillaci G, Parrella R, Carbone V, Minasi P, La Cara F, Morana A. Carotenoids from the extreme halophilic archaeon *Haloterrigena turkmenica*: identification and antioxidant activity. *Extremophiles.* 2017;21:933-45.
- [44] Bidle KA, Hanson TE, Howell K, Nannen J. HMG-CoA reductase is regulated by salinity at the level of transcription in *Haloferax volcanii*. *Extremophiles.* 2007;11:49-55.

- [45] Sui L, Liu L, Deng Y. Characterization of halophilic C<sub>50</sub> carotenoid-producing archaea isolated from solar saltworks in Bohai Bay, China. *Chin J Oceanol Limn.* 2014;32:1280-7.
- [46] de la Vega M, Sayago A, Ariza J, Barneto AG, León R. Characterization of a bacterioruberin-producing Haloarchaea isolated from the marshlands of the Odiel river in the southwest of Spain. *Biotechnol Prog.* 2016;32:592-600.
- [47] Montero-Lobato Z, Ramos-Merchante A, Fuentes J, et al. Optimization of growth and carotenoid production by *Haloferax mediterranei* using response surface methodology. *Mar Drugs.* 2018;16:372.
- [48] Calegari-Santos R, Diogo RA, Fontana JD, Bonfim TM. Carotenoid production by halophilic Archaea under different culture conditions. *Curr Microbiol.* 2016;72:641-51.
- [49] El-Sayed WS, Takaichi S, Saida H, et al. Effects of light and low oxygen tension on pigment biosynthesis in *Halobacterium salinarum*, revealed by a novel method to quantify both retinal and carotenoids. *Plant Cell Physiol.* 2002;43:379-83.
- [50] Silva-Castro GA, Moyo AC, Khumalo L, van Zyl LJ, Petrik LF, Trindade M. Factors influencing pigment production by

halophilic bacteria and its effect on brine evaporation rates. *Microb Biotechnol.* 2019;12:334-45.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

**How to cite this article:** Sahli K, Gomri MA, Esclapez J, et al. Bioprospecting and characterization of pigmented halophilic archaeal strains from Algerian hypersaline environments with analysis of carotenoids produced by *Halorubrum* sp. BS2. *J Basic Microbiol.* 2020;60: 624–638. <https://doi.org/10.1002/jobm.202000083>

# RÉSUMÉS

تُعتبر البُحيرات شديدة الملوحة مثلاً نموذجياً للبيئات القاسية التي تأوي نبيتاً (فلورا) ميكروبياً خاصاً يتحدى قوانين البيولوجيا و ينمو في حدود الحياة. تُهيمن العتائق المُحبّة للملوحة أو الهالواركيا على المُجتمعات الميكروبية المتواجدة في هاته البيئات. تُمثّل هذه الكائنات الدقيقة مصدراً للجزيئات الحيوية ذات الأهمية الصناعية لا سيما الأصباغ .

الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو عزل سلالات من العتائق المُحبّة للملوحة بطرق زراعية إنطلاقاً من سبعة بيئات جزائرية شديدة الملوحة. بتمّ إختيار ما مجموعه 110 عزل على أساس خصائصها المورفولوجية الإستنباتية. من هذا المجموع تم إختيار 43 عزل تُظهر مستويات عالية لإنتاج الكاروتين و/أو قدرة على النمو على مدى واسع من الملوحة، الحرارة و الحموضة لإخضاعها للوصف الظاهري و الجزيئي. أظهر تحليل تسلسل جينات الحمض النووي الريبوزومي 16S أن هذه السلالات تنتمي الى سبعة أنواع مختلفة من فئة الهالواركيا: هالوروبروم ، هالوالكورا، هالوفيراكس، ناتريناما، هالوجيوميتريكوم، هالوتيريجينا، هالوجيبار.

بعد ذلك تم إختيار سلاسل هالوروبروم اس 2، هالوالكورا اس 9، هالوفيراكس اس 16 و هالوجيوميتريكوم اس 3 لدراسة الكاروتينات الخاصة بها. أظهر التحليل الكروماتوجرافي و الطيفي للمستخلصات الكاروتينية تبايناً في التركيب على حسب السلالة مع غلبة الباكتريريوبيرين. كما أظهر تقييم قوة مُضادات الأوكسدة بإستخدام إختباري DPPH و ABTS أن هذه المُستخلصات تمتلك قدرة قوية مُضادة للأوكسدة، لا سيما تلك الموجودة في سلالات هالوروبروم اس 2 و هالوفيراكس اس 16. مما يكشف عن إمكانية جيّدة لإستعمالها في تطبيقات صناعية. تمّ أيضاً تقييم القوة المُضادة للبكتيريا لمستخلصات الكاروتين ضدّ 4 سلالات مُمرضة للإنسان و 4 سلالات مُمرضة للأسماك من خلال طريقة إنتشار الأقراص في وسط هلامي. أظهرت النتائج تمّنع المُستخلصات بنشاط مُضاد لهذه البكتيريا.

أخيراً، تمّ إختيار سلالة هالوروبروم اس 2، التي تتميّز بأعلى مُعدّل لإنتاج الكاروتينات و تتمتع بأنشطة بيولوجية هامة، لدراسة تأثير تغيّر ظروف الزرع على نموها و إنتاجها للكاروتينات. أوضحت النتائج أن أفضل مُعدّل نمو و إنتاج للكاروتينات سُجّل عند 25 % (و/ح) ملوحة، تحت سرعة دوران 300 دورة/د، عند درجة حرارة 37 مئوية و تحت إضاءة تُقدّر ب 260 ميكروأنشتاين/متر/ثانية.

Hypersaline lakes constitute a typical example of extreme environments harboring a particular microbial flora, which defies the laws of biology and thrives at the limits of life. Extremely halophilic archaea or haloarchaea dominate the microbial communities found in these environments. These microorganisms represent a deposit of natural resources in biomolecules of industrial interest, in particular pigments.

The main objective of this thesis is to isolate extremely halophilic, pigment producers archaeal strains from brine and salt samples collected from 7 different Algerian hypersaline environments. In total, 110 isolates were selected on the basis of their macroscopic morphological characters. Of this total, 43 isolates producing high levels of carotenoids and/or showing highest growth in wide salinity, temperature and pH ranges were selected for phenotypic and molecular characterization. 16S rRNA genes sequencing and analysis revealed that these strains belong to 7 different archaeal genera of the class *Halobacteria*: *Halorubrum*, *Haloracula*, *Haloferax*, *Natrinema*, *Halogeometricum*, *Haloterrigena* and *Halopiger*.

Strains *Halorubrum* sp. BS2 ; *Halogeometricum* sp. ME3 ; *Haloarcula* sp. BT9 and *Haloferax* sp. ME16 were then selected for the study of their carotenoids. Chromatographic and spectrometric analysis of carotenoid extracts revealed a variation in the composition depending on the strain with a predominance of bacterioruberin. The evaluation of antioxidant capacity using in vitro ABTS and DPPH assays showed that these extracts have a strong antioxidant potential, in particular those of *Halorubrum* sp. BS2 and *Haloferax* sp. ME16 strains, revealing thus a good potential for biotechnological applications. Antibacterial activity of carotenoid extracts against 4 human-pathogenic strains and 4 fish pathogenic strains was also evaluated by agar disk diffusion method. The obtained results showed a good antibacterial activity.

Lastly, the strain *Halorubrum* sp. BS2 which showed the highest carotenoid content and interesting biological activities was selected to study the effect of the variation in cultural conditions on its growth and carotenoid production. The results showed that the highest growth and carotenoid contents were obtained at a salinity of 25 % (w/v), under an agitation speed of 300 rpm, at a temperature of 37°C and with a light intensity of 260  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Les lacs hypersalins constituent un exemple typique d'environnements extrêmes abritant une flore microbienne particulière, qui défie les lois de la biologie et se développe aux limites de la vie. Les archaea halophiles extrêmes ou haloarchaea dominent les communautés microbiennes trouvées dans ces environnements. Ces microorganismes représentent un gisement de ressources naturelles en biomolécules à intérêt industriel, notamment les pigments.

Le principal objectif de cette étude est d'isoler par méthodes culturales des souches archéennes halophiles extrêmes productrices de pigments à partir d'échantillons de saumure et de sel provenant de 7 environnements hypersalins algériens différents. Au total 110 isolats ont été sélectionnés sur la base de leurs propriétés morphologiques macroscopiques. Sur ce total, 43 isolats présentant des taux de production de caroténoïdes élevés et/ou capables de croître dans une large gamme de salinité, de température et de pH, ont été retenus pour une caractérisation phénotypique et moléculaire. Le séquençage et l'analyse des gènes de l'ARNr 16S de ces souches a révélé leur appartenance à 7 genres archéens différents de la classe *Halobacteria* : *Halorubrum*, *Haloracula*, *Haloferax*, *Natrinema*, *Halogeometricum*, *Haloterrigena* et *Halopiger*.

Ensuite, les souches *Halorubrum* sp. BS2; *Halogeometricum* sp. ME3; *Haloarcula* sp. BT9 et *Haloferax* sp. ME16 ont été sélectionnées pour l'étude de leurs caroténoïdes. L'analyse des extraits caroténoïdiques par méthodes chromatographiques et spectrométriques a révélé une variation de la composition en fonction de la souche avec une prédominance de la bactériorubérine. L'évaluation du pouvoir antioxydant *in vitro* en utilisant les deux tests ABTS et DPPH a montré que ces extraits possèdent un fort potentiel antioxydant, en particulier ceux des souches *Halorubrum* sp. BS2 et *Haloferax* sp. ME16, révélant ainsi un bon potentiel d'applicabilité biotechnologique. Le pouvoir antibactérien des extraits caroténoïdiques contre 4 souches pathogènes pour l'être humain et 4 souches pathogènes pour les poissons a été également évalué par la méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé. Les résultats ont montré une activité antibactérienne plus au moins importante.

Enfin, la souche *Halorubrum* sp. BS2, ayant le taux de production de caroténoïdes le plus élevé et présentant des activités biologiques intéressantes, a été sélectionnée pour étudier l'effet de la variation de certaines conditions physico-chimiques de culture sur sa croissance et sa production de caroténoïdes. Les résultats ont révélé que le taux de croissance et la teneur en caroténoïdes sont meilleurs à une salinité de 25 % (p/v), sous une agitation de 300 tpm, à une température de 37 °C et sous une illumination de 260  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

---

**Mots clés :** *Archaea* halophiles extrêmes, environnements hypersalins, Algérie, caroténoïdes, caractérisation.