

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche**  
**Université Mentouri - Constantine**  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département des Sciences de la Nature et de la Vie**

N° d'ordre : 79 / T.E / 2007

Série : 04 / SN / 2007

**Thèse**

Présentée en vue de l'obtention du grade de **Docteur d'Etat**  
**Spécialité : Microbiologie et Biologie Moléculaire**

Sujet de thèse:

**Identification et étude moléculaire des bactéries et des archéobactéries  
aérobies halophiles de la sebkha Ezzemoul (Ain M'Lila)**

Présentée par

**KHARROUB KARIMA**

Soutenue le : 09 / 09 / 2007 devant le jury composé de :

<b>Président :</b>	<b>BENGUEDOUAR Ammar</b>	Prof., Uni. Mentouri- Constantine
<b>Rapporteur :</b>	<b>BOULAHROUF Abderrahmane</b>	Prof., Uni Mentouri- Constantine
<b>Examineurs :</b>	<b>KARAM Nour-Eddine</b>	Prof., Uni. Sénia- Oran
	<b>GUECHI El hedi</b>	Prof., Uni. Ferhat Abbas- Sétif
	<b>AGLI Nasser</b>	Prof., Uni. Mentouri- Constantine
	<b>HAMIDECHI Abdelhafid</b>	M. C., Uni. Mentouri-Constantine

## Sommaire

	Pages
<b>Résumés</b>	
<b>Remerciements</b>	
<b>Avant-propos</b>	
<b>Listes des figures</b>	
<b>Listes des tableaux</b>	
<b>Listes des annexes</b>	
<b>Listes des abréviations</b>	
<b><i>Introduction générale</i></b>	<b>1</b>
<b><i>Revue bibliographique</i></b>	<b>4</b>
<b>1. Environnements hypersalins</b>	<b>4</b>
1. 1. Généralités	4
1. 2. Caractéristiques physico-chimiques des environnements hypersalins	6
1. 3. Diversité phylogénétique des halophiles	7
1. 4. Diversité moléculaire des halophiles	11
<b>2. Adaptation moléculaire à l'halophilisme</b>	<b>13</b>
2. 1. Adaptation à la salinité par production d'osmoprotecteurs	13
2. 2. Adaptation à la salinité par accumulation de KCl	14
<b>3. Archaea halophiles extrêmes</b>	<b>16</b>
3. 1. Généralités	16
3. 2. Taxinomie	18
3. 3. Structure et physiologie	18
3. 3. 1. La paroi cellulaire	18
3. 3. 2. Les lipides et la membrane cytoplasmique	20
3. 3. 3. Flagelles, vésicules à gaz et substances de réserves	23
3. 3. 4. ARN et ribosomes	24
3. 3. 5. Métabolisme	25
3. 3. 6. Production de halocines	28
3. 3. 7. Bactériorhodopsine et photosynthèse chez les haloarchaea	28

	Pages
3. 3. 8. Gènes et biologie moléculaire	30
<b>4. Les bactéries halophiles aérobies</b>	<b>35</b>
4. 1. Généralités	35
4. 2. Taxinomie et phylogénie	36
4. 3. Physiologie	36
4. 3. 1. Concentrations ioniques internes	38
4. 3. 2. Composés organiques compatibles	38
4. 3. 3. Enzymes	40
4. 3. 4. Membrane cytoplasmique	41
4. 4. <i>Salinibacter ruber</i>	42
4. 4. 1. Généralités	42
4. 4. 2. Analyse génomique et protéomique	43
4. 4. 3. Physiologie	43
4. 4. 4. Osmoadaptation	43
4. 4. 5. Rhodopsines	44
<b>5. Biotechnologies de procaryotes halophiles</b>	<b>45</b>
<b>6. Méthodes pour décrire et accéder à la diversité microbienne</b>	<b>47</b>
6. 1. Taxinomie et définition d'espèce	47
6. 1. 1. Taxinomie phénétique	48
6. 1. 2. Taxinomie numérique	48
6. 1. 3. Taxinomie phylogénétique	48
6. 1. 4. Taxinomie mixte et consensuelle	50
6. 2. L'approche culturelle	50
6. 3. L'approche non culturelle	51
6. 3. 1. Les techniques de quantification	51
6. 3. 2. Les biomarqueurs cellulaires	51
6. 3. 3. Les acides nucléiques	52
6. 4. L'analyse phylogénétique	53
6. 4. 1. Principe fondamentale	53
6. 4. 2. L'alignement	54

	Pages
<b>7. Méthodes de reconstruction</b>	<b>54</b>
7. 1. La méthode du Neighbor-Joining (NJ) (Saitou & Nei, 1987)	55
7. 2. La méthode du maximum de parcimonie (Fitch, 1971)	55
7. 3. Méthode du maximum de vraisemblance (Felsenstein, 1981)	56
<b><i>Matériel et Méthodes</i></b>	<b>58</b>
<b>1. Echantillonnage</b>	<b>59</b>
<b>2. Isolement, purification et conservation des souches</b>	<b>60</b>
2. 1. Composition chimique des milieux de cultures utilisés	60
2. 2. Isolement	60
2. 3. Conservation des souches	60
2. 4. Souches de référence	62
<b>3. Identification des souches purifiées</b>	<b>62</b>
3. 1. Caractérisation morphologique des souches et de leurs colonies	62
3. 2. Ultrastructure interne des souches	64
3. 3. Caractérisation physiologique	64
3. 4. Caractérisation biochimique	66
3. 5. Sensibilité aux antibiotiques	66
3. 6. Chimiotaxinomie	66
3. 6. 1. Analyse des lipides polaires membranaires archéens	66
3. 6. 2. Extraction et caractérisation de la bactériorubérine	68
3. 6. 3. Analyse des acides gras membranaires bactériens	68
3. 7. Etude phylogénétique	68
3. 7. 1. Extraction de l'ADN total	68
3. 7. 2. Contrôle de la pureté et détermination de la concentration de l'ADN en solution	70
3. 7. 3. Détermination du contenu en G+C de l'ADN génomique	70
3. 7. 4. La Réaction de Polymérisation en Chaîne ou technique PCR	71
3. 7. 5. Hybridation ADN-ADN	75

	Pages
<b><i>Résultats et discussion</i></b>	<b>80</b>
<b>1. Analyse physico-chimiques des saumures de la sebkha Ezzemoul</b>	<b>81</b>
<b>2. Analyse microbienne des saumures de la sebkha Ezzemoul</b>	<b>81</b>
<b><i>Chapitre 1. Caractérisation des souches archéennes de la sebkha Ezzemoul</i></b>	
	<b>83</b>
<b>1. Morphologie des souches d'haloarchaea</b>	<b>83</b>
<b>2. Caractéristiques physiologiques des souches d'haloarchaea</b>	<b>90</b>
2. 1. Spectre salin	90
2. 2. Spectre de température et de pH	92
2. 3. Utilisation de substances organiques	96
2. 4. Production d'acides à partir de sucres et d'alcools	102
<b>3. Propriétés biochimiques des souches d'haloarchaea</b>	<b>102</b>
<b>4. Antibiogramme</b>	<b>104</b>
<b>5. Chimiotaxinomie</b>	<b>107</b>
5. 1. Analyse de lipides polaires membranaires	107
5. 2. Caractérisation de la bactériorubérine	107
<b>6. Caractérisation des acides nucléiques</b>	<b>114</b>
6. 1. Détermination du contenu en guanine et cytosine de l'ADN génomique	114
6. 2. Amplification et séquençage du gène d'ARN ribosomal 16S	116
6. 3. Discussion	122
6. 4. Hybridation ADN-ADN	134
6. 4. 1. Hybridation de la souche 5.1	134
6. 4. 2. Hybridation de la souche S1	142
6. 4. 3. Hybridation ADN de la souche S3	144
<b><i>Chapitre 2. Caractérisation des souches bactériennes de la sebkha Ezzemoul</i></b>	
	<b>147</b>

	Pages
<b>1. Morphologie des souches bactériennes</b>	<b>148</b>
<b>2. Propriétés biochimiques et caractérisation physiologique des souches bactériennes</b>	<b>151</b>
<b>3. Lipides membranaires</b>	<b>154</b>
<b>4. Caractérisation des acides nucléiques</b>	<b>155</b>
4. 1. Détermination du contenu en guanine et cytosine de l'ADN génomique	155
4. 2. Amplification et séquençage du gène de l'ARN ribosomal 16S	156
4. 3. Hybridation ADN-ADN de la souche B2	162
<b><i>Conclusion générale et Perspectives</i></b>	<b>165</b>
<b><i>Références bibliographiques</i></b>	<b>168</b>
<b><i>Annexes</i></b>	<b>194</b>

**Nom : KHARROUB**

**Date de soutenance : le 9 septembre 2007**

**Prénom : Karima**

**Titre :** Identification et étude moléculaire des bactéries et des archéobactéries aérobies halophiles de la sebkha Zzzemoul (Ain M'Lila)

### **Résumé**

Les lacs hypersalins constituent un exemple typique d'environnements extrême abritants une flore microbienne halophile qui a dû s'adapter à ces conditions. Dans ce travail des approches culturelles en combinaison avec des méthodes moléculaires ont été utilisées pour étudier les communautés microbiennes des saumures de la sebkha Ezzemoul située à Ain M'Lilla (Oum El Bouaghi). Une quarantaine de souches archéennes et bactériennes halophiles ont été isolées, purifiées et caractérisées. Les souches archéennes appartiennent à la famille des *Halobacteriaceae* de l'ordre des *Halobacteriales*. Elles sont toutes halophiles extrêmes, aérobies, à Gram négatif et mésophiles en ce qui a trait à leur température optimale de croissance ; de plus, elles sont neutrophiles. Par ailleurs, leur morphologie est caractérisée par un réel pléomorphisme. La caractérisation des lipides polaires membranaires et l'étude phylogénétique des souches les ont affiliées aux genres : *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Halobaculum*, *Halococcus*, *Haloferax*, *Halorubrum* et *Haloterrigena*. Sur la base des données phénétiques et génotypiques, une nouvelle espèce nommée *Halorubrum ezzemoulense* sp. nov. a été décrite. Les deux isolats bactériens sont des bâtonnets à Gram négatif, neutrophiles, mésophiles et aérobies. Elles ont été identifiées, respectivement, comme halophile extrême et modérée et appartiennent à la sous classe des *Gamma-Proteobacteria*. En se basant sur les résultats de notre étude taxinomique, une nouvelle espèce de bactérie halophile extrême appelée *Salicola salis* sp. nov. a notamment été décrite. Ce travail de recherche a aussi révélé une très forte dominance des souches archéennes halophiles extrêmes.

**Mots-clés :** halophile extrême, Archaea, Bacteria, haloarchaea, séquençage, hybridation ADN-ADN, sebkha, environnements hypersalins, diversité microbienne, phylogénie.

### **Membres du jury :**

Président :	BENGUEDOUAR Ammar	Prof., Uni. Mentouri- Constantine
Rapporteur :	BOULAHROUF Abderrahmane	Prof., Uni Mentouri- Constantine
Examineurs :	KARAM Nour-Eddine	Prof., Uni. Sénia- Oran
	GUECHI El hedi	Prof., Uni. Ferhat Abbas- Sétif
	AGLI Nasser	Prof., Uni. Mentouri- Constantine
	HAMIDECHI Abdelhafid	M. C., Uni. Mentouri-Constantine

## Summary

Hypersaline lakes constitute a typical example of extreme environments which shelter halophilic microbial communities adapted to this condition. In this work, we used cultural approaches in conjunction with molecular methods to investigate microbial communities of brines of Ezzemoul sabkha located in Ain M'Lila (Oum El Bouaghi). About forty strains of Archaea and Bacteria were isolated, purified and characterized.

The archaeal strains belonging to *Halobacteriaceae* family, order of *Halobacteriales*. All are extremely halophilic, aerobic, Gram-negative and mesophilic. In addition, they are neutrophilic. Their cells are pleomorphic. The characterization of polar lipid and phylogenetic study of the strains have affiliated them to the genera: *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Halobaculum*, *Halococcus*, *Haloferax*, *Halorubrum* and *Haloterrigena*. On the basis of the phenotypic and genotypic data, a novel species named *Halorubrum ezzemoulense* sp. nov. was described.

The two bacterial isolates are rod-shaped, Gram-negative, neutrophilic, mesophilic and aerobic. They are identified as extremely and moderate halophilic bacteria, respectively and belong to *Gamma-Proteobacteria*. Based on the results of our taxonomic study, a novel extremely halophilic species of bacteria named *Salicola salis* sp. nov. is particularly described. Moreover, this research work revealed that halophilic archaea strains dominate.

**Key words:** extremely halophilic, Archaea, Bacteria, haloarchaea, sequencing, hybridization DNA-DNA, sabkha, hypersaline environments, microbial diversity, phylogeny.

## **Remerciements**

*Avant toute chose, je tiens à témoigner ma gratitude :*

*au Professeur Ammar Benguedouar qui a accepté de présider ce jury  
aux Professeurs Nour-Eddine Karam, El hedi Guechi, Nacer Agli et au Docteur  
Adelhabif Hamidechi pour avoir accepté de juger cette thèse.*

*A Monsieur Abderrahmane Boulahrouf, qu'il trouve ici l'expression de toute ma gratitude,  
pour avoir accepté d'être mon Directeur de thèse.*

*Je les remercie tous pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de participer à mon jury  
de thèse.*

*Ma plus profonde reconnaissance s'adresse aux Professeurs Alberto Ramos-Cormenzana et  
Mercedes Monteoliva-Sanchez ainsi qu'à toute l'équipe du laboratoire de microbiologie de la  
Faculté de Pharmacie (Université de Grenade), pour la confiance qu'ils ont placé en moi, leur  
disponibilité, leur conseil et pour leur soutien dans les moments les plus difficiles. Merci de  
m'avoir permis de faire cette thèse.*

*Je tiens aussi à remercier le Professeur Ramon Rosselló-Mora de l'Institut Mediterrani  
d'Estudis Avançat (Université de Mallorca) de m'avoir initié à la « Fluorescent In Situ  
Hybridization » et pour ses remarques constructrices. Merci encore au Professeur Francisco  
Rodriguez-Valera de la Faculté de Pharmacie (Université d'Alicante) pour son aide.*

*Je remercie mes amis et mes collègues de l'INATAA pour arriver encore à me supporter.*

*Merci à mes sœurs et beaux frères. Clin d'œil à mes nièces et à mon cher Houssem.*

*A mon père, à qui je dois mes encouragements les plus précieux, merci d'avoir toujours eu  
confiance, et de m'accompagner aussi affectueusement. Je te dédie cette thèse.*

*Merci à toutes les personnes qui ont participé de près comme de loin aux résultats présentés  
dans cette thèse.*

## Avant-propos

Le présent ouvrage est consacré à l'étude de la communauté microbienne halophile isolée d'un type d'environnement extrême, la sebkha ezzemoul située à Ain M'Lila. La présentation des résultats décrit en premier lieu l'isolement des souches halophiles. Par la suite, chacune des souches archéennes et bactériennes est caractérisée à l'intérieur d'un chapitre. Les souches appartenant au domaine des Archaea ont été étudiées en premier, suivi des isolats du domaine des Bacteria. De plus une conclusion a été ajoutée après ces deux chapitres.

La présente étude a contribué à la découverte de deux nouvelles espèces publiées dans une revue internationale :

**Kharroub, K., Quesada, T., Ferrer, R., Fuentes, S., Aguilera, M., Boulahrouf, A. Ramos-Cormenzana, A. & Monteoliva-Sanchez, M. (2006).** *Halorubrum ezzemoulense* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from Ezzemoul sabkha, Algeria. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 1583-1588.

**Karima Kharroub, Margarita Aguilera, Terresa Quesada, José Antonio Morillo, Alberto Ramos-Cormenzana, Abderrahmane Boulahrouf & Mercedes Monteoliva-Sanchez. (2007).** *Salicola salis* sp. nov., an extremely halophilic bacterium isolated from Ezzemoul sabkha in Algeria. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 2647-2652.

Communication :

**Kharroub, K., Monteoliva-Sanchez, M., Quesada, T., Fuentes, S., Boulahrouf, A. & Ramos-Cormenzana, A. (2005).** *Halorubrum ezzemoulense* sp. nov., una nueva arquea halófila extrema aislada de la laguna Ezzemoul, Argelia. XX Congreso de la Sociedad Española de Microbiología.

## Listes des figures

	Pages
<b>Figure 1.</b> Habitats thalassohalins. Marais salants de Costa Blanca en Espagne (à droite) et à San Francisco au USA (à gauche) (Falb <i>et al.</i> , 2005)	4
<b>Figure 2.</b> Localisation d'anciens dépôts d'évaporites sur la Terre (Grant, 2004)	5
<b>Figure 3.</b> Habitats athalassohalins. Le Grand Lac Salé Utah au USA (à gauche en haut), le Lac Magadi au Kenya (à gauche en bas) et le Lac Rose Salé au Sénégal (à droite) (Falb <i>et al.</i> , 2005).	5
<b>Figure 4.</b> Arbre phylogénétique universel issu d'une analyse comparative des séquences de gènes ribosomiaux (Oren, 2002a)	8
<b>Figure 5.</b> Les différents groupes de microorganismes halophiles (Larsen, 1962)	9
<b>Figure 6.</b> Comparaison des charges de surface de protéines. TFBe de <i>Halobacterium</i> NRC-1 (protéine halophile) et Facteur d'initiation de transcription humain TFIIB (non halophile) (Kennedy <i>et al.</i> , 2001)	16
<b>Figure 7.</b> Structure du « core » des lipides membranaires des haloarchaea (Kates, 1996)	21
<b>Figure 8.</b> Structures des phospholipides des haloarchaea et comparaison à ceux des non-Archaea (Kates, 1996)	21
<b>Figure 9.</b> Structures des glycolipides caractéristiques des genres d'haloarchaea (Kates, 1996)	23
<b>Figure 10.</b> Dégradation du glucose et du fructose chez les Archaea halophiles extrêmes (Johnsen <i>et al.</i> , 2001)	26
<b>Figure 11.</b> Les sept hélices de la protéine et le rétinol (Kimura <i>et al.</i> , 1997)	29
<b>Figure 12.</b> Position phylogénétique des différents phyla bactérien (a) et archéen (b) d'après l'analyse des séquences d'ADNr 16S (méthode de Neighbor-Joining) (Hugenholtz, 2002)	57
<b>Figure 13.</b> Localisation de la sebkha Ezzemoul	58
<b>Figure 14.</b> Photo satellitaire prise par Europa Technologie en 2007	59
<b>Figure 15.</b> Photographies <i>in situ</i> de la sebkha Ezzemoul	61
<b>Figure 16.</b> Effet de la concentration de NaCl sur la production du pigment par la souche B1	83
<b>Figure 17.</b> Photomicrographies électroniques de la souche 1'2	83
<b>Figure 18.</b> Photomicrographies électroniques de la souche 5.1	84
<b>Figure 19.</b> Photomicrographies électroniques de la souche B3	86

	Pages
<b>Figure 20.</b> Photomicrographies électroniques de la souche 5-2	87
<b>Figure 21.</b> Chromatographie sur couche mince des phospholipides de <i>Halobacterium salinarum</i> DSM 3754 <sup>T</sup> (1), <i>Haloterrigena turkmenica</i> DSM 5511 <sup>T</sup> (2), <i>Halorubrum coriense</i> DSM 10384 <sup>T</sup> (3) et la souche 5.1 (4)	88 106
<b>Figure 22.</b> Chromatographie sur couche mince des phospholipides de <i>Haloterrigena turkmenica</i> DSM 5511 <sup>T</sup> (1), <i>Halorubrum coriense</i> DSM 10384 <sup>T</sup> (2), la souche S1 (3), la souche B4 (4) et la souche 4'1 (5)	106
<b>Figure 23.</b> Chromatographie sur couche mince des glycolipides de <i>Halobacterium salinarum</i> DSM 3754 <sup>T</sup> (1), <i>Haloarcula hispanica</i> DSM 4426 <sup>T</sup> (2), <i>Haloterrigena turkmenica</i> DSM 5511 <sup>T</sup> (3), <i>Halorubrum coriense</i> DSM 10284 <sup>T</sup> (4) et la souche 5.1 (5)	108
<b>Figure 24.</b> Chromatographie sur couche mince des glycolipides de <i>Haloarcula hispanica</i> DSM 4426 <sup>T</sup> (1), <i>Haloterrigena turkmenica</i> DSM 5511 <sup>T</sup> (2), <i>Halorubrum coriense</i> DSM 10284 <sup>T</sup> (3), la souche S6 (4), <i>Haloferax mediterranei</i> ATCC 33500 <sup>T</sup> (5) et la souche 4'1 (6)	108
<b>Figure 25.</b> Proportion des genres d'haloarchaea isolés selon la composition de lipides polaires	112
<b>Figure 26.</b> Spectre d'absorption de la bactériorubérine extraite de la souche S3	113
<b>Figure 27.</b> Courbe de dénaturation de l'ADN extrait de la souche S7 selon la technique de Marmur et Doty (1962)	113
<b>Figure 28.</b> Résultats de l'amplification de l'ADN ribosomal 16S des souches archéennes	116
<b>Figure 29.</b> Arbre phylogénétique basé sur le gène codant l'ARNr 16S montrant la position des souches archéennes isolées	127
<b>Figure 30.</b> Arbre phylogénétique basé sur le gène codant l'ARNr 16S montrant la position des souches affiliées au genre <i>Halorubrum</i>	131
<b>Figure 31.</b> Arbre phylogénétique basé sur le gène codant l'ARNr 16S montrant la position de la souche 5.1	133
<b>Figure 33.</b> Arbre phylogénétique basé sur le gène codant l'ARNr 16S montrant la position de la souche S1	142
<b>Figure 35.</b> Arbre phylogénétique basé sur le gène codant l'ARNr 16S montrant la position de la souche S3	145

	Pages
<b>Figure 36.</b> Photomicrographies électroniques de la souche B2	147
<b>Figure 37.</b> Photomicrographies électroniques de la souche 5-3	149
<b>Figure 38.</b> Résultats de l'amplification de l'ADNr 16S archéennes et bactériennes	156
<b>Figure 39.</b> Arbre phylogénétique basé sur le gène codant l'ARNr 16S montrant la position des souches B2 et 5-3	158

## Listes des tableaux

	Pages
<b>Tableau 1.</b> Composition ionique d'environnements thalassohalins et athalassohalins	6
<b>Tableau 3.</b> Organisation des génomes de cinq haloarchaea (Ng <i>et al.</i> , 2000 ; Baliga <i>et al.</i> , 2004 ; Falb, 2005 ; Bolhuis <i>et al.</i> , 2006)	32
<b>Tableau 6.</b> Souches de référence utilisées	63
<b>Tableau 7.</b> Spécificité et description des amorces d'amplification	72
<b>Tableau 8.</b> Mélange réactionnel	72
<b>Tableau 9.</b> Cycles employés	73
<b>Tableau 11.</b> Résultats de l'analyse physico-chimiques	80
<b>Tableau 12.</b> Désignation des souches isolées selon le milieu de culture utilisé	80
<b>Tableau 13.</b> Formes et dimensions cellulaires de quelques souches d'halobactéries isolées obtenues par microscopie électronique en transmission	85
<b>Tableau 14.</b> Croissance à différentes concentrations de NaCl	89
<b>Tableau 15.</b> Croissance à différentes concentrations de MgCl <sub>2</sub>	91
<b>Tableau 16.</b> Spectre de température	93
<b>Tableau 17.</b> Spectre de pH	94
<b>Tableau 18.</b> Utilisation des sucres	95
<b>Tableau 19.</b> Utilisation des alcools	97
<b>Tableau 20.</b> Utilisation des acides organiques	98
<b>Tableau 21.</b> Utilisation des acides aminés	100
<b>Tableau 22.</b> Production d'acides à partir de sucres et d'alcools	101
<b>Tableau 23.</b> Caractérisation biochimique des souches	103
<b>Tableau 24.</b> Résultats de la sensibilité aux antibiotiques	105
<b>Tableau 25.</b> Profils des lipides polaires membranaires des souches archéennes isolées et des espèces de référence	109, 111
<b>Tableau 26.</b> Valeur de Température de fusion (T <sub>m</sub> ) et du contenu en G+C des souches d'haloarchaea étudiées	115
<b>Tableau 28.</b> Affiliation phylogénétique des souches archéennes étudiées	119-121
<b>Tableau 29.</b> Caractérisation morphologique, physiologique, biochimique et génétique des souches d'halobactéries isolées de la sebkha Ezzemoul	123, 125-126
<b>Tableau 30.</b> Matrice de distances génétiques des souches archéennes calculées selon Tamura-Nei du programme Mega 3	129-130

	Pages
<b>Tableau 31.</b> Taux d'hybridations ADN-ADN de la souche 5.1 et espèces proches d' <i>Halorubrum</i>	135-136
<b>Tableau 32.</b> Caractéristiques différenciant la souche 5.1 <sup>T</sup> des autres espèces du genre <i>Halorubrum</i>	138, 141
<b>Tableau 33.</b> Taux d'hybridations ADN-ADN de la souche S1 et espèces proches d' <i>Haloarcula</i>	143
<b>Tableau 34.</b> Taux d'hybridations ADN-ADN de la souche S3 avec <i>Haloalcaliphilum atacamensis</i>	145
<b>Tableau 35.</b> Caractéristiques phénotypiques des isolats bactériens	150
<b>Tableau 35.</b> Caractéristiques phénotypiques des isolats bactériens (suite)	152-153
<b>Tableau 36.</b> Composition en acides gras membranaires de la souche B2 et espèces proches	154
<b>Tableau 37.</b> Affiliation phylogénétique des souches bactériennes étudiées	157
<b>Tableau 38.</b> Matrice de distances génétique bactériennes calculées selon Tamura-Nei du programme Mega 3	159
<b>Tableau 39.</b> Taux d'hybridations ADN-ADN de la souche B2 et espèces proches	161
<b>Tableau 40.</b> Caractéristiques de la souche B2 <sup>T</sup> et des bactéries hétérotrophes halophiles extrêmes proches	163

## Listes des annexes

**Annexe 1 :** Tableau 2. Classification des haloarchaea (Archaea, Euryarchaeota, Halobacteria, *Halobacteriales*, *Halobacteriaceae*)

**Annexe2 :** Tableau 4. Bactéries halophiles associées aux environnements hypersalins

**Annexe 3 :** Tableau 5. Composition des milieux de culture utilisés

**Annexe 4 :** Solutions révélatrices pour les lipides polaires membranaires (Kates, 1972).

**Annexe 5 :** Solutions utilisées au cours de l'extraction de l'ADN

**Annexe 6 :** Tableau 10. Origine des séquences utilisées

**Annexe 7 :** Solutions utilisées au cours de l'hybridation ADN-ADN

**Annexe 8 :** Séquences des gènes d'ARNr des souches isolées

**Annexe 9 :** Tableau 27. Caractéristiques différenciant les genres d'halobactéries

**Annexe 10.** Courbes de quantification des sondes

## Listes des abréviations

A	:	Adénine
ADN	:	acide désoxyribonucléique
ADNr 16S	:	ADN codant pour la petite sous- unité 16S de l'ARN ribosomal
ARN	:	acide ribonucléique
ARNr	:	acide ribonucléique ribosomal
ARNt	:	acide ribonucléique de transfert
ATP	:	adénosine tri-phosphate
Aw	:	activité d'eau
BET	:	bromure d'éthidium
BLAST	:	Basic Local Alignment Search Tool
BRE	:	élément de reconnaissance de TFB
C	:	Cytosine
CaCl <sub>2</sub>	:	chlorure de calcium
DAPI	:	4-6-diamidino-2-phénylindole
DGD	:	diglycosyl
DIG	:	digoxigénine
dNTP	:	désoxyribonucléotide
ddNTP	:	didé soxyribonucléotide
EDTA	:	Acide ethylenediaminotétraacétique sel disodique
ELISA	:	Enzymes Linked Immunisorbent Assay
FeCl <sub>3</sub>	:	tri-chlorure de fer
FISH	:	Fluorescent <i>in Situ</i> Hybridization
G	:	Guanine
HEPES	:	N-[2-Hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]
KCl	:	chlorure de potassium
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	:	potassium dihydrogénophosphate
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	:	sulfate de potassium
M	:	molarité
MgCl <sub>2</sub>	:	chlorure de magnésium
MOPS :	:	3-[N-morpholino] propanesulfonic acid
NaBr	:	bromure de sodium
NaCl	:	chlorure de sodium
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	:	di- sodium carbonate
NaHCO <sub>3</sub>	:	sodium hydrogénocarbonate

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	:	sodium dihydrogénophosphate
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	:	di- sodium hydrogénophosphate
NaOH	:	hydroxyle de sodium
NCBI	:	National Center for Biotechnology Information
NH <sub>4</sub> Cl	:	chlorure d'ammonium
PA	:	acide phosphatidique
PCR	:	Polymerase Chain Reaction
PG	:	phosphatidylglycérol
PGP	:	phosphatidylglycérol phosphate
PGP-Me	:	phosphatidylglycérol phosphate méthyle ester
PGS	:	phosphatidylglycérol sulfate
p/v	:	poids par volume
S-DGD	:	diglycosyl sulfate
SDS	:	Sodium Dodecyl Sulfate
S <sub>2</sub> -DGD	:	diglycosyl bisulfate
SSC:	:	sodium saline citraté
S-TeGD	:	tétraglycosyl sulfate
S-TGD	:	triglycosyl sulfate
„T„	:	souche type
T	:	Thymine
TAE	:	Tris-Acétate EDTA
TBP	:	TATA-box binding protein
TeGD	:	tétraglycosyl
TFIIB	:	transcription factor B (facteur de transcription B de type II)
TGD	:	triglycosyl
T <sub>m</sub>	:	température de fusion
Tris	:	2-amino-2-hydroxyméthyl-1, 3-propanediol
v/v	:	volume par volume

En dehors des conditions physico-chimiques « normales » la vie existe. Les organismes qui se développent dans ces biotopes « hostiles » sont globalement qualifiés d'extrêmophiles. Ils ont dû s'adapter à des valeurs extrêmes d'un ou de plusieurs paramètres physico-chimiques. On peut citer par exemple la température pour les hyperthermophiles qui croissent de manière optimale au-dessus de 80 °C, près des geysers ou près des cheminées volcaniques. A l'inverse, les psychrophiles préfèrent des températures inférieures à 15 °C. Les barophiles peuvent supporter des pressions allant jusqu'à 1000 atmosphères dans les grands fonds marins. Les halophiles se développent dans des environnements où la concentration en sels approche de la saturation. Les méthanogènes qui sont des anaérobies se rencontrent dans les aires de décomposition. Les autres paramètres physico-chimiques sont le pH, l'absence d'eau, les radiations ou un environnement chimique particulier (forte concentration en métaux, atmosphère de CO<sub>2</sub>, etc.). Mais parmi les domaines les plus étudiés de l'extrêmophilie se trouvent les hautes températures (thermophilie) ainsi que les fortes salinités (halophilie).

Les habitats hypersalés formés depuis une longue période de l'histoire de la Terre sont caractérisés par une faible diversité microbienne (Rodriguez-Valera, 1993 ; Ventosa & Nieto, 1995). Des exemples de tels environnements sont représentés par les grands lacs salés de l'Ouest américain, la Mer Morte, le Lac Rose au Sénégal, les sebkhas au Nord de l'Afrique, ou encore les marais salants en Espagne, en France, etc. La variété de microorganismes qui vivent dans ces biotopes dépend principalement de la salinité, de la solubilité de l'oxygène, de la composition ionique et, dans certains cas, de la température et du pH.

En 1878, Farlow observa la coloration rouge des conserves de poissons salés, il envisagea l'intervention probable de bactéries mais ne put les mettre en évidence. Il a fallu attendre les années 1886 puis 1891 pour que Dantee et ses collaborateurs isolèrent l'agent responsable de l'altération des poissons salés (Brisou, 1980) qui porte actuellement le nom de *Halobacterium salinarum*. Mais l'étude réelle n'a débuté qu'avec les travaux de Larsen (1962), Lanyi (1974) et Kushner (1978). Leurs publications pionnières ont été à l'origine de travaux de plus en plus nombreux qui ont permis l'isolement et la caractérisation de nouveaux genres et espèces. Cet intérêt croissant pour les microorganismes halophiles est dû au désir de connaître les limites des possibilités de la vie et ainsi d'élargir les connaissances dans le domaine de la vie dans les milieux extrêmes, de la biodiversité et de

la physiologie adaptative particulière. Outre l'aspect fondamental présenté par les nouvelles souches halophiles, ces microorganismes sont susceptibles de contenir des molécules d'intérêt biotechnologique comme les enzymes halophiles, les pigments et les solutés compatibles. La découverte de la « membrane pourpre » chez les archaea halophiles en tant que convertisseur d'énergie peut aussi avoir un intérêt industriel considérable. L'application des microorganismes dans la biodégradation des composés aromatiques et des hydrocarbures aromatiques polycycliques peut être envisagée.

La caractérisation de la microflore halophile est aussi motivée par l'acquisition de connaissances sur leur écologie car on pense que les premières formes de vie sur Mars étaient similaires aux archaea halophiles (Litchfield, 1998 ; Stan-Lotter *et al.*, 2001 ; Fendrihan *et al.*, 2006).

Ces dernières années, les études relevant, à des degrés divers, du concept de biodiversité se sont multipliées. Les analyses de diversité microbienne, *sensu* inventaire des espèces d'environnements hypersalins comme la Mer Morte, le Grand Lac salé Utah (USA), les salines et les lacs natronés, se sont notamment considérablement développées. Malheureusement peu d'études existent sur celles de nos sebkhas mise à part celle effectuée par Hacène *et al.* visant à caractériser la physiologie et la biochimie de la microflore du lac salé situé à El Goléa. C'est donc dans le but d'améliorer nos connaissances sur la biodiversité d'un écosystème extrême Algérien qu'il nous a paru nécessaire d'entreprendre cette étude. L'ensemble des études entreprises au cours de ce travail a été mené avec des objectifs multiples :

- Caractériser les isolats taxinomiquement
- Appréhender la diversité microbienne de la sebkha Ezzemoul dont la microflore n'est pas connue.
- Constituer une collection d'isolats microbiens à partir des saumures de la sebkha.

Pour répondre à ces objectifs, nous devons, essentiellement, isoler en culture pure les bactéries d'échantillons de saumures et caractériser complètement leurs morphologies, leurs physiologies, leurs caractères biochimiques, notamment la détermination du type de lipides polaires et la quantification d'acides gras membranaires. Nous effectuerons également une analyse phylogénétique par une détermination de la séquence de l'ADNr 16S, du contenu en GC et par des tests d'homologies ADN-ADN pour déterminer leur

position taxinomique exacte. Cette approche polyphasique devrait aboutir à une meilleure connaissance de la diversité microbienne de la sebkha.

La première partie de notre travail est consacrée à la description des données bibliographiques relatives à l'environnement hypersalin et aux microorganismes halophiles. Elle comprend aussi une revue de quelques techniques d'écologie microbiennes culturales et moléculaires couramment utilisées pour accéder à la diversité des écosystèmes microbiens. La deuxième partie, se focalisera sur les différentes techniques utilisées qui ont été mises en œuvre pour étudier la diversité microbienne et donc de caractériser les souches isolées. Les résultats obtenus avec ces différentes méthodes sont comparés et discutés dans la troisième partie. Enfin la dernière partie rassemblera la conclusion finale et mettra en évidence les perspectives de recherche.

## 1. Environnements hypersalins

### 1. 1. Généralités

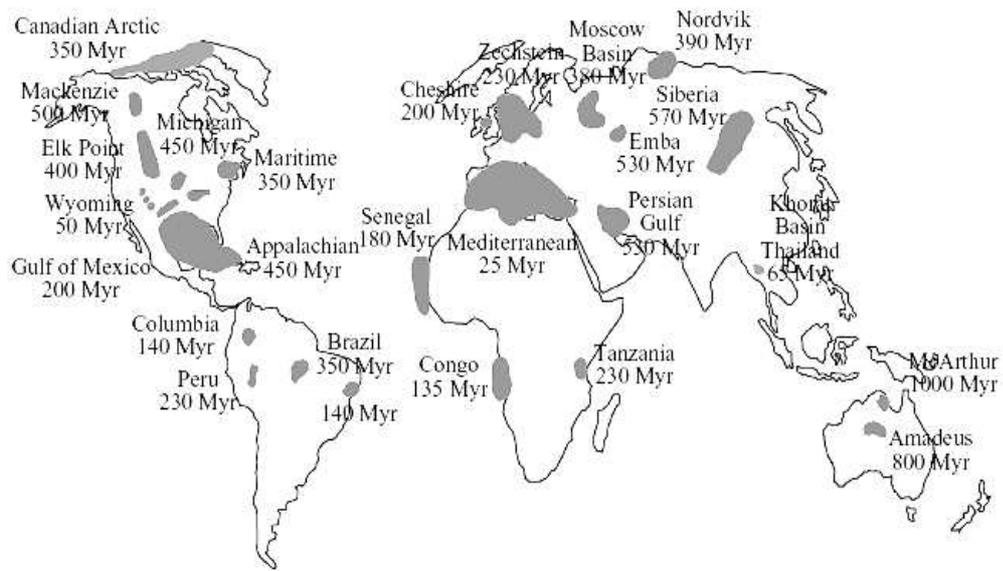
Deux types majeurs d'environnements hypersalins biologiquement importants où le facteur sel agit sur les populations microbiennes sont le sol et l'eau.

Les sols contenant une concentration en sels soluble supérieure à 0,2 % (p/v), sont considérés comme salins (Kaurichev, 1980). Ils sont fréquents en régions arides et de nombreuses plantes halophytes se sont adaptées à de telles conditions.

Les eaux sont considérées salées lorsque la salinité dépasse 0,3 % (p/v) et on définit les eaux hypersalées comme celles présentant des concentrations en sels minéraux supérieures à celle de l'eau de mer (3,3 % (p/v)) (Edgerton & Brimblecome, 1981). Cependant, cette définition n'est pas spécifique, on doit également tenir compte de l'origine et des types de sels et de leur proportion. La majorité des milieux hypersalés ont pour origine les eaux de mer et sont dites thalassohalines (Figure 1). Leurs sels minéraux sont dans les proportions semblables à celles des sels contenus dans l'eau de mer, au moins tant que les seuils de précipitation ne sont pas atteints. Des exemples de thalassohalines sont les marais salants créés dans de nombreux pays afin de produire du sel, les lacs hypersalés de l'antarctique, la sebkha Gavish près de la mer rouge, etc.



**Figure 1.** Habitats thalassohalins. Marais salants de Costa Blanca en Espagne (à droite) et à San Francisco au USA (à gauche) (Falb *et al.*, 2005).



**Figure 2.** Localisation d'anciens dépôts d'évaporite sur la Terre (Grant, 2004), (Myr, âge géologique correspondant à  $10^6$  ans).



**Figure 3.** Habitats athalassohalins. Le Grand Lac Salé Utah au USA (à gauche en haut), le Lac Magadi au Kenya (à gauche en bas) et le Lac Rose Salé au Sénégal (à droite) (Falb *et al.*, 2005 ; <http://waynesword.palomar.edu/wwstaff.htm>).

Egalement, l'eau de mer complètement évaporée est à l'origine des formations de dépôts de sels qui constituent à travers le temps des évaporites. Ces dernières sont considérées comme des environnements fossiles hypersalés et sont présents sur tous les continents (Figure 2). Leur dissolution par l'eau crée de nouveaux milieux athalassohalins comme la Mer Morte, le Grand Lac Salé Utah, le Lac Rose salé au Sénégal (Figure 3) et certaines sebkhas (Rodriguez-Valera, 1993).

Il existe également des lacs hypersalés alcalins tels que le lac Magadi au Kenya (Figure 3), le lac Wadi Natrun en Egypte (Tableau 1), le lac Mono et le lac Owens aux Etats-Unis, ayant une composition ionique différente caractérisée par une absence de cations divalents ( $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$ ).

**Tableau 1.** Composition ionique d'environnements thalassohalins et athalassohalins.

Composition ionique	Concentrations (g.l <sup>-1</sup> )					
	Lac Magadi (Kenya)	Lac Natrun Zugm (Egypte)	Grand Lac Salé Arm (USA)	Mer Morte	Mer	Bassin de cristallisation San Diego (USA)
Na <sup>+</sup>	46,0	142,0	105,4	40,1	10,6	120,0
K <sup>+</sup>	0,06	2,3	6,7	7,65	0,8	52,0
Ca <sup>2+</sup>	0,0007	0,0	0,3	17,2	0,40	3,01
Mg <sup>2+</sup>	-	0,0	11,1	44,0	1,27	14,4
Cl <sup>-</sup>	14,0	154,6	181	224,9	18,9	210,0
CO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	34,9	67,2	0,27	0,077	0,14	24,5
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	-	22,6	27,0	0,45	2,65	-
Azote total	0,038	-	4,3-7,2	-	-	-
pH	10,35	11,0	7,7	5,9-6,3	8,1	-
Références	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)

-, non déterminé. (1), Grant & Tindall (1986); (2), Larsen (1980); (3), Post (1977); (4), Beyth (1980); (5), Brock *et al.* (1994) ; (6), Javor (1983).

## 1. 2. Caractéristiques physico-chimiques des environnements hypersalins

La salinité des saumures se définit comme la somme des cations et des anions qu'il contient. Le principal sel, présent en quantité quasi inépuisable dans les mers, océans, lacs salés et aussi dans les mines de sel, est le chlorure de sodium. Mais la composition ionique des saumures varie selon l'origine ; thalassohalines ou athalassohalines (Tableau 1). La

majorité des eaux hypersalines contient 8 à 10 fois plus de sels dissous totaux que l'eau de mer (Caumette, 1998).

Quand l'eau de mer est concentrée par évaporation, tous les sels présents augmentent leurs concentrations dans les mêmes proportions jusqu'au seuil de précipitation. Les carbonates précipitent sous forme de carbonates de  $\text{Ca}^{2+}$  dès que la salinité atteint 6 % (p/v). Ensuite, le sulfate précipite et forme des dépôts de gypse (sulfate de  $\text{Ca}^{2+}$ ) dès que la salinité dépasse 10% (p/v). Au-delà de 25 % (p/v), le chlorure de  $\text{Na}^+$  commence à précipiter sous forme de halite et précipite pleinement à 34 % (p/v) (10 fois la concentration de l'eau de mer). Les eaux sont par la suite enrichies en ions  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{K}^+$  dont les sels précipitent à des salinités 20 fois supérieures à celle de l'eau de mer (Blatt *et al.*, 1980 ; Rodriguez-Valera *et al.*, 1985).

En environnement athalassohalins, en plus de l'ion  $\text{Na}^+$ , d'autres ions prédominent, comme l'ion  $\text{Mg}^{2+}$  dans la Mer Morte (Larsen, 1980). Alors que les lacs hypersalés sodés présentent une autre variation dans la composition ionique. Il y'a prédominance des carbonates et des chlorures comme anions et le  $\text{Na}^+$  comme cation (Tableau 1).

Le pH des lacs hypersalins d'origine thalassohalines est généralement proche de la neutralité ou légèrement alcalin alors que celui de la Mer Morte (origine athalassohaline) est légèrement acide (Tableau 1). La saturation des eaux due à l'évaporation réduit encore le pH et la solubilité de l'oxygène. Mais l'agitation des eaux de surfaces par le vent permet l'aération et donc la disponibilité de l'oxygène pour les microorganismes aérobies des couches superficielles (Litchfield *et al.*, 1998).

### 1. 3. Diversité phylogénétique des halophiles

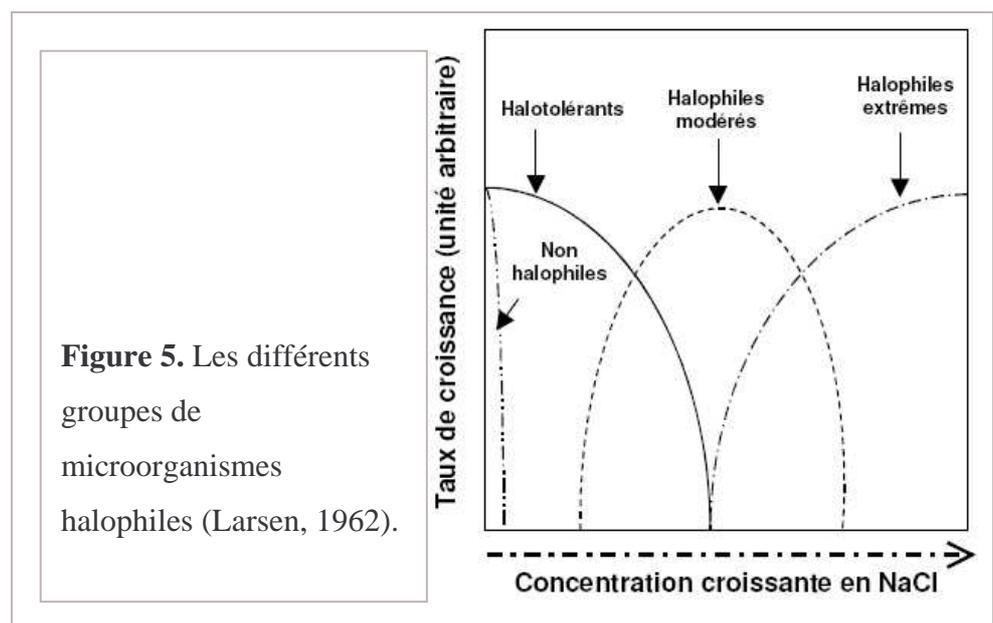
Les halophiles et les halotolérants présentent une grande diversité phylogénétique. On les trouve parmi les trois domaines du vivant : Archaea, Bacteria et Eucarya (Figure 4) (Oren, 2002a). Ils sont capables de survivre dans ces conditions extrêmes de salinité. Cette contrainte est à la base des propriétés halophiles de ces organismes et de leurs composants, qui doivent fonctionner en présence de concentrations multimolaires de sel à l'intérieur de leur cellule.



De nombreuses définitions ont été données dans la littérature pour qualifier les termes halotolérant et halophile. Elles sont basées sur la réponse de la croissance des microorganismes en présence de chlorure de sodium (NaCl).

Il est toutefois très difficile d'établir des limites qui définissent l'halophilisme et l'halotolérance car de nombreux facteurs comme la température, la concentration et la présence de certains nutriments, et ou la présence d'autres sels, modifient considérablement la réponse des bactéries au NaCl.

Le terme « halophile » désigne les microorganismes nécessitant la présence de sel (NaCl) dans le milieu pour leur croissance. En revanche, le terme « halotolérant » signifie que les microorganismes tolèrent différentes concentrations en sel durant leur croissance. Les bactéries nécessitant moins de 1 % (p/v) de sel pour une croissance optimale ne sont pas considérées comme halophiles. En 1962, Larsen a défini 3 catégories de bactéries halophiles selon la concentration en sel qui amène à une croissance optimale des microorganismes (Bertrand & Larsen, 1989). Cette concentration peut varier de 1 à 6 % (p/v) pour les bactéries faiblement halophiles, de 3 à 15 % (p/v) pour les bactéries halophiles modérées et jusqu'à 15-30 % (p/v) pour les bactéries halophiles extrêmes. Par ailleurs, les bactéries halotolérantes acceptent des concentrations modérées de sels mais non obligatoires pour leur croissance. Les domaines de croissance de ces 3 catégories d'organismes halophiles sont représentés schématiquement sur la Figure 5 (Larsen, 1962).



Dans le domaine des Eucarya, les halophiles sont plus rares. Le principal représentant des halophiles est l'algue verte *Dunaliella* qui comprend des espèces halophiles modérées (*Dunaliella viridis*, *Dunaliella parva* ...) et une espèce halophile extrême (*Dunaliella salina*). Cette algue produit le  $\beta$ -carotène responsable de la couleur orange des saumures et dont ses propriétés sont exploitées en biotechnologie (Oren, 2002b). On peut aussi citer le crustacé *Artemia*. Enfin, parmi les eucaryotes, des levures osmotolérantes (*Rhodotorula mucilaginosa* et *Pichia guilliermondii*), isolées de bassins d'évaporation croissent à 15 % de sel (Buchalo *et al.*, 1998).

Le domaine des Bacteria regroupe la plus grande diversité des halophiles, la plupart étant halophiles modérées plutôt qu'extrêmes. Elles sont ubiquistes et présentes dans un grand nombre de groupes phylogénétiques. Les bactéries les plus isolées et étudiées sont les bactéries fermentatives strictes. Elles appartiennent à deux familles *Halobacteroidaceae* et *Haloanaerobiaceae* (Oren, 1984 ; Rainey *et al.*, 1995). Des bactéries sulfato-réductrices ont également été isolées. Elles sont représentées par des halophiles modérées appartenant aux genres : *Desulfovibrio* (Krekeler *et al.*, 1997), *Desulfobacter* (Brandt & Ingvorsen, 1997), *Desulfotomaculum* (Tardy-Jacquenod *et al.*, 1998), et *Desulfohalobium*, *Desulfohalobium retbanse* (Ollivier *et al.*, 1994). Ces bactéries vivent dans les sédiments noirs, les sols hypersalés ainsi que dans les eaux salées souterraines. La famille des *Halomonadaceae* constitue probablement le groupe le plus important des bactéries hétérotrophes aérobies isolées des lacs neutrophiles et sodés (Ventosa *et al.*, 1998).

Enfin, des bactéries photosynthétiques halophiles (cyanobactéries et bactéries phototrophes anoxygéniques) ont été quelquefois isolées de la surface des sédiments de milieux hypersalés où elles forment un tapis microbien. Les cyanobactéries unicellulaires forment une couche brune à la surface des sédiments (DasSarma, 2001). Les bactéries phototrophes anoxygéniques forment une couche pourpre au dessous de celle des cyanobactéries (Caumette *et al.*, 1994 ; Sørensen *et al.*, 2004). La majorité des isolats de bactéries pourpre appartiennent aux genres *Halorhodospira*, *Roseospira*, *Halochromatium* et *Thiohalocapsa* (Guyoneaud *et al.*, 1998 ; Imhoff & Suling, 1996 ; Imhoff *et al.*, 1998a ; Imhoff *et al.*, 1998b). Des espèces alcalophiles de *Halorhodospira* et une espèce d'actinomycète halophile extrême (*Actinopolyspora halophila*) ont été isolées de nombreux lacs natronés en Afrique central et en Egypte (Johnson, 1986).

Au sein des Archaea, la famille des *Halobacteriaceae* comprend les halophiles extrêmes aérobies. On les trouve dans la Mer Morte, les marais salants et les lacs alcalins hypersalins. Aux fortes salinités, les halobactéries dominantes colorent les lacs hypersalés en rouge. Cette couleur est due à un pigment de type caroténoïde ( $\alpha$ -bactériorubérine C<sub>50</sub>), localisé au niveau de la membrane cellulaire. Ce pigment protège la cellule de la photooxydation (Wu *et al.*, 1983 ; Litchfield, 1998) et augmente la température ambiante par absorption des radiations lumineuses et donc l'évaporation (Jones *et al.*, 1981). Les haloarchaea sont considérées comme des thermophiles modérées (Juez, 2004). En 1969, Lefond a noté que lors de la précipitation de NaCl, la majorité des haloarchaea piégées à l'intérieur des inclusions de fluides sont restées mobiles pendant quelques semaines et viables pendant quelques mois (McGenity *et al.*, 2000). Ce phénomène a été également observé dans d'autres marais salants (Norton & Grant, 1988 ; Castanier *et al.*, 1999). Par ailleurs, il est trouvé que la présence des haloarchaea affecte la cristallisation en augmentant la taille et le nombre des cristaux (Lopez-Cortes *et al.*, 1994) et accélère aussi leur formation (Norton & Grant, 1988).

Egalement, la branche méthanogène des Euryarchaeota contient des halophiles dont l'activité méthanogène est possible à des seuils proches de la saturation en NaCl : *Methanohalophilus*, *Methanohalobium* et *Methanospirillum* (Kamekura, 1998 ; DasSarma, 2001).

#### 1. 4. Diversité moléculaire des halophiles

L'analyse de la distribution des microorganismes au sein des environnements hypersalés par les techniques de la biologie moléculaires disponibles comme celles utilisant des sondes oligonucléotidiques fluorescentes (Fluorescent *In Situ* Hybridization : FISH) (Amann *et al.*, 1992, 1997 ; Antón *et al.*, 1999) ou encore l'isolement direct de gènes de l'habitat ont permis aussi d'identifier et de décrire phylogénétiquement les procaryotes halophiles qui ne peuvent être isolés ou cultivés au laboratoire (Rodriguez-Valera *et al.*, 1999 ; Gabor *et al.*, 2003).

Les marais salants ou salines, dans lesquels l'énergie solaire est employée afin d'évaporer l'eau de mer et de récolter le sel, représentent un écosystème passionnant pour l'étude des halophiles. En effet la salinité dans les marais salants recouvre toute la gamme de salinités,

depuis celle de l'eau de mer jusqu'à la saturation en NaCl et parfois au-delà, dans le cas où on cherche à précipiter les chlorures de potassium, magnésium, lithium et bore.

La diversité moléculaire des salines, déterminée par une culture classique combinée à une analyse phylogénétique des ADNr 16S a montré que les clones majeurs d'archaea halophiles extrêmes et des bactéries halophiles présents dans cet habitat, n'ont aucun représentant cultivable (Benlloch *et al.*, 1995, 2001 ; Ochsenreiter *et al.*, 2002). Elles ont également révélé une énorme diversité, jusqu'alors inédite, car non représentée dans les seuls organismes cultivés.

Par la suite, d'autres études ont montré que la biodiversité des Bacteria des bassins diminuait lorsque la salinité augmentait (Rodriguez-Valera *et al.*, 1985 ; Benlloch *et al.*, 1995 ; Casamayor *et al.*, 2002) et que les communautés bactériennes des bassins de moindre densité (< 14 % (p/v) de sel) n'avaient que 30 % de similarité avec celles des bassins de concentration (21 % (p/v) de sel), les communautés de ces derniers ne présentent aucune similarité avec celles des bassins de cristallisation (30 % (p/v) de sel) (Benlloch *et al.*, 1996, 2002). Cependant ces remarques sont à nuancer au vu des résultats sur les communautés Archaea qui sont hautement similaires entre les bassins de concentration et les bassins de cristallisation, et qui par ailleurs se révèlent stables dans le temps. Par ailleurs, aucune Archaea n'a pu être amplifiée à des salinités inférieures à 13 % (p/v) de NaCl et les communautés microbiennes ne présentent que 50 % de similarité entre les bassins de cristallisation espagnol et un autre situé en Israël (Benlloch *et al.*, 2002). Dans les bassins de cristallisation, la diversité des Archaea apparaît très faible, avec un phylotype SphT non cultivable (pour Susana phylotype) (Antón *et al.*, 1999 ; Benlloch *et al.*, 2002) et par un procaryote carré pourvu de vésicules à gaz, décrit par Walsby en 1980 après une observation microscopique des saumures collectées au niveau de la sebkha du golfe Eilat de la péninsule de Sinäi. Ils semblaient également être la composante majoritaire de la microflore présente dans de nombreux environnements thalassohalins et athalassohalins en Australie (Burns *et al.*, 2004a), au Chili (Demergasso, 2004), au Pérou (Maturrano *et al.*, 2006a) et des lacs natronés en Afrique (Grant *et al.*, 1999). La combinaison de différentes techniques telles que la réaction de polymérisation en chaîne (Oren, 1994), la FISH (Benlloch *et al.*, 1995), l'analyse des lipides membranaires (Oren *et al.*, 1996) et l'observation microscopique (Stoeckenius, 1981 ; Kessel & Cohen, 1982) ont reconnu le procaryote carré comme une haloarchaea, classé dans le groupe SHOW (pour « Square Haloarchaea of Walsby ») (Bolhuis *et al.*, 2004 ; Burns *et al.*, 2004b).

Antón *et al.* (2000) ont par la suite identifié un nouveau genre halophile extrême dénommé *Salinibacter* affilié au groupe des *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* et pouvant constituer jusqu'à 25 % de la biomasse des bassins les plus concentrés des marais salants en Espagne. Il est responsable de 5 % dans le développement de la couleur rouge des saumures (Oren & Rodriguez-Valera, 2001), dû à la présence d'un pigment de type caroténoïde C<sub>40</sub>, la salinixanthine (Oren, 2002c).

Les lacs alcalins ont aussi fait l'objet d'analyses multiples. Il s'agit d'un type particulier de lac salé, contenant entre autres sels une grande quantité de carbonates et bicarbonates de sodium (Sorokin & Kuenen, 2005). Duckworth *et al.* (1996), ont ainsi mis en évidence des  $\gamma$ -*Proteobacteria* du genre *Halomonas* ainsi que des Actinobacteria et des Firmicutes au sein de six lacs situés au Kenya et en Tanzanie. Des archaea haloalcalophiles appartenant aux genres *Natronobacterium*, *Natronococcus*, *Natrialba*, *Natrinema*, *Natronomonas*, *Natronorubrum* et *Halalkalicoccus* ont aussi été mises en évidence dans ces mêmes lacs. Ces derniers présentent une faible diversité qui peut s'expliquer par la difficulté d'adaptation des microorganismes à la double contrainte du sel et du pH alcalin.

## 2. Adaptation moléculaire à l'halophilisme

Dans la nature il est extrêmement rare de trouver un habitat composé d'une seule espèce ou lignée cellulaire. Différents microorganismes coexistent, interagissent entre eux et avec l'environnement qui les entoure et de ce fait même définissent la communauté. Cette dernière forme un système en constante évolution mais qui en même temps possède une certaine homéostasie qui reflète les interactions entre tous les membres de cette communauté et l'habitat qu'ils occupent (Alexander, 1997).

Aussi, la vie dans les lacs hypersalés n'est possible qu'aux prix d'une forte spécialisation qui n'est atteinte que par quelques microorganismes, capables de maintenir une pression osmotique égale à celle de l'environnement. Deux stratégies sont utilisées pour s'adapter au milieu hypersalé et donc à une faible activité d'eau (*A<sub>w</sub>*).

### 2. 1. Adaptation à la salinité par production d'osmoprotecteurs

L'exclusion du sodium et la synthèse ou l'accumulation de solutés compatibles est une réponse au stress hyperosmotique adoptée par les microorganismes Eucarya halophiles

du genre *Dunaliella*, les bactéries halophiles et halotolérantes (à l'exception des *Haloanaerobiales*), par les archaea halophiles méthanogènes (Brown, 1976 ; DasSarma, 2001) ainsi que par les trois espèces de bactéries aérobies halophiles extrêmes nouvellement décrites *Halovibrio denitrificans*, *Halospina denitrificans* (Sorokin *et al.*, 2006) et *Salicola marasensis* (Maturrano *et al.*, 2006b).

Les solutés compatibles peuvent être des sucres (saccharose, tréhalose), des dérivés de sucres (sulfotréhalose, glucosylglycérol), certains acides aminés et dérivés (proline, acide glutamique, glutamine, acide  $\gamma$ -aminobutyrique, glycine bêtaïne), éctoïne et dérivés et des polyalcools (glycérol, arabitol, mannitol). L'osmoprotecteur le plus fréquemment observé est la glycine bêtaïne (Courtenay *et al.*, 2000). Il est utilisé par de nombreux microorganismes halophiles et halotolérants telles que les cyanobactéries, les bactéries aérobies hétérotrophes et les archaea méthanogènes. Il a également été détecté chez quelques bactéries pourpres (Imhoff, 1988) et bactéries fermentaires (DasSarma, 2001). La plupart de ces bactéries accumulent la glycine bêtaïne par absorption active, mais certaines sont capables de synthèse comme les bactéries pourpre et les bactéries sulfato-réductrices (Welsh *et al.*, 1996).

Les levures, les moisissures et les microorganismes eucaryotes halophiles du genre *Dunaliella* accumulent des polyalcools et spécialement du glycérol qui est un des principaux produit de la photosynthèse (DasSarma, 2001). Les disaccharides sont utilisés par certaines cyanobactéries (Mackay *et al.*, 1984). Cependant, les disaccharides et les acides aminés possèdent des potentialités limitées en tant qu'osmoprotecteurs (Oren, 2002b). Les voies de biosynthèse des solutés organiques, à l'exception de celle de la glycine bêtaïne, dérivent de la synthèse du glutamate et de l'aspartate (Caumette, 1998). Le mode d'action des osmoprotecteurs est loin d'être clair. Ils pourraient n'être simplement que des solutés compatibles inoffensifs, ou au contraire, ils pourraient jouer un rôle protecteur actif interagissant avec les protéines et les protègent de cette façon de l'action destructrice due à l'osmolarité (Papageorgion & Murata, 1995 ; Welsh, 2000). Aussi leur présence dans le cytoplasme n'exige pas une adaptation particulière des protéines cellulaires.

## 2. 2. Adaptation à la salinité par accumulation de KCl

La seconde stratégie est adoptée par des groupes phylogénétiquement différents : *Halobacteriales*, bactéries halophiles anaérobies de l'ordre des *Haloanerobiales* et par la bactérie aérobie *Salinibacter ruber*.

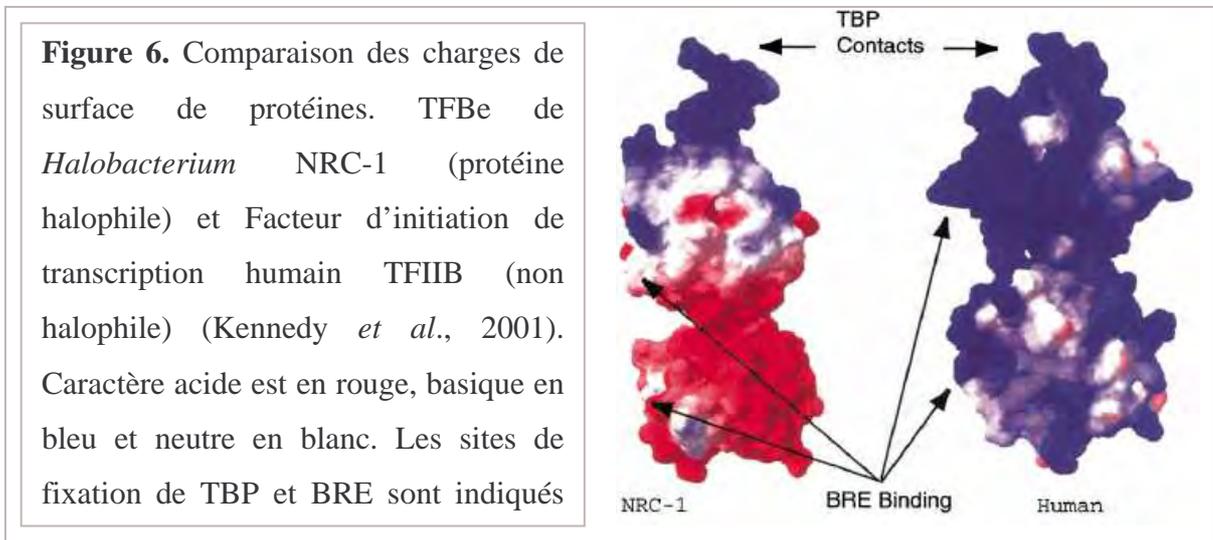
Ils accumulent essentiellement du KCl (Christian & Waltho, 1962 ; Lanyi, 1974 ; Kushner, 1978 ; Tindall & Trüper, 1986 ; Oren, 1999a ; Oren *et al.*, 2002a ; Grant, 2004). Une concentration en ion  $K^+$  de 5,0 M a été mesurée chez *Halobacterium* lorsque la croissance a lieu à 4,0 M en ion  $Na^+$  (Christian & Waltho, 1962 ; Grant *et al.*, 2001). Cependant, il est trouvé que chez les membres alcalophiles, il y'a accumulation également du 2-sulfotrèhalose (Desmarais *et al.*, 1997). L'exclusion du  $Na^+$  du cytoplasme se fait grâce à un antiport  $Na^+/H^+$ , localisé au niveau de la membrane cytoplasmique (Oren, 2001). Généralement, les ions  $K^+$  entrent passivement via un système uniport sous l'impulsion du potentiel de membrane. Ce système revient à remplacer une partie du sodium cellulaire par du potassium. Des systèmes multiples de transport actif des ions  $K^+$  ont également été détectés dans le génome de *Halobacterium* sp. NRC-1 (Oren, 2001a).

L'afflux des cations doit être compensé par un nombre équivalent d'anions. Le mouvement d'anions tel que le chlorure est couplé à l'énergie du potentiel de membrane. Il pénètre grâce à un symport  $Na^+/Cl^-$ . L'illumination des membranes actionne également une pompe qui fait entrer les ions  $Cl^-$  dans la cellule. Cette fonction revient à une nouvelle protéine contenant du rétinol appelé halorhodopsine. Cette protéine accomplit son cycle en poussant vers l'intérieur de la cellule des ions  $Cl^-$  contre le gradient de charges existant (Oesterhelt, 1995).

Les organismes accumulant dans leur cytoplasme de fortes quantités de sel, principalement du KCl se soumettent à un nouveau stress cellulaire : le stress salin. Cependant, ces organismes ne semblent pas connaître ce stress, leurs protéines sont non seulement solubles et fonctionnelles (stables, actives et flexibles) à de telles salinités, mais en plus, elles se dénaturent dès que la concentration en KCl diminue en dessous de 1,0 à 2,0 M. Elles sont en ce sens qualifiées de protéines halophiles (Brown-Peterson & Salin, 1994 ; Madern *et al.*, 2000).

Une des questions les plus intéressantes serait de découvrir la base moléculaire de la stabilité des protéines halophiles à des concentrations de sel élevées car cela pourra élucider les mécanismes d'adaptation en général. La malate déshydrogénase, une enzyme

produite par *Haloarcula marismortui* est la plus étudiée de toutes les protéines halophiles. Elle contient plus de résidus acides (aspartate et glutamate) et moins de résidus basiques (lysine) que son homologue non halophile, mais aussi plus de petits résidus hydrophobes (alanine, glycine et valine) et peu de résidus aliphatiques (Lanyi, 1974 ; Madern *et al.*, 1995 ; Ebel *et al.* ; 1999, Madern *et al.*, 2000 ; Oren & Mana, 2002). Ces groupements d'acides aminés acides sont connus pour interagir fortement avec les molécules d'eau et les ions positifs comme le  $K^+$  (Hough & Danson, 1999). D'autres cations et anions peuvent également contribuer dans la stabilisation, et particulièrement les ions divalents tels que le  $Mg^{2+}$  (Lanyi, 1974, Madern *et al.*, 2000). L'accumulation de résidus acides est donc un mécanisme d'adaptation aux fortes concentrations de sels (Figure 6).



### 3. Archaea halophiles extrêmes

#### 3. 1. Généralités

En 1977, un des étudiants de Woese (G. E. Fox) découvrit, chez les organismes méthanogènes d'organisation cellulaire procaryote, un nouveau type de profil d'ARNr 16S ne pouvant être assimilé ni à un profil bactérien, ni à profil eucaryote (ARNr 18S) (Woese & Fox, 1977). Il venait de caractériser un groupe d'organismes aussi éloigné des Eucarya et des Bacteria que ne peuvent l'être ces deux derniers groupes entre eux. D'abord prénommé Archéobactéries, car ces organismes semblaient archaïques, ce groupe fut ensuite appelé Archaea (Woese *et al.*, 1990).

C'est un groupe de procaryotes atypiques dont certains se sont fait remarquer par leur capacité à vivre dans des conditions dites extrêmes (pH, température, salinité, etc.). En fait, il existe beaucoup d'Archaea qui vivent dans des conditions plus «normales» tout autour de nous (les Archaea non cultivables du sol, des lacs et de l'océan), et même en nous (les méthanogènes de nos intestins) (Schleper, 1999). Les archaea sont considérées comme non pathogènes (Cavicchioli *et al.*, 2003). Ce qui les distingue de tous les autres organismes, c'est leur biologie moléculaire et leur biochimie, différentes à la fois des Bacteria et des Eucarya, en particulier, la structure des lipides polaires (Kates, 1972). Les mécanismes informationnels ressemblant beaucoup plus aux nôtres qu'à ceux des bactéries (Forterre, 1997 ; Olsen et Woese, 1997). D'un point de vue phylogénique, le domaine des Archaea est divisé en trois règnes :

- ✓ Les Crenarchaeota qui regroupent les organismes les plus thermophiles, les *Thermoproteales*, les *Pyrodictiales* et les *Sulfolobales* métabolisant le soufre comme source d'énergie.
  
- ✓ Les Korarchaeota renferment les organismes isolés de sources chaudes mais aucune souche n'a été isolée en culture pure.
  
- ✓ Les Euryarchaeota (appelées auparavant Eocytes) regroupent les phénotypes variés, *Thermococcales*, les *Methanococcales*, les *Methanobacteriales* et les *Halobacteriales*.

Phylogéniquement distinct et distant des Eucarya et des Bacteria, les archaea halophiles extrêmes sont très fréquentes dans les lacs salés et les salines ou mares préparées pour l'évaporation de l'eau de mer conduisant à l'obtention de sel marin (Nuttall & Dyll-Smith, 1993 ; Montalvo-Rodriguez *et al.*, 2000 ; Asker & Ohta, 2002). Elles ont été isolées des dépôts de sel du Permien et du Triasique (Stan-Lotter *et al.*, 1993, 1999, 2000), des mines de sel (Norton *et al.*, 1993 ; Denner *et al.*, 1994 ; McGenity *et al.*, 2000 ; Stan-Lotter *et al.*, 2001, 2002). Elles peuplent aussi les lacs hypersalés (Oren *et al.*, 1995 ; Xin *et al.*, 2000), les lacs natronés (Soliman & Trüper, 1982 ; Tindall *et al.*, 1984 ; Kanai *et al.*, 1995 ; Xu *et al.*, 2001), les sols salés (Zvyagintseva & Tarasov, 1987 ; Hezayen *et al.*, 2002) et le sable marin (Kamekura & Dyll-Smith, 1995). Les halobactéries ont été également isolées de poissons et autres aliments conservés par le sel (Petter, 1931 ; Bailey & Birbir, 1993 ; Mevarech, 2000).

Elles sont toutes halophiles et, pour la plupart, ne peuvent se développer qu'à des concentrations en NaCl supérieures à 1,5 M (Javor, 1989 ; Grant *et al.*, 2001). La plupart des espèces ont une croissance optimale à des concentrations variant de 3,5 à 4,5 M, et même proche de la saturation du NaCl (5,2 M) (Rodriguez-Valera *et al.*, 1981 ; Grant *et al.*, 2001). Certaines espèces exigent des pH élevés alors que d'autres des teneurs élevées en magnésium, ce qui reflète leur adaptabilité à leur environnement (Oren, 1994 ; Kamekura, 1999a). Bien que la physiologie des haloarchaea soit différente de celle des autres groupes d'Archaea, certains traits sont communs à la plupart des Archaea.

### **3. 2. Taxinomie**

Les termes « halobactérie ou haloarchaea » correspondent aux membres d'archaea halophiles extrêmes aérobies de la famille des *Halobacteriaceae*, de l'ordre des *Halobacteriales* formée par Grant & Larsen (1989). La connaissance des haloarchaea a commencé avec la formation de deux genres *Halobacterium* et *Halococcus*. Ils constituent un groupe monophylétique où la majorité des espèces ont des valeurs de 83,2 % de similitude des séquences d'ADNr 16S, indiquant une diversité génomique (Wright, 2006). Les méthanogènes est le groupe d'archaea le plus étroitement lié aux halobactéries (Olsen *et al.*, 1994) avec des valeurs de similitudes des séquences d'ADNr 16S de l'ordre de 80 %. La diversité phylogénique des archaea halophiles extrêmes excède de beaucoup tout ce qui a pu être envisagé il y'a à peine une quinzaine d'années. Dans la seconde édition du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 14 genres ont été décrits (Grant *et al.*, 2001). À l'heure actuelle, 23 genres existent. Mais, il est probable que la diversité des haloarchaea soit plus étendue que le nombre de genres décrits, si on considère les non cultivables. La comparaison des séquence des gènes 16S d'ARNr et l'analyse des lipides polaires membranaires sont actuellement utilisées comme clés de différenciation entre les membres des halobactéries (Kamekura, 1998, 1999b ; Kamekura *et al.*, 2004) (Tableau 2-Annexe 1).

### **3. 3. Structure et physiologie**

#### **3. 3. 1. La paroi cellulaire**

L'organisation de la paroi cellulaire des archaea halophiles extrêmes est simple. Elle ne contient ni acide muramique, ni acide diaminopimélique (Brown & Chao, 1970 ; Wieland, 1988).

La paroi de *Halococcus* est constituée par des polysaccharides. Elle est complexe, formée d'une seule couche rigide de 50 nm d'épaisseur (Kocur *et al.*, 1972) et qui n'est pas désintégrée en solutions salines diluées. Elle contient le glucose, le mannose, le galactose, la glycine, le glutamate (ou la glutamine), le glucosamine, le galactosamine (Reistad, 1972) et un acide rare, le 2-amino-2-désoxyglucuronique (Reistad, 1974). La plupart des sucres sont porteurs de groupes sulfates. L'ensemble n'est pas sans rappeler les polysaccharides du type chondroïtine sulfate trouvés dans les tissus conjonctifs des animaux (Wieland, 1988). Steber & Schleifer (1975), ont noté également la présence de sucres neutres, acide glucuronique et acide galacturonique.

La surface des halobacilles (haloarchaea de forme bacillaire) est caractérisée par un assemblage de sous unités hexagonales de glycoprotéines de 17,5 nm d'épaisseur organisées en une unique couche régulière à la surface de la cellule et liées à des groupes sulfates (Mohr & Larsen, 1963). Cette structure est appelée « couche de surface » (ou S-layer) (Sleytr & Glauert, 1982). Elle est fermement attachée à la membrane plasmique d'où absence d'espace périplasmique (Baumeister & Lembcke, 1992). Sa masse moléculaire a été estimée à 200 kDa et contient 10 à 12 % de carbohydrates (Mescher & Strominger, 1976). Les protéines contiennent un excès d'acides aminés acides chargés négativement (environ 35 % de glutamate et d'aspartate) (Werber, 1980), ce qui favorise l'hydratation de la paroi et l'augmentation de la solubilité des nutriments (Wieland, 1988). La nature acide des constituants protéiques des couches externes rend compte des besoins en cations. Selon Kushner (1964), le maintien de l'intégrité pariétale est due aux ions  $\text{Na}^+$ , à la face externe, tandis que la face interne accepte aussi bien les ions  $\text{Na}^+$  que les ions  $\text{K}^+$ . On attribue également aux ions  $\text{Na}^+$  un effet électrostatique dans la neutralisation de l'excès de charges négatives (Brown, 1976). L'exposition des haloarchaea à des solutions salines de plus en plus diluées entraîne une lyse cellulaire. Les bâtonnets donnent des sphères qui ne tardent pas à éclater lorsque la concentration en NaCl atteint 10 % (p/v).

Les S-layers sont sensibles aux détergents comme le sodium dodécylsulfate (SDS) et à l'urée. Mais les haloarchaea comme toutes les Archaea ne sont pas affectées par la

penicilline et les antibiotiques chimiquement apparentés qui interfèrent avec la synthèse de la muréine (Kushner, 1978).

La structure et la voie de biosynthèse des glycoprotéines ressemblent à celles des cellules eucaryotes ce qui a suggéré l'existence d'une origine primitive commune des cellules, avant la divergence des eucaryotes et des procaryotes (Werber, 1980).

### 3. 3. 2. Les lipides et la membrane cytoplasmique

#### ➤ Structure et composition

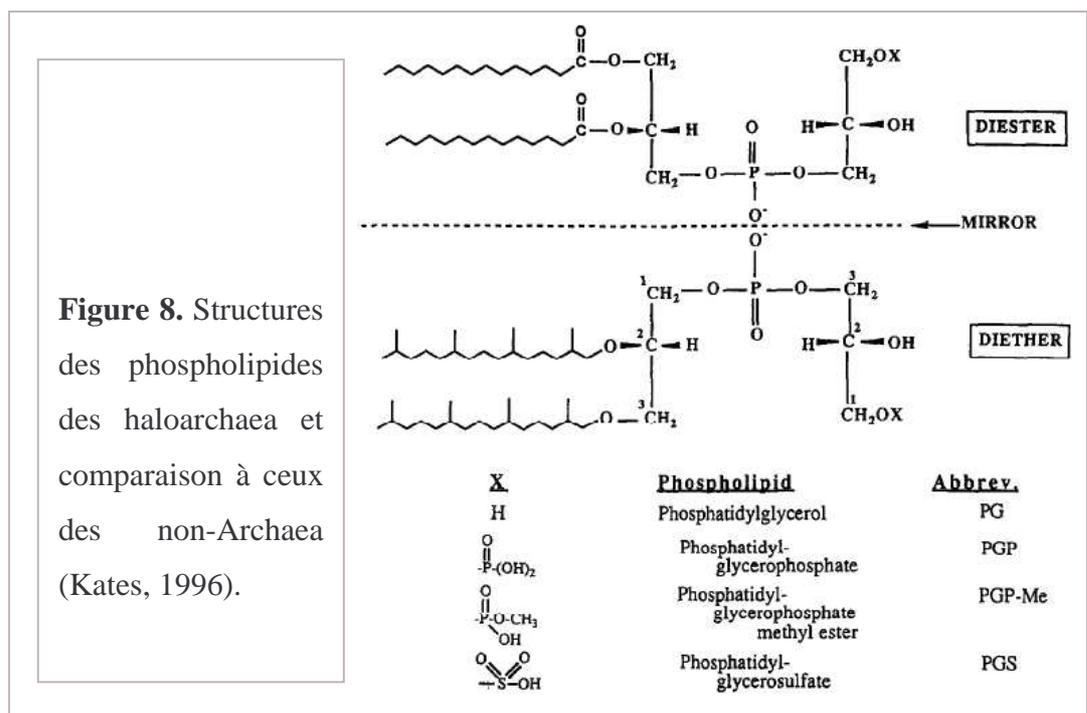
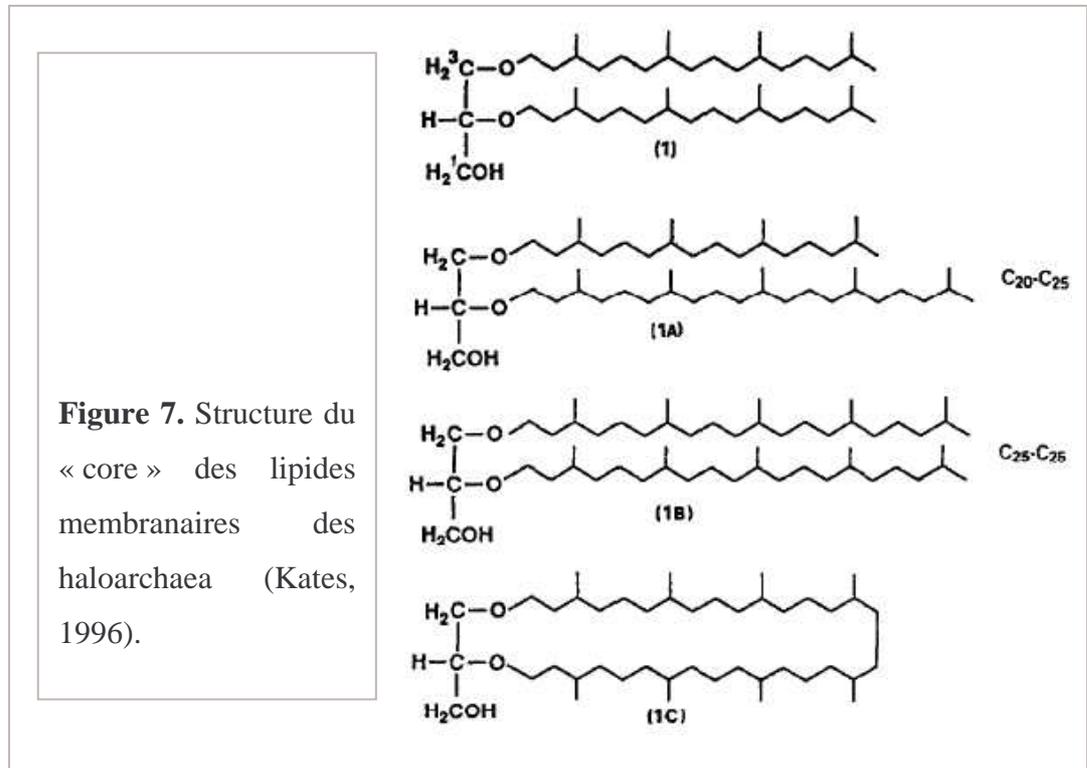
Le caractère le plus distinctif des membranes des Archaea en général, est la nature de leurs lipides. Ils diffèrent de ceux des eucaryotes et des bactéries. Ils possèdent des chaînes hydrocarbonées ramifiées liées au glycérol par des liaisons éthers plutôt que par des acides gras connectés par des liaisons esters. Les liaisons éthers sont plus résistantes que les liaisons esters à l'effet de la température, à l'oxydation et à la dégradation enzymatique.

Les lipides membranaires représentent plus de 93 % des lipides cellulaires chez *Halobacterium salinarum*, soit environ 4,0 % du poids sec cellulaire (Kamekura & Kates, 1988). Ils sont constitués par une fraction neutre de 10 % et le reste par les lipides polaires (Kates, 1978).

Les lipides neutres sont entièrement des dérivés isoprénoïdes, groupés en 4 classes; isoprénoïdes C<sub>20</sub> (géranylgéranol et rétinol), isoprénoïdes C<sub>30</sub> (squalène), isoprénoïdes C<sub>40</sub> (lycopène, néo- $\alpha$ -carotène et néo- $\beta$ -carotène), isoprénoïdes quinones de type ménaquinones et non de type ubiquinones (MK-8 et MK8H<sub>2</sub>) (Collins *et al.*, 1981) et C<sub>50</sub> (bactériorubérine) (Kamekura & Kates, 1988). Le système de biosynthèse du groupement isoprénoïde a lieu via une modification de la voie du mévalonate (Moldoveanu & Kates, 1988). Il est trouvé que chez *Halobacterium cutirubrum*, cette biosynthèse est inhibée par la bacitracine (Basinger & Olivier, 1979).

*Halobacterium salinarum* qui est capable d'effectuer une forme unique de photosynthèse possède deux types de composants de la membrane cellulaire, la membrane rouge et la membrane pourpre. La membrane rouge est le site de la respiration, et doit sa couleur

essentiellement à la présence de caroténoïdes. A basse pression d'oxygène et luminosité intense, cette espèce développe au niveau de la membrane rouge des zones de membranes pourpres. Ce type de membrane est constitué, outre de lipides, essentiellement de la protéine bactériorhodopsine.



Les lipides polaires dérivent du diacylglycérol ( $C_{20}$ -isopropanylglycérol diéther ou sn-2,3-diphytanylglycérol diéther) (Figure 7, 1) (Kates, 1978) et non du diacylglycérol (sn-1,2-diacylglycérol diester). La chaîne phytanyl  $C_{20}$  contient 4 branchements méthyles et est similaire au groupe phytol de la chlorophylle après saturation (Kates, 1984). Il existe des variétés de cette structure chez les halophiles extrêmes alcalophiles : 2-O-sesterterpanyl-3-O-phytanyl-sn-glycérol ( $C_{20}C_{25}$  diéther ou core  $C_{20}C_{25}$ ) et 2,3-di-O-sesterterpanyl-sn-glycérol ( $C_{25}C_{25}$  diéther ou core  $C_{25}C_{25}$ ) (Figure 7, 1A et 1B) (De Rosa *et al.*, 1983). Le nom «archaeol» additionné de la désignation du groupe acyl ( $C_{20}C_{25}$ ) a été introduit par Nishihara *et al.* pour désigner le diphytanylglycérol diéther (Kates, 1988a).

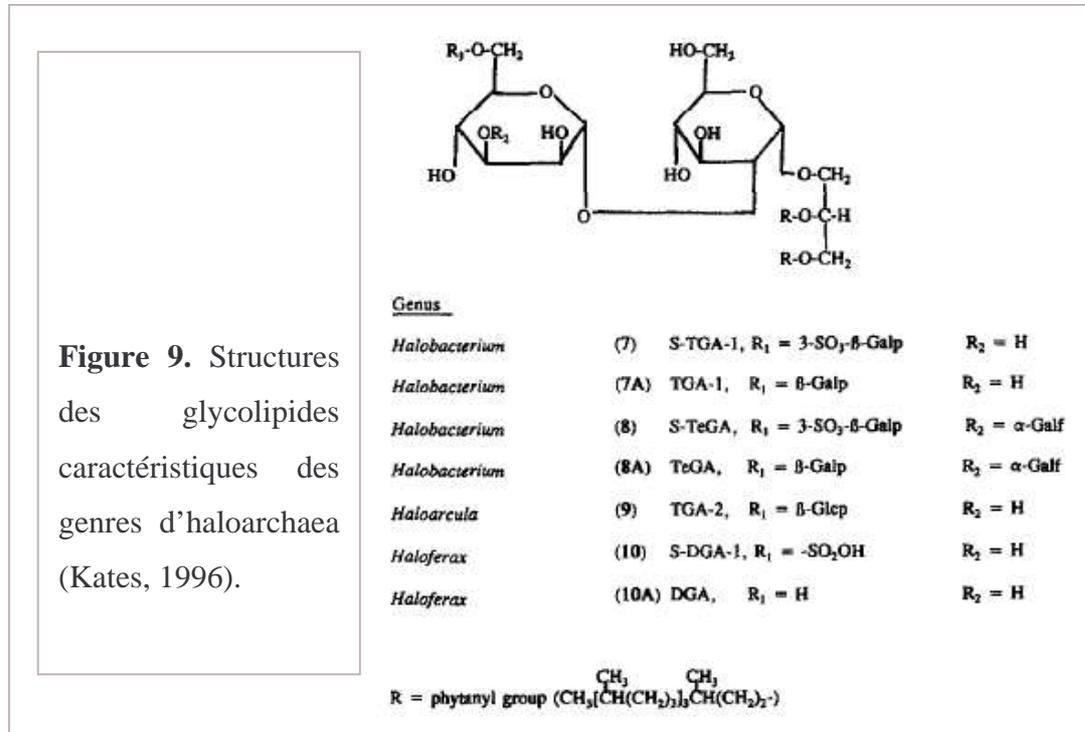
La structure des phospholipides a été établie par Kates (1978) (Figure 8) et comprend un phospholipide majeur et 3 phospholipides mineurs. Le phospholipide majeur est un archaeol analogue du phosphatidylglycérol phosphate méthyl ester (PGP-Me). Les mineurs sont identifiés comme étant des archaeol analogues de phosphatidylglycérol (PG), de phosphatidylglycérol sulfate (PGS) et d'acide phosphatidique (PA).

La comparaison des structures des phospholipides diéther avec les phospholipides normaux, a indiqué que celles des halophiles extrêmes sont les images dans un miroir de celles des autres organismes (Figure 8). Chez les Archaea en général, la molécule existe sous la forme de sn-glycérol-1-phosphate (G1P) alors que chez les bactéries et les eucaryotes sous la forme de sn-glycérol-3-phosphate (G3P) (Kates, 1978 ; Daiyasu *et al.*, 2005). Archaeol  $C_{20}C_{20}$  analogues de PGP-Me et PG sont présents chez tous les genres (Kates, 1978 ; Kates, 1993a). Les membres alcalophiles contiennent en plus, des  $C_{20}C_{25}$  diéther (Kamekura & Dyll-Smith, 1995) et  $C_{25}C_{25}$  diéther (De Rosa *et al.*, 1983).

La composition des lipides polaires et spécialement celle des glycolipides semble être corrélée avec la taxinomie au niveau du genre (Torreblanca *et al.*, 1986 ; Kates, 1993b). Leur détermination constitue un test rapide pour classer une haloarchaea (Ross & Grant, 1985 ; Tindall *et al.*, 1987).

Les glycolipides sont présents spécialement chez les membres neutrophiles (Kamekura & Kates, 1999) et comprennent un triglycosyl sulfaté (S-TGD-1) comme glycolipide majeur et de nombreux glycolipides mineurs (Figure 9) (Kates, 1978). Le groupe de glycolipides mineurs comprend un triglycosyl, archaeol galactosyl-mannosyl-glucosyl (TGD-1) ; tétraglycosyl sulfaté (S-TeGD) et sa forme désulfaté (TeGD) ; un triglycosyl, archaeol glucosyl-mannosyl-glucosyl (TGD-2) ; un diglycosyl (TGD-2) ; un diglycosyl sulfaté,

mannosyl-6-sulfate-glucosyl (S-DGD-1) et sa forme sans sulfate (DGD-1) ; un second diglycosyl sulfaté, archaeol mannosyl-2-sulfate-glucosyl (S-DGD-3) et un diglycosyl bisulfate (S<sub>2</sub>-DGD).



### 3. 3. 3. Flagelles, vésicules à gaz et substances de réserves

Le flagelle des Archaea diffère de façon marquée de celui des bactéries, tant en composition qu'en structure et en mode d'assemblage. Ainsi, le filament en lui-même (10 à 14 nm de diamètre) est beaucoup plus mince que celui des bactéries (environ 20 nm de diamètre) (Jones & Aizawa, 1991). Les flagelles bactériens tournent dans le sens opposé à celui des aiguilles d'une montre alors que la rotation se fait à droite chez *Halobacterium salinarum* (Thomas *et al.*, 2001a). Cependant, la composition en acides aminés des deux types de procaryotes est similaire, prépondérance de résidus neutres et peu de résidus basiques (Thomas *et al.*, 2001a). Les flagelles bactériens sont généralement formés d'un seul type de flagelline mais de plusieurs types chez les archaea. En outre, chez *Halobacterium salinarum* Les flagellines sont associées à des oligosaccharides sulfatés (Wieland *et al.*, 1985). Les flagelles de cette espèce sont plus résistants que ceux des

bactéries aux protéases et plus thermotolérants mais ils se dissocient rapidement en solutions faiblement salines.

La synthèse du flagelle chez les bactéries se fait par transport des sous unités de flagellines à travers le tube creux du filament (2 nm de diamètre) et s'assemblent spontanément de sorte que le filament grandit à son extrémité et non dans sa partie basale. Alors que les flagelles des archaea sont fins et ne peuvent donc permettre le cheminement des flagellines comme chez les bactéries. Par ailleurs, on a noté chez les archaea, la présence de peptide signal lié aux sous unités de pré-flagellines, ce qui suggère qu'elle passe à travers la membrane cytoplasmique. Il sera ensuite clivé par une flagelline peptidase. Cette caractéristique, et autres similarités sont observées entre le flagelle archéen et les fimbriae bactérien de type 4, font penser que, chez les archaea, le flagelle se construit à partir de la base (Thomas *et al.*, 2001a).

Quelques membres d'haloarchaea produisent également des vésicules à gaz comme certaines bactéries aquatiques (DasSarma & Arora, 1997). Ce sont des structures de forme cylindrique chez *Halobacterium salinarum* (*Halobacterium halobium*), entourée par une membrane de nature protéique de 20 Å d'épaisseur (Krantz & Ballou, 1973). Leur fonction est d'assurer la flottabilité en réponse à un besoin d'oxygène ou encore de lumière pour la membrane pourpre. Selon Oren *et al.* (2006), les vésicules permettent surtout à la cellule de se positionner parallèlement à la surface des saumures.

### 3. 3. 4. ARN et ribosomes

Les Archaea ont des ribosomes 70S comme les bactéries, cependant au microscope électronique leur forme est très variable et peut différer de celle des ribosomes bactériens ou eucaryotes. Les ribosomes de *Halobacterium salinarum* (*Halobacterium cutirubrum*) paraissent identiques à ceux de *E. coli*, 70S, une teneur en ARN de 60 % avec 40 % de protéines (Bayley & Kushner, 1974). Cependant, ils présentent quelques différences. La sous unité 70S requiert en plus du magnésium (0,1 M), entre 3 et 4 M de potassium pour sa stabilisation (Visentin *et al.*, 1972). Les tampons utilisés dans les études des ribosomes provoquent la dissolution de la plupart des protéines et de l'ARNr 5S. Le maintien de l'intégrité des particules 70S apparaît dépendant de la concentration en KCl. Le remplacement de KCl par NaCl se traduit par une dissociation en unités 52S et 31S. Une autre caractéristique est que la plupart des protéines ribosomales halophiles sont acides,

tandis que chez les non halophiles elles sont basiques (Bayley & Kushner, 1974). De plus, l'hydrophobicité des protéines ribosomales halophiles est moins élevée que celle de bactéries non halophiles (Werber, 1980). Les protéines de l'ARNr 5S sont similaires à celles trouvées chez les eucaryotes (Kimura *et al.*, 1989). Le contenu en GC des ARN ribosomiaux (5S, 16S, 23S) des halophiles extrêmes est plus élevé que celui de *E. coli* (Visentin *et al.*, 1972). Les halophiles extrêmes comme tous les Archaea ressemblent aux Eucarya par leur insensibilité au chloramphénicol, à la streptomycine, à l'érythromycine, à la tétracycline et à la kanamycine (Perry *et al.*, 2002).

Comme tous les Archaea et contrairement aux Eucarya et aux Bacteria, les ARNt des halobactéries ont le bras T $\psi$ C qui est dépourvu de thymine et contient une pseudouridine ou de la 1-méthylpseudouridine. Mais comme les eucaryotes, L'ARNt initiateur porte la méthionine au lieu de la formylméthionine. Les aminoacyl-tRNA synthétases fonctionnent mieux en présence de 3,8 M de KCl (Perry *et al.*, 2002).

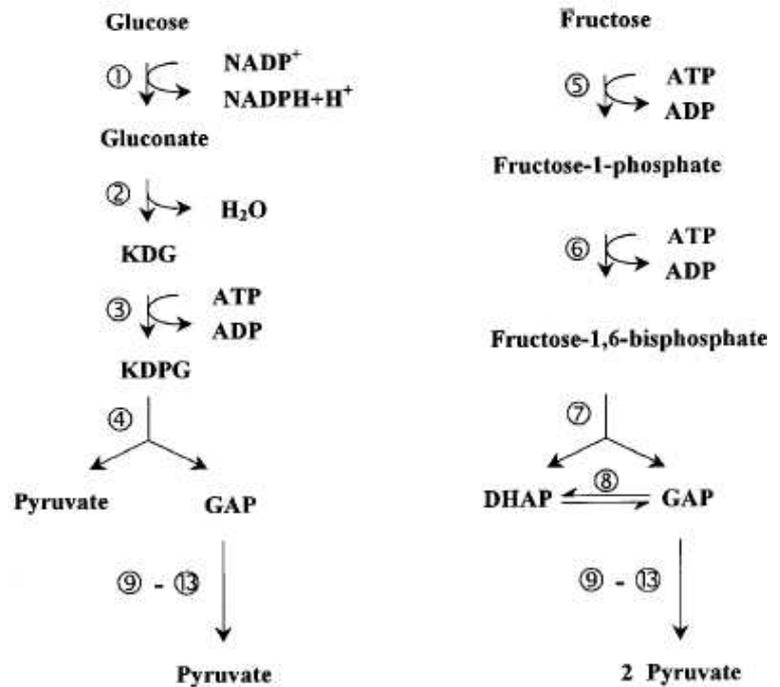
### 3. 3. 5. Métabolisme

Les haloarchaea sont des chimioorganotrophes, aérobies qui se développent mieux sur les acides aminés mais leur métabolisme est peu connu. En dépit de la réputation des haloarchaea à avoir une activité métabolique des sucres limitée, quelques espèces telles que *Halorubrum saccharovororum* (Tomlinson & Hochstein, 1972 ; Tomlinson *et al.*, 1974), *Haloarcula vallismortis* (Gonzalez *et al.*, 1978), *Haloferax mediterranei* (Rodriguez-Valera *et al.*, 1983) et *Haloferax volcanii* (Mullakhanbhai & Larsen, 1975) utilisent les sucres. Les polysaccharides sont d'abord dégradés par des hydrolases extracellulaires spécifiques en oligosaccharides puis transportés à l'intérieur par des transporteurs de type ABC (pour « ATP-binding cassette ») (Tawara & Kamo, 1991 ; Wanner & Soppa, 1999) où ils sont dégradés en monosaccharides.

Le glucose est oxydé par une modification de la voie d'Entner-Doudoroff (Rawal *et al.*, 1988 ; Johnsen *et al.*, 2001 ; Verhees *et al.*, 2003). Le glucose 6-phosphate est absent et le premier intermédiaire phosphorylé est le 2-céto-3-désoxygluconate-6-phosphate qui est converti en pyruvate et en 3-phosphoglyceraldéhyde. Ce dernier est oxydé en pyruvate par les enzymes conventionnelles de la glycolyse. Chez *Halococcus saccharolyticus*, le glucose et le fructose sont dégradés par 2 voies différentes. Le premier via la voie modifiée d'Entner-Doudoroff (ED) et le second par une modification de la voie d'Embden-

Meyerhof (EM) (Johnsen *et al.*, 2001) (Figure 10). Les enzymes intervenant dans les deux voies sont inductibles.

**Figure 10.**  
Dégradation du glucose et du fructose chez les Archaea halophiles extrêmes (Johnsen *et al.*, 2001).



1, Glucose déshydrogénase ; 2, Gluconate déshydrogénase ; 3, 2-céto-3-désoxygluconate kinase ; 4, 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate aldolase ; 5, Cétohexokinase ; 6, 1-phosphofructokinase ; 7, Fructose-1, 6-diphosphate aldolase ; 8, Triosephosphate isomérase ; 9, 3-phosphoglyceraldéhyde déshydrogénase ; 10, 3-phosphoglycérate kinase ; 11, phosphoglycérate mutase ; 12, Enolase ; 13, Pyruvate kinase.

La voie EM des haloarchaea varie de celle des bactéries uniquement dans l'étape de formation du fructose-1-phosphate. Chez le premier groupe, ce composé est formé par une cétoquinase qui existe également chez les eucaryotes. Alors que chez les bactéries, le fructose est phosphorylé en fructose-1-phosphate durant le transport à partir du phosphoénolpyruvate (PEP) par une phosphotransférase (Johnsen *et al.*, 2001). Les voies EM et ED semblent absentes chez *Natronomonas pharaonis* DSM 2160<sup>T</sup> (Falb *et al.*, 2005).

La présence des enzymes du cycle tricarboxylique a été démontrée chez les haloarchaea. Elles sont toutes cytoplasmiques à l'exception de la succinate déshydrogénase et sont actives en présence de chlorure de potassium ou de chlorure de sodium (Hochstein, 1988). Communément à tous les Archaea, la conversion du pyruvate en acétyl CoA est catalysée par une oxo-acid ferredoxine réductase. Au contraire de la dégradation du glucose, la gluconéogénèse suit la voie inverse d'Embden-Meyerhof (Altekar & Rangaswamy, 1992 ; Verhees *et al.*, 2003). Tous les gènes codant pour cette voie, sont présents dans le génome de *Halobacterium* sp. NRC-1 et de *Haloarcula marismortui* sauf pour celui de la fructose 1, 6- diphosphate aldolase. Cependant, une classe I d'aldolase de type eucaryote est détectée chez de nombreuses espèces de *Haloarcula* (Ng *et al.*, 2000 ; Baliga *et al.*, 2004). La voie des pentoses phosphate est absente chez *Halobacterium salinarum* (Oren, 1999b).

Dans les lacs hypersalés, les haloarchaea présentent une grande affinité pour le glycérol produit par l'algue verte unicellulaire *Dunaliella*. En effet, toutes les halobactéries étudiées possèdent une glycérol kinase constitutive (Oren, 1994). La croissance de certaines espèces d'halobactéries sur certains hexoses aboutit à une acidification du milieu par production d'acétate, de lactate et de pyruvate (Tomlinson & Hochstein, 1976 ; Oren *et al.*, 1995). L'acétate produit pourra servir de source de carbone et d'énergie pour certaines espèces des genres *Haloarcula*, *Halococcus* et *Haloferax* (Javor, 1984 ; Tindall, 1992 ; Bräsen & Schönheit, 2001) via le cycle Shunt du glyoxylate, une variante du cycle de Krebs. L'isocitrate lyase inductible clive l'isocitrate en succinate et glyoxylate (Aitken & Brown, 1969 ; Oren *et al.*, 1995).

L'arginine est utilisée en anaérobiose et à l'obscurité par *Halobacterium* selon la voie dite de l'arginine désiminase (Hartmann *et al.*, 1980 ; Ruepp & Soppa, 1996). L'arginine est donc propice comme substrat de croissance là où elle est abondante, en fournissant à la fois carbone, azote et énergie. La fermentation de l'arginine par cette voie est également répandue chez les bactéries lactiques, *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Mycoplasma* sp. et chez les cyanobactéries.

Certaines halobactéries semblent fixer le CO<sub>2</sub> en présence d'acide propionique par une voie non établie. Cette fixation semble parfois être stimulée par la lumière (Danon & Caplan, 1979).

Lors de l'analyse des génomes des halobactéries, on a noté la présence de gènes codant pour les enzymes du cycle de la  $\beta$ -oxydation mais aucune oxydation d'acides gras n'a été observée (Ng *et al.*, 2000 ; Falb *et al.*, 2005). La chaîne de transport des électrons chez *Halobacterium salinarum* consiste en un complexe cytochrome b contenant au moins trois cytochromes type b, un cytochrome type c et une oxydase terminale de type aa<sub>3</sub> (Fujiwara *et al.*, 1989). Il semblerait que le transport des électrons par la chaîne respiratoire soit stimulé par le glycérol (Oren, 1994). Les halobactéries sont des aérobies mais une respiration anaérobie a été également signalée chez ce groupe. Ainsi, on a noté que *Haloferax mediterranei*, *Haloferax denitrificans* et *Haloferax volcanii* réduisent les nitrates en nitrites (Tindall, 1992).

### 3. 3. 6. Production de halocines

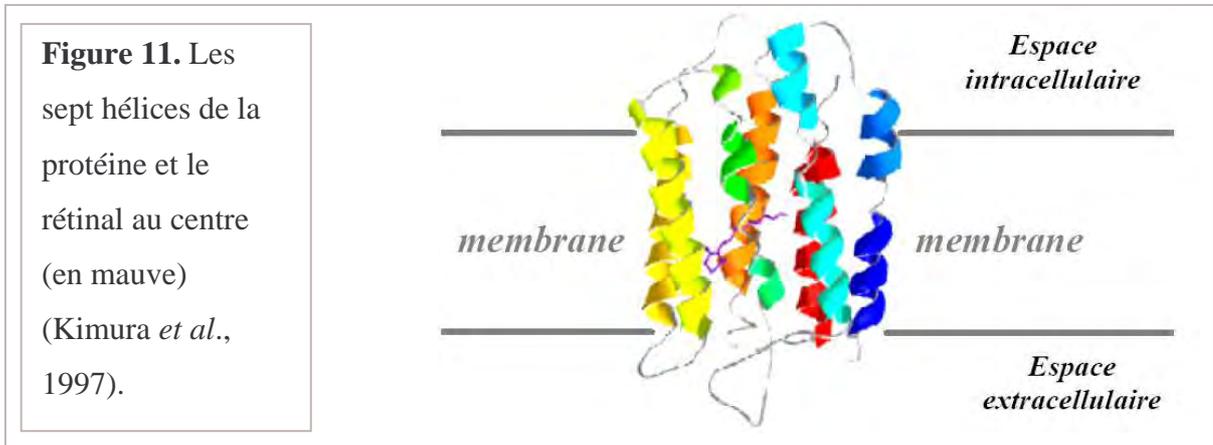
Les halophiles extrêmes du domaine Archaea produisent des substances protéiques excrétées dans l'environnement, appelées halocines. Elles ont été décrites pour, la première fois, par Rodriguez-valera *et al.* (1982), ce type de bactériocines détruit les membranes cellulaires ou inhibe la transcription, la traduction et l'activité nucléasique (ADN et ARN) (Price & Shand, 2000). Bien que la production d'halocines semble être une caractéristique universelle des halophiles extrêmes (Torreblanca *et al.*, 1991), seulement cinq halocines ont été caractérisées au niveau protéique. Trois d'entre elles se distinguent par leur haut poids moléculaire : l'halocine H4 produite par *Haloferax mediterranei* R4 d'environ 28 kDa (Meseguer & Rodriguez-Valera, 1985), l'halocine H6 produite par *Haloferax gibbonsii* Ma d'environ 32 kDa (Torreblanca *et al.*, 1989) et l'halocine III de 31 kDa produite par *Haloferax mediterranei* Xia3 (Platas *et al.*, 1996). Les deux autres microhalocines ont un poids moléculaire inférieur à 3 kDa (Price & Shand, 2000).

### 3. 3. 7. Bactériorhodopsine et photosynthèse chez les haloarchaea

Les haloarchaea diffèrent des Archaea par la capacité qu'ont certains membres des genres *Halobacterium*, *Haloarcula* et l'espèce *Halorubrum sodomense* (Blaurock & Stoeckenius, 1971 ; Oren, 1983b ; Kitajima *et al.*, 1996) de réaliser un type particulier de photosynthèse en absence de chlorophylle. A basse pression partielle d'oxygène, elles synthétisent des taches pourpres qui apparaissent sur leur membrane cytoplasmique (membrane rouge) et qui peuvent couvrir plus de la moitié de la membrane cellulaire :

c'est la membrane pourpre. Elle contient environ 25 % de lipides et 75 % de protéines (Kates, 1988). Les taches pourpres sont formées de feuilletts plats contenant un réseau cristallin d'une seule protéine : la bactériorhodopsine (br) (Oesterhelt & Stoeckenius, 1971). Celle-ci ressemble fortement au pigment sensoriel, la rhodopsine, des bâtonnets et des cônes des yeux des vertébrés. Chaque agrégat protéique est lié à un dérivé de caroténoïde : le rétinol (l'aldéhyde de la vitamine A). Ce dernier est produit par clivage du  $\beta$ -carotène en présence d'oxygène et est lié de façon covalente au résidu lysyl de la protéine via une base de Schiff (Bayley *et al.*, 1981). La membrane pourpre est sensible aux détergents (Hendler & Dracheva, 2001).

La bactériorhodopsine est composée de 248 acides aminés dont 70 % sont hydrophobes. Elle est formée de sept hélices transmembranaires connectées sur chaque face par des boucles et le rétinol est au centre de la membrane (Figure 11). Par ailleurs, elle est encastrée dans la membrane avec une orientation bien définie, les extrémités N-terminale de trois à six acides aminés sont tournées du côté extérieur, et 17 à 24 extrémités C-terminale sont logées dans le cytoplasme (Stoeckenius & Bogomolni, 1982). La bactériorhodopsine absorbe la lumière à 568 nm.



L'importance de la membrane pourpre comme un outil de conversion énergétique a été observée par Danon & Stoeckenius (1974). A l'obscurité, le rétinol est dans la configuration trans, et la base de Schiff est protonée. En absorbant la lumière, le rétinol est isomérisé dans la configuration 13-cis, et la base de Schiff est déprotonée. Les protons passent à travers la membrane plasmique à l'extérieur. La base de Schiff repasse alors de nouveau sous la forme protonée en prélevant un proton dans le cytoplasme, et le rétinol revient à la forme isomérique trans (Lanyi, 2000). Si la bactériorhodopsine est illuminée

continuellement, le pigment paraît osciller entre deux formes identifiées par leurs pics d'absorption.

Le sens du flux de protons est à l'opposé de celui qui a lieu au niveau des chloroplastes exposé à la lumière. La force proton motrice générée permet à la cellule de synthétiser de l'ATP et d'actionner d'autres systèmes de transport. L'échange de protons et d'ions sodium par un système transporteur antiporteur  $H^+/Na^+$  (rapport d'échange d'environ 2) et un transport sélectif du potassium (Lanyi, 1978). La différence de potentiel électrochimique à travers la membrane est couplée avec le transport actif des acides aminés.

Les halobactéries ont trois autres photosystèmes basés sur le rétinol (Tableau 3). Schobert et Lanyi ont découvert que l'illumination des membranes de *Halobacterium salinarum* actionnait une pompe qui fait entrer les ions chlorure, appelée halorhodopsine (hr) (Oesterhelt, 1995 ; Pelmont, 1995). Elle est également faite de sept hélices transmembranaires, même disposition générale et forte homologie de séquence avec la bactériorhodopsine. La protéine accomplit son cycle en poussant vers l'intérieur de la cellule des ions  $Cl^-$  contre le gradient de charges existant. Le transport n'est pas sélectif aux ions chlorures, les ions bromures, iodes et nitrates sont également transportés (Schäfer *et al.*, 1999). L'absorption maximale a lieu à 588 nm. La présence de halorhodopsine seule dans la membrane permet l'exclusion du  $Na^+$  du cytoplasme et la synthèse d'ATP (Lanyi & Schobert, 1983).

Les halobactéries sont attirées par la lumière aux longueurs d'ondes supérieures à 580 nm et fuient celles inférieures à 500 nm. Cette capacité est due à la présence dans la membrane plasmique d'un capteur photosensible, qui est une troisième rhodopsine (sRI) distincte des deux précédentes (Bogomolni & Spudis, 1982). Elle est impliquée dans le phototactisme (Hildebrand & Schimz, 1983 ; Spudis, 1993) et permet de localiser les conditions optimales pour le fonctionnement de la br et de la hr. Les longueurs d'ondes inférieures à 500 nm sont également reconnues par un second pigment sensitif (sRII) dont l'absorption est maximale à 490 nm. Il a pour rôle la protection des halobactéries de la photooxydation. Des mécanismes de chimiotactisme sont également observés chez *Halobacterium salinarum* qui semblerait partager des mécanismes intermédiaires avec le phototactisme (Schimz & Hildebrand, 1979).

Il est probable que toutes les halobactéries possèdent l'halorhodopsine et les pigments photorécepteurs mais non la bactériorhodopsine (Grant *et al.*, 2001 ; Falb *et al.*, 2006).

### 3. 3. 8. Gènes et biologie moléculaire

#### ➤ Organisation génomique

Comme les Bacteria, les Archaea sont des organismes procaryotes au sens où elles possèdent un génome constitué d'un chromosome circulaire non enfermé dans un noyau dont la taille est du même ordre que celle des génomes bactériens (2 à  $4.10^6$  paires de bases) (Keeling, 1994). L'organisation physique de ces génomes est différente de celle des génomes eucaryotes. En plus du chromosome, les procaryotes peuvent avoir des gènes supplémentaires sur des plasmides. Cependant, on connaît actuellement des Archaea à plusieurs chromosomes (Brown, 2002).

Le génome des Archaea halophiles extrêmes est composé de deux parties, une fraction riche en GC (66 à 68 %) correspondant au large chromosome, à l'exception de *Haloquadratum walsbyi*, récemment isolé en culture pure est dont le contenu en GC est inférieur à cette gamme. La secondaire fraction pauvre en GC (57 à 60 %) correspond à l'ADN satellite ou aux mégaplasmides (Pfeifer, 1988). Elle représente 10 à 30 % de l'ADN total. Les génomes de six halobactéries ont été complètement séquencés (Tableau 3). Les séquences de *Halobacterium* sp. NRC-1, de *Haloarcula marismortui* ATCC 43049<sup>T</sup>, de *Halobacterium salinarum* str. R1, de *Haloquadratum walsbyi* et de *Natronomonas pharaonis* DSM 2160<sup>T</sup> ont été publiées (Ng *et al.*, 2000; Baliga *et al.*, 2004 ; Falb *et al.*, 2005; Bolhuis *et al.*, 2006) mais non celle de *Haloferax volcanii*.

L'analyse du génome de *Halobacterium* sp. NRC-1 a indiqué qu'environ 40 gènes portés par les réplicons pNRC100 et pNRC200 codent pour des protéines à fonction vitale telles que l'ADN polymérase, les facteurs de transcription TBP et TFIIB, cytochrome oxydase et autres (Ng *et al.*, 2000). Il en est de même des gènes portés par les réplicons pNG600 et pNG700 de *Haloarcula marismortui* ATCC 43049<sup>T</sup>. Le premier code pour les enzymes du cycle de Krebs et l'ADN polymérase de type B alors que le second pour les enzymes responsables de la dégradation de l'arginine (Baliga *et al.*, 2004).

L'organisation du génome est également du même type que chez les bactéries. Les gènes sont regroupés en opérons et sont cotranscrits en ARN messagers polycistronique. Cependant, les gènes bactériens semblent un peu plus longs que les gènes des Archaea (Zhang, 2000). Il n'y a pas d'introns dans les gènes codant pour des protéines mais sont

présents dans les gènes des ARNt et ARNr. Ils sont coupés par une ribonucléase semblable à celle qui coupe les transcrits primaires d'ARN eucaryotes (Lykke-Andersen *et al.*, 1997). La similarité la plus remarquable est que l'ordre des gènes est conservé entre les Bacteria et les Archaea dans certains opérons qui contiennent des protéines ribosomiques appelées streptomycine (str), spectinomycine (spc), S10, ou  $\alpha$  par exemple (Keeling *et al.*, 1994).

**Tableau 3.** Organisation des génomes de cinq haloarchaea (Ng *et al.*, 2000 ; Baliga *et al.*, 2004 ; Falb *et al.*, 2005 ; Bolhuis *et al.*, 2006).

Propriétés	1	2	3	4	5
Origine	Poissons salés	Poissons salés	Mer Morte	Salines (Espagne)	Lac sodé (Egypte)
Taille du génome (Mb)	2,61	2,72	4,37	3,24	2,80
Nombre de plasmides	2	4	8*	1	2
GC %	68,0	68,0	62,4	47,9	63,4
Opérons ARNr	1	1	3	2	1
Protéines basées sur le rétinol (Bop, Hop, Sop)	4 (1, 1, 2)	4 (1, 1, 2)	6 (3, 1, 2)	3 (2, 1, 0)	2 (0, 1, 1)

1, *Halobacterium* sp. NRC-1 ; 2, *Halobacterium* str. R1 ; 3, *Haloarcula marismortui* ATCC 43049<sup>T</sup> ; 4, *Haloquadratum walsbyi* ; 5, *Natronomonas pharaonis*.DM 2160<sup>T</sup>.

\*, un des plasmides est le chromosome II; Bop, bactériorhodopsine ; Hop, halorhodopsine ; Sop, rhodopsine sensitif.

Une caractéristique commune des membres du genre *Haloarcula* est la présence d'au moins deux copies hétérogènes du gène d'ARNr 16S qui diffère de 5 % ou plus (Dennis *et al.*, 1998). Le génome de *Haloarcula marismortui* ATCC 43049<sup>T</sup> contient trois opérons ARNr distincts (rrnA, rrnB et rrnC). Opérons rrnA et rrnC sont portés par le chromosome I et rrnB par le chromosome II (Baliga *et al.*, 2004).

### ➤ Réplication de l'ADN

De tous les mécanismes informationnels, c'est la réplication de l'ADN qui présente plus de ressemblance entre Archaea et Eucarya. C'est l'analyse, en 1996, du premier

génomique d'Archaea complètement séquencé, *Methanococcus jannashii*, qui a véritablement révélé l'étroite parenté entre le mécanisme de réplication des Eucarya et celui des Archaea (Edgel & Doolittle, 1997 ; Lopez *et al.*, 1999). Le séquençage de nouveaux génomes d'Archaea halophiles a confirmé cette observation (Ng *et al.*, 2000 ; Baliga *et al.*, 2004 ; Falb *et al.*, 2005 ; Bolhuis *et al.*, 2006).

Les protéines intervenant dans la réplication, à deux exceptions près, sont de type eucaryote. La plupart d'entre elles n'ont pas d'homologues chez les bactéries. Les deux protéines qui dérogent à la règle sont la sous unité catalytique de l'ADN polymérase II, qui correspond à une nouvelle famille d'ADN polymérases uniquement présente chez les Archaea (Cann *et al.*, 1998), et un homologue de la primase bactérienne, DnaG, qui n'existe pas chez les eucaryotes. Comme tous les Euryarchaeota, les haloarchaea possèdent des histones associées à leur ADN (Pereira *et al.*, 1997).

En général, les Archaea répliquent leur ADN selon un mode bactérien (Thomas *et al.*, 2001b). Deux complexes de réplication (réplisomes) sont formés au niveau d'une origine unique et vont répliquer le chromosome de façon bidirectionnelle. Cependant, on a identifié deux oriC (pour « origin of replication complexes ») : oriC1 et oriC2 sur le chromosome de *Halobacterium* sp. NRC-1. Les deux origines se trouvent respectivement à côté de gènes *cdc6-1* et *cdc6-2* codant une protéine homologue à celle du gène *cdc6* des eucaryotes qui est impliquée dans l'initiation de la synthèse d'ADN chez les eucaryotes (Ng *et al.*, 2000 ; Zhang & Zhang, 2003).

### ➤ **Transcription, traduction et régulation**

Un autre exemple frappant concerne le système de transcription de l'ADN en ARN messagers. Les cellules eucaryotes possèdent trois ARN polymérases dépendantes de l'ADN (I, II et III) distinctes, composée chacune par une dizaine de polypeptides différents, alors que l'unique ARN polymérase bactérienne ne compte que quatre sous unités  $\beta$ ,  $\beta'$ ,  $\alpha_2$ . L'attachement de l'enzyme à l'ADN fait intervenir une sous unité supplémentaire appelée facteur sigma ( $\sigma$ ) au niveau du promoteur situé à environ 35 bases en amont du site d'initiation (Perry *et al.*, 2002). En général, les ARN polymérases des Archaea sont aussi complexes que celles des eucaryotes, formées d'une dizaine de sous unités et ressemble à l'ARN polymérase II eucaryotique (Langer *et al.*, 1995). Les sous unités sont codées par douze gènes localisés au niveau de six loci chez *Halobacterium* sp.

NRC-1 (Ng *et al.*, 2000). Les promoteurs reconnus par les ARN polymérase archéennes ressemblent fortement à ceux des eucaryotes en contenant notamment un motif plus ou moins conservé composé majoritairement de bases T et A, appelé boîte TATA (Baumann *et al.*, 1995 ; Ng *et al.*, 2000). Cette boîte se situe à environ 25 bases en amont du site d'initiation de la transcription, ce qui correspond à sa position chez les eucaryotes. En outre, les Archaea et les Eucarya possèdent des facteurs protéiques de transcription communs, dont la protéine (TBP) (pour « TATA binding protein ») de reconnaissance de la boîte TATA et TFIIB, qui présentent des séquences similaires et dont on ne connaît pas d'homologues chez les bactéries (Marsh *et al.*, 1994). *Halobacterium* sp. NRC-1 possède de multiples copies de gènes codant pour TBP et TFIIB dont la majorité sont sur le réplicon pNRC 200 (Ng *et al.*, 2000).

Les ARN messagers des archéobactéries ressemblent plus à ceux des bactéries qu'à ceux des eucaryotes. Mais la traduction chez les haloarchaea ne débute pas au niveau de la séquence Shine-Dalgarno comme chez les bactéries et d'autres Archaea (Soppa, 2005). Généralement, les protéines intervenant lors de la traduction ressemblent plus à celles des eucaryotes. En dépit du fait que les séquences des gènes codant pour les protéines ribosomales de *Halobacterium* sp. NRC-1 soient similaires à celles des eucaryotes, l'organisation en groupes de plusieurs gènes ressemble aux opérons de *E. coli* et la régulation a lieu au niveau de la transcription et de la traduction (Zimmermann & Pfeifer, 2003). Tebbe *et al.* (2005), ont également noté la présence d'une régulation post-traduction par contrôle de l'activité des enzymes.

De nombreux aspects moléculaires d'adaptation des haloarchaea à leur environnement restent à élucider. Peu de gènes ont été reportés chez les halobactéries tels que celui codant pour les vésicules à gaz, la bactériorhodopsine et autres gènes osmorégulateurs. Il paraît que l'adaptation à un stress hypoosmotique est plus complexe pour les haloarchaea et nécessite l'intervention de plus de protéines et de gènes (Juez, 2004).

### ➤ **Translocation des protéines**

Le principe de transport des protéines est commun aux trois domaines (Schatz & Dobberstein, 1996 ; Pohlschroder *et al.*, 1997 ; Prinz *et al.*, 1997). Ils utilisent 2 systèmes

de transport : Sec (pour « Secretary ») et Tat (pour « twin-arginine translocation ») (Rose *et al.* 2002).

Dans le premier procédé, les protéines sont transportées sous formes déroulées par un canal transmembranaire (translocation post-traductionnelle) ou dans une conformation linéaire avant leur repliement (translocation co-traductionnelle). Les protéines destinées à la sécrétion sont synthétisées avec une séquence N- terminale spéciale qui facilite leur passage à travers la membrane plasmique. Chez les bactéries, l'insertion du signal dans la membrane a lieu sous l'action d'une protéine SecA à activité ATPase. Elle se lie à un récepteur membranaire constitué par l'accolement de deux protéines SecY et SecB (translocase). Les sources d'énergie permettant à SecA de tirer le polypeptide naissant au dehors sont l'ATP et la force protonmotrice. Après avoir traversé la membrane, les polypeptides se séparent de leur séquence signal par une peptidase signal (SPases). La machinerie de translocation Sec des haloarchaea paraît être un hybride entre celle des Bacteria et des Eucarya. Ils ne possèdent pas le facteur SecA. Le repliement de leur protéine est empêché par la formation d'un complexe avec un élément cytosolique SRP « particules de reconnaissance du signal » comme chez les eucaryotes (Pohlschröder *et al.*, 1997).

Un second système présent chez les procaryotes et les thylacoïdes des chloroplastes. Les protéines l'utilisant contiennent dans leur peptide signal un motif « twin-arginine » (Chaddock *et al.*, 1995 ; Albers *et al.*, 2006). Contrairement au premier système, il transporte les protéines repliées et spécialement celles contenant des co-facteurs et sans hydrolyse d'ATP. Plus de 60 % des peptides signal contenant un motif twin-arginine ont été identifiés chez *Halobacterium* sp. NRC-1 alors que chez les bactéries et les Archaea non halophiles, plus de 90 % de leur protéine sont Sec- dépendant. Le système Tat semble être plus approprié dans la translocation des protéines des archaea halophiles extrêmes (Rose *et al.*, 2002). Le repliement rapide des protéines nouvellement formées afin d'éviter leur agrégation, deviennent incompatibles avec le système de transport Sec.

#### **4. Les bactéries halophiles aérobies**

##### **4. 1. Généralités**

Il a toujours été considéré que les environnements hypersalins sont uniquement habités par les haloarchaea. Mais les méthodes moléculaires ont permis de mettre en évidence une présence bactérienne (Antón *et al.*, 1999 ; Benlloch *et al.*, 2002). Ainsi de nouvelles espèces bactériennes halophiles modérées et extrêmes ont été isolées d'environnements thalassohalins, athalassohalins et de sols hypersalins (Tableau 4-Annexe 2). Des formes sporulées de bactéries ont été isolées des roches du Permien primaire (Grant *et al.*, 1998). De même, Vreeland *et al.* (2000) ont cultivé et caractérisé une bactérie de l'inclusion fluide d'un cristal de sel et dont l'âge du cristal a été estimé à environ 250 millions d'années. Le séquençage complet de l'ADNr 16S a affilié la souche au groupe formé par *Halobacillus marismortui* (*Bacillus marismortui*) et *Virgibacillus pantothenicus*.

Généralement, les bactéries halotolérantes et halophiles modérées sont dominantes dans les environnements à concentration saline inférieure à 10 % (p/v) (Prado *et al.*, 1991 ; Caton *et al.*, 2004).

#### 4. 2. Taxinomie et phylogénie

Les études phylogénétiques récentes des bactéries halophiles aérobies ou anaérobies facultatives basées sur les données du séquençage de l'ARN ribosomal 16S a montré que c'est un groupe physiologiquement hétérogène. Elles appartenant aux embranchements des Spirochaetes, des Proteobacteria, au groupe des *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* et aux bactéries à Gram positif à haut et à faible G+C (Tableau 4-Annexe2), indiquant une grande diversité phylogénique. Certaines souches appartiennent à des genres incluant des espèces non halophiles comme *Pseudomonas*, *Flavobacterium* et *Spirochaeta*. Alors que d'autres sont placées dans des genres exclusivement halophiles comme *Salinivibrio*, *Arhodomonas* et *Dichotomicrobium*, etc. (Ventosa, 1988 ; Ventosa *et al.*, 1998).

En 1988, Franzmann *et al.*, ont formé la famille des *Halomonadaceae*, regroupant deux membres halophiles modérés, *Halomonas* et *Delaya*. Actuellement, elle comprend cinq genres, *Halomonas* (Vreeland *et al.* 1980), *Chromohalobacter* (Mellado *et al.*, 1996), *Zymobacter* (Okamoto *et al.*, 1993 ; Dobson & Franzmann, 1996), *Carnimonas* (Garriga *et al.*, 1998) et *Cobetia* (Cobet *et al.*, 1970 ; Arahal *et al.*, 2002). Mais uniquement trois espèces ont été décrites comme halophiles extrêmes ; *Halovibrio denitrificans*, *Halospina denitrificans* (Sorokin *et al.*, 2006) et *Salicola marascensis* (Maturrano *et al.*, 2006b).

### 4. 3. Physiologie

La croissance des bactéries halophiles modérées a lieu généralement sur une gamme de salinité totale de 0,8-4,0 à 18,0-22,0 % (p/v) (Ventosa, 1998) et les bactéries halophiles extrêmes de 10,0-15,0 à 20,0-30,0 % (p/v) (Sorokin *et al.*, 2006 ; Maturrano *et al.*, 2006). Leur métabolisme est strictement aérobie. Cependant, des espèces anaérobies facultatives utilisent le nitrate comme accepteur final d'électron ont été isolées de lacs hypersalés comme *Spirochaeta halophila*, *Halomonas elongata* (Vreeland *et al.*, 1980), *Halomonas denitrificans*, *Halovibrio denitrificans* et *Halospina denitrificans* (Sorokin *et al.*, 2005).

Les bactéries halophiles utilisent une large variété d'acides organiques comme source de carbone et d'énergie. Des souches dégradant les huiles minérales et d'autres utilisant les hexadécane, ont été isolées du Grand Lac Salé Utah (Ward & Brock, 1978). Des composés aromatiques comme le benzoate sont aussi utilisés par *Halomonas halodurans* (Romano *et al.*, 1996).

La caractéristique commune pour toutes les bactéries halophiles modérées est leur exigence pour le sel et leur capacité à tolérer des concentrations élevées. Ces deux propriétés dépendent de la température et de la nature des nutriments disponibles (Kushner, 1993). Ainsi, pour *Halomonas halophila*, la concentration saline optimale est de 5 % (p/v) à 22 °C alors qu'elle est de 7,5 % (p/v) lorsque la température varie de 32 à 42 °C (Quesada *et al.*, 1987). Certaines ont des exigences nutritionnelles simples comme *Halomonas halophila* dont la croissance peut avoir lieu sur milieu à base de sels inorganiques, de nitrate et de glucose (Quesada *et al.*, 1987). Mais d'autres, comme *Salinivibrio costicola* ont des exigences plus complexes (Kamekura *et al.*, 1985). En général, les milieux complexes stimulent mieux la croissance des bactéries halophiles modérées à concentrations salines élevées car ils peuvent renfermer les solutés compatibles ou encore leurs précurseurs (Javor, 1989).

Pour pallier aux effets de l'augmentation de la salinité de l'environnement externe, les bactéries halophiles modérées possèdent des mécanismes qui leur permettent de préserver l'intégrité structurale des macromolécules, de disposer de provisions d'énergie, de métabolites et d'un environnement intracellulaire pour leur métabolisme et de réguler leur métabolisme en réponse à ces besoins. On pense que la majorité des fonctions responsables

de la survie des bactéries halophiles modérées dans leur environnement sont codées par des mégaplasmides (Argandoña *et al.*, 2003).

#### 4. 3. 1. Concentrations ioniques internes

Chez les bactéries halophiles, la réponse à une augmentation de la pression osmotique environnante est l'accumulation de sels et de solutés organiques. Généralement, la concentration intracellulaire de l'ion  $K^+$  est supérieure à celle extracellulaire et c'est l'opposé avec l'ion  $Na^+$ . Cependant, l'accumulation des ions est insuffisante comme réponse à un choc osmotique (Ventosa *et al.*, 1998). En 1954, Baxter et Gibbons ont noté que l'adaptation cellulaire au stress salin est hautement dépendante de l'énergie (Ventosa *et al.*, 1998). L'exclusion du sodium de la cellule se fait par une pompe à sodium et l'antiport  $Na^+/H^+$ . La pompe à  $Na^+$  est couplée au fonctionnement de la chaîne respiratoire qui crée un gradient de  $Na^+$ . Chez *Salinivibrio costicola*, l'exclusion du  $Na^+$  se fait par la pompe à  $Na^+$  à pH alcalin et par l'antiport  $Na^+/H^+$  à pH acide (Tokuda & Unemoto, 1983). Les travaux effectués sur *Halomonas israeliensis* ont également mis en valeur l'importance de la pompe à  $Na^+$  dans la régulation de la concentration cytoplasmique de cet ion (Ken-Dror & Avi-Dor, 1985). Les systèmes de transport d'autres ions, chez les bactéries halophiles modérées, sont peu connus.

#### 4. 3. 2. Composés organiques compatibles

Chez les bactéries halophiles, la régulation osmotique est assurée principalement par une accumulation de différents types de composés organiques solubles en concentration dépendante de la salinité extérieure. Ces composés solubles peuvent s'accumuler en fortes concentrations dans la cellule sans interférer avec les processus cellulaires (Brown, 1976 ; Galinski & Trüper, 1994).

De nombreuses études *in vitro* ont montré que les solutés organiques ou osmoprotecteurs protègent également les macromolécules contre les effets délétères de nombreuses contraintes (ioniques, thermiques, pH...).

#### Les acides aminés

A l'exception de quelques groupes de bactéries à Gram positif qui accumulent la proline, les acides aminés ne semblent pas avoir une importance considérable en tant que solutés compatibles chez ces bactéries. Cependant, on a noté chez *Halomonas elongata* une augmentation du pool d'acides aminés intracellulaire, principalement du glutamate en réponse à une augmentation de la concentration saline (Vreeland *et al.*, 1983). Alors que la proline est le principal acide aminé rencontré chez *Salinicoccus roseus* et *Salinicoccus hispanicus* (Galinski & Trüper, 1994).

### Glycine bêtaïne

La glycine bêtaïne (N, N, N-triméthylglycine), appartient à la famille des composés ammonium quaternaires est le soluté compatible le plus fréquemment accumulé par les bactéries pourpres photosynthétiques, les cyanobactéries et les bactéries hétérotrophes halophiles aérobies (Imhoff & Rodriguez-Valera, 1984 ; Ventosa *et al.*, 1998). A l'exception de l'actinomycète *Actinopolyspora halophila*, aucune bactérie halophile modérée ou halotolérante n'est capable d'une synthèse de *novo* de la glycine bêtaïne (Galinski, 1993). Mais certaines d'entre elles, sont capables de synthétiser cette molécule soit par méthylation de la glycine, soit par oxydation de la choline (DasSarma, 2001). La plupart de ces bactéries possèdent des systèmes de transport qui permettent une importation rapide de ce composé ou de son précurseur (la choline), s'ils sont présents dans le milieu environnant (Imhoff & Rodriguez-Valera, 1984). La glycine bêtaïne peut aussi servir de substrat pour certaines bactéries aux concentrations salines inférieures à 2 M (Ventosa *et al.*, 1998).

### Ectoïne et hydroxyectoïne

Ectoïne (acide 1, 4, 5, 6-tétrahydro-2-méthyl-4-Pyrimidinecarboxylique) et son dérivé  $\beta$ -hydroxyectoïne, ont été identifiés comme solutés compatibles chez une bactérie phototrophe halophile extrême, *Ectothiorhodospira halochloris* (Galinski *et al.*, 1985). Ils sont également reconnus comme osmoprotecteurs chez de nombreux halophiles modérés du domaine Bacteria. La synthèse de l'ectoïne se fait en trois étapes : elle débute par le semialdéhyde aspartate et avec le diaminobutyrate et le N- $\gamma$ -acetyldiaminobutyrate comme intermédiaire (Peters *et al.*, 1990 ; Nakayama *et al.*, 2000). Les bactéries halophiles modérées de la famille des *Halomonadaceae* synthétisent ou accumulent l'ectoïne comme

osmoprotecteur grâce à des transporteurs TeaABC (Canova *et al.*, 1997 ; Kunte, 2004). Il est trouvé que l'éctoïne protège les enzymes de la dénaturation thermique, de la congélation et de la dessiccation (Lippert & Galinski, 1992).

### 4. 3. 3. Enzymes

Lorsqu'on aborde l'activité enzymatique des bactéries halophiles modérées et la relation avec le sel, trois types d'activités sont distingués ; les enzymes intracellulaires dans un environnement intracellulaire en contact avec les osmoprotectants et une faible concentration en sel, les protéines liées à la membrane incluant les protéines transporteurs qui sont en contact avec l'environnement intracellulaire et extracellulaire et les enzymes extracellulaires exposées aux conditions hypersalines.

#### Enzymes cytoplasmiques

L'analyse du pyruvate kinase de *Salinivibrio costicola* a montré qu'elle contient un excès d'acides aminés acides et une faible proportion de résidus hydrophobes mais riche en Gly et Ser (Kushner, 1986). Probablement, le complexe enzymatique intervenant dans la synthèse des protéines ribosomales constitue un objet intéressant pour l'étude de l'influence du sel sur l'activité des enzymes. Les études réalisées sur *Salinivibrio costicola*, ont montré que l'activité est optimale à faible concentration en sel (0,1 à 0,3 M) (Kamekura & Kushner, 1988). Les sels de chlorure inhibent toute activité enzymatique en empêchant l'attachement de la sous unité 50S au complexe sous unité 30S-ARNm. Cet effet peut être supprimé par la présence de glycine bêtaïne ou de glutamate. Par ailleurs, le remplacement partiel des ions chlorures par d'autres anions tels que le glutamate, le sulfate ou l'acétate, rend l'activité enzymatique optimale à 0,6 M (Kushner, 1993). Les protéines ribosomales de *Salinivibrio costicola* sont légèrement plus acides que celles de *E. coli* mais moins que celles des membres de la famille des *Halobacteriaceae* (Ventosa *et al.*, 1998).

#### Enzymes liées à la membrane

Ces enzymes sont en contact avec le sel du milieu environnant et on s'attend à ce qu'elles soient plus halophiles que les précédentes. En effet, il est trouvé que la 5'-

nucléotidase liée à la membrane de *Salinivibrio costicola* qui hydrolyse ATP, ADP et AMP est active à une concentration en NaCl ou de KCl de 2 M ou plus. L'activité de la quinone oxydoréductase de *Halomonas israelensis* dépend du cation Na<sup>+</sup>. Ce dernier active la réduction de la quinone mais non celle de son oxydation (Ken-Dror *et al.*, 1986).

### **Enzymes extracellulaires**

Des études ont été réalisées sur les enzymes extracellulaires de bactéries halophiles et halotolérantes dans le but de les utiliser en processus biotechnologiques. Les amylases produites par *Micrococcus varians* sont actives lorsque la croissance de l'organisme a lieu sur milieu à concentration en sel de 2 M et inactivée aux faibles concentrations de sel (Ventosa *et al.*, 1998). Mais peu de données sont actuellement disponibles sur les protéases extracellulaires des halophiles. On a noté que *Micrococcus varians* produit une nucléase lorsque la croissance a lieu sur milieu contenant une concentration variant de 1 à 4 M de NaCl ou KCl et que cette production est maximale entre de 2,5 à 3,5 M (Kamekura & Onishi, 1983).

### **La composition des protéines**

Les études comparatives réalisées ont montré que les protéines ribosomales des bactéries halophiles ont un contenu en acides aminés acides légèrement supérieur à celui de *E. coli* et d'autres bactéries non halophiles. Par contre, l'hydrophobicité des protéines ribosomales de *Salinivibrio costicola* et de *Halomonas canadensis* ne diffère pas beaucoup de celle de *E. coli* (Ventosa *et al.*, 1998).

#### **4. 3. 4. Membrane cytoplasmique**

La membrane cytoplasmique forme une barrière entre le cytoplasme (généralement à faible salinité) et l'environnement (salinité élevée et souvent fluctuante). Par conséquent, on s'attend alors à ce que les propriétés de la membrane soient régulées par la concentration de sel à l'extérieur pour ajuster les fonctions vitales de l'organisme. Les bactéries halotolérantes et halophiles possèdent des mécanismes qui déterminent leur présence ou leur abondance dans les environnements hypersalins. Il a été suggéré que les modifications dans la composition lipidique membranaire induites par une variation de la

concentration en NaCl sont très importantes dans le contrôle de la perméabilité ionique (Monteoliva-Sanchez *et al.*, 1988) et la régulation de la pression osmotique à l'intérieur de la cellule (Russell, 1993). Une augmentation de la salinité s'accompagne d'une élévation de la proportion des phospholipides anioniques chez les bactéries à Gram-négatif. Le changement majeur correspond à une augmentation de la quantité du phosphatidylglycérol (PG) par rapport à celle de la phosphatidyléthanolamine (PE) (Vreeland *et al.*, 1984). Dans certains cas, le ralentissement de la croissance à cause de fortes salinités peut provoquer à son tour une augmentation de la proportion de PG. En effet, une molécule de diphosphatidylglycérol est convertie en deux molécules de phosphatidylglycérol suite à une faible croissance.

La composition en acides gras subit des modifications importantes suite à un changement de la salinité du milieu extérieur. Des travaux ont montré une augmentation de la quantité des acides gras comportant un cyclopropane et une diminution des acides gras monoinsaturés suite à l'augmentation de la salinité du milieu (Monteoliva-Sanchez & Ramos-Cormenzana, 1986). Ce changement est sans effet sur la fluidité membranaire du fait que ces deux types de composés ont des propriétés thermiques similaires. Chez les bactéries à Gram positif, les fortes salinités conduisent à une augmentation des lipides anioniques (phosphoglycolipides et glycolipides), généralement avec une augmentation de PG et /ou du diphosphatidylglycérol (Russel, 1989). En ce qui concerne la composition en acides gras, on observe une augmentation des acides gras ramifiés dans le cas des bactéries halotolérantes et une diminution dans le cas des halophiles.

#### **4. 4. *Salinibacter ruber***

##### **4. 4. 1. Généralités**

Avant 2002, les halobactéries étaient considérées comme les seuls organismes capables de croître à la concentration saline proche de la saturation du NaCl ( $\approx 37\%$  (p/v)). Une étude de quantification par la méthode FISH, a permis la mise en évidence d'un bacille apparenté au groupe des *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (Antón *et al.*, 1999) dans un bassin de concentration de sel. Il représente 10 à 20 % de la communauté totale. Il a été décrit comme le premier isolat bactérien aérobie halophile extrême dont la croissance est optimale à 20-30 % (p/v) en NaCl. Il s'agit de *Salinibacter ruber* de la

famille des *Crenotrichaceae* (Garrity *et al.*, 2004) (Tableau 4-Annexe 2). La bactérie la plus liée à *Salinibacter ruber* est l'espèce thermophile *Rhodothermus marinus* (89 % de similitude des séquences d'ADNr 16S) (Antón *et al.*, 2002 ; Oren *et al.*, 2004).

#### 4. 4. 2. Analyse génomique et protéomique

Le génome de la souche type M31 de *Salinibacter ruber* a été séquencé (Mongodin *et al.*, 2005). Il est formé d'un chromosome (3 551 823 paires de bases), d'un plasmide (35 505 paires de bases) et comprend deux fractions, une à bas GC (57,9 %) et l'autre à haut GC (66,29 %). Les éléments d'insertions sont situés dans la fraction riche en bases A et T.

L'analyse du génome a permis de fournir une carte quasi-complète de ses voies métaboliques et a mis en évidence plusieurs gènes candidats qui pourraient coder pour des enzymes vitales pour la bactérie ainsi que la présence d'une seule copie de l'opéron ribosomal. Ce dernier est de type procaryote 16S-ARNt (Ile-GAU)-ARNt (Ala-UGC)-23S-5S. L'analyse globale du génome a permis également de faire une estimation prédictive des points isoélectrique (PI) du protéome. Les protéines de *Salinibacter ruber*, ont un PI moyen de 5,2, intermédiaires entre ceux de *Halobacterium* sp. NRC-1 (4,6), *Haloarcula marismortui* (4,6) et de *Bacillus fragilis* (7,0).

#### 4. 4. 3. Physiologie

*Salinibacter ruber* est une bactérie aérobie chmioorganotrophe. Les sucres sont peu utilisés par cette bactérie mais les voies classiques de la glycolyse et d'Entner-Doudoroff semblent présentes (Oren & Mana, 2003). On a mis en évidence la présence de gènes qui pourraient coder pour les enzymes intervenant dans le cycle tricarboxylique et dans la chaîne respiratoire (Mongodin *et al.*, 2005). Aussi ceux intervenant dans le transport ou codant pour la synthèse d'enzymes responsables de la dégradation des composés organiques comme la chitine, la cellulose, l'amidon et la pectine situés sur le chromosome. Le génome de *Salinibacter ruber* contient un groupe de gènes codant pour deux succinate déshydrogénases, la première est similaire à celle des Actinobacteria alors que la seconde est comparable à celle de *Haloarcula marismortui*.

#### 4. 4. 4. Osmoadaptation

Comme pour les archaea halophiles extrêmes de l'ordre des *Halobacteriales*, les protéines de *Salinibacter ruber* présentent un excès d'acides aminés acides et peu de résidus basiques. Il est connu que les résidus acides sont plus hydratés que les autres acides aminés et contribuent donc dans la réorganisation du sel sous forme d'ions hydraté (Dennis & Shimmin, 1997 ; Madigan & Oren, 1999). Il y'a également peu de résidus hydrophobes (Leucine, Valine, Isoleucine, Phénylalanine) (Oren & Mana, 2002) mais un contenu en sérine plus élevé que leur homologues archéens et bactériens halophiles.

Contrairement aux autres membres aérobies halophiles du domaine Bacteria qui accumulent des solutés compatibles, *Salinibacter ruber* accumule plutôt du KCl et par conséquent les enzymes intracellulaires de *Salinibacter ruber* sont capables de fonctionner en présence de fortes concentrations de sels. Cette stratégie est similaire à celle développée par les haloarchaea qui partage le même environnement hypersalin. Cette espèce montre également d'autres similarités tels qu'une exigence élevée pour le sel (pas de croissance en dessous de 15 % (p/v) de NaCl (Oren *et al.*, 2002a).

Un groupe de gènes incluant les systèmes de symport  $\text{Na}^+$ /proline et des transporteurs des acides aminés cationiques similaires à leur homologues d'haloarchaea ont été identifiés dans le génome de *Salinibacter ruber*.

#### 4. 4. 5. Rhodopsines

Le génome de *Salinibacter ruber* contient 4 gènes codant pour des rhodopsines, un précurseur de la bactériorhodopsine, halorhodopsine et deux rhodopsines sensibles. L'halorhodopsine est jusqu'à maintenant l'unique pigment à rétinol présent uniquement chez les haloarchaea et chez cette espèce. Quant aux autres pigments, ils sont rencontrés chez certains membres de bactéries et même dans le domaine des eucaryotes (Gärtner & Losi, 2003).

*Salinibacter ruber* possède un flagelle polaire codé par un groupe de gènes qui montre une grande similitude avec celui des  $\delta$  et  $\epsilon$ -*Proteobacteria* (Mongodin *et al.*, 2005). Balashov *et al.* (2005), ont identifié un nouvel complexe capteur de lumière, la xanthorhodopsine qui non seulement inclue le chromophore rétinol mais aussi utilise une antenne de type caroténoïde (salinixanthine) permettant une meilleure absorption le long d'un grand spectre d'absorbance.

## 5. Biotechnologies des procaryotes halophiles

Ces dernières années les études portant sur les Archaea et les Bacteria ont amené les chercheurs à s'intéresser aux propriétés de microorganismes pouvant se développer dans des conditions extrêmes de pH, de température et de salinité. Outre l'aspect fondamental présenté par ces microorganismes, le désir d'améliorer la connaissance de l'évolution dans les conditions extrêmes ainsi que la recherche de potentialités biotechnologiques. Les archaea halophiles ont surtout été pressenties par les chercheurs pour les caractéristiques suivantes :

L'utilisation du système photobiologique bactériorhodopsine (br), exceptionnellement stable, est envisagée pour fabriquer un système de vision intégré aux nouvelles générations d'ordinateurs et de robots. La br peut aussi être utilisée comme matériel photosensible en optique (Ventosa & Nieto, 1995). De même, les vésicules formées en présence de détergents à partir de *Halobacterium salinarum* peuvent servir dans la conversion de l'énergie lumineuse (Margesin & Schinner, 2001).

La production massive de polyesters (polyhydroxyalcanoates) à partir de l'amidon par les archaea du genre *Haloferax* pourrait servir de plastiques biodégradables. Les poly ( $\beta$ -hydroxy butyrate) (PHB), une réserve de carbone formée par certaines bactéries et haloarchaea (Fernandez-Castillo *et al.*, 1986 ; Lillo & Rodriguez-Valera, 1990 ; Rodriguez-Valera & Lillo, 1992) ont attiré l'attention en tant que polyesters thermoplastiques biodégradables, résistants à l'eau, tolérés et dégradés par les tissus de l'Homme et des animaux (Hrabak, 1992). Cette dernière propriété a rendu possible leur utilisation en tant que biomatériaux dans le domaine médical comme fils de suture ou fixation biorésorbables (Lafferty *et al.*, 1988).

Des exopolysaccharides acides comportant des groupes sulfates et combinant des propriétés rhéologiques excellentes et une résistance remarquable à la salinité, aux températures et aux pH extrêmes sont produits par des espèces de *Haloarcula* et de *Haloferax* (Antón *et al.*, 1989 ; Nicolaus *et al.*, 1999, 2004). Des exopolysaccharides ont des propriétés similaires sont aussi par des bactéries halophiles modérées (Margesin & Schinner, 2001 ; Mata *et al.*, 2006).

La production de solutés compatibles (sucres, bétaines, éctoines) par les bactéries halophiles modérées et halotolérantes peut être utilisée pour la stabilisation des enzymes, de l'ADN et des membranes (Galinski & Lippert, 1991). Aussi des applications sont à répertorier en fermentations et en agriculture (Ono *et al.*, 1999). Des gènes codant pour la synthèse de l'éctoine ont été greffés dans des cultures de cellules de plantes de tabac avec succès. Les plantes transgéniques sont devenues plus tolérantes au choc hyperosmotique (Nakayama *et al.*, 2000).

L'application des halophiles à la biodégradation des composés aromatiques comme le phénol, les hydrocarbures aromatiques polycycliques. Ainsi, *Halomonas halodurans* est capable de dégrader le phénol et de cliver les composés aromatiques complexes, tels que le benzoate (Thomas *et al.*, 1993 ; Margesin & Schinner, 2001). Alors que des espèces archéennes appartenant aux genres *Halobacterium*, *Haloarcula* et *Haloferax* dégradent des n-alcanes et des insecticides (Zvyagintseva *et al.* 1995). Ces capacités les rendent aptes à jouer un rôle dans la décontamination des environnements salins contaminés par les hydrocarbures. L'application des halophiles au traitement des effluents industriels hypersalins générés par les industries chimiques, du cuir, etc. apparaît aussi comme une évidence.

Les liposomes sont utilisés en médecine et en cosmétique pour transporter les composés jusqu'à leur site spécifique. Les liposomes archéens dérivant des lipides à liaison éther ont une stabilité chimique et une résistance aux estérases et aux phospholipases meilleures que ceux dérivant des acides gras (Choquet *et al.*, 1999).

Les halophiles produisent de nombreuses enzymes (protéases, lipases, amylases, etc.) capables de fonctionner en conditions dénaturantes pour les autres protéines. De même, de nombreuses enzymes halophiles sont considérablement thermotolérantes (Oren, 1983a) et demeurent stables à température ambiante pour une longue période. *Halobacterium salinarum* produit une protéase extracellulaire qui peut être un excellent candidat pour la synthèse de peptides contenant particulièrement de la glycine. L'enzyme exige la présence de 4 M de NaCl pour sa stabilité (Ryu *et al.*, 1994). Cependant, l'addition de solutés compatibles la stabilise en solution diluée.

Les enzymes intracellulaires et extracellulaires des bactéries halophiles modérées et halotolérantes ont été caractérisées plus que celles des halobactéries et dont certaines ont

trouvé un intérêt commercial considérable tel que la nucléase H produite par *Micrococcus varians* subsp. *halophilus*. Elle est responsable de la production d'agents de flaveur (Kamekura *et al.*, 1982). De nombreuses bactéries halotolérantes comme *Bacillus* sp. produisent des amylases stables à 60 °C et à 5 M de NaCl et peuvent être ainsi utilisées dans le traitement des effluents contenant des résidus de cellulose et d'amidon.

D'autres applications biotechnologiques sont aussi à envisager comme l'amélioration de la récupération des pétroles dans les nappes profondes hypersalées, la production de  $\beta$ -carotène utilisé dans l'industrie alimentaire comme colorant ou en cosmétique comme précurseur de la vitamine A, la recherche de produits anti-tumoraux, etc. Nul doute qu'avec le développement de la connaissance de ces microorganismes particuliers et intéressants, de nouvelles applications biotechnologiques seront proposées.

## **6. Méthodes pour décrire et accéder à la diversité microbienne**

Le maintien de la biosphère dépend en particulier des processus microbiens qui sont à la base de la vie sur Terre. L'analyse de la diversité microbienne est d'importance pour (i) augmenter nos connaissances de la diversité des ressources génétiques des communautés microbiennes, (ii) comprendre la distribution des microorganismes, (iii) améliorer nos connaissances du rôle fonctionnel des communautés microbiennes, (iv) et ainsi comprendre la régulation de la biodiversité, et estimer dans quelle mesure le maintien de la fonction et la régulation d'un écosystème dépendent du maintien d'un certain niveau de diversité génétique.

### **6. 1. Taxinomie et définition d'espèce**

L'espèce constitue la base du modèle taxinomique. Elle est la catégorie taxinomique la plus basse et sert d'unité pour la description de la biodiversité et de l'évolution. La notion d'espèce a été, actuellement, délimitée par le Comité de taxinomie (Stackebrandt *et al.*, 2002, Kämpfer & Rosselló-Mora, 2004). Rosselló-Mora & Amann (2001), ont proposé de définir l'espèce comme « un groupe monophylétique et génomiquement cohérent d'organismes individuels présentant un niveau de similitude globalement élevé pour de nombreuses caractéristiques indépendantes, et détectable par une propriété phénotypique discriminante ». Donner une définition de l'espèce bactérienne applicable à tous les microorganismes semble impossible, il faudrait pour cela trouver suffisamment de critères

à la fois stables et discriminants qui soient universels et vérifiables. Par conséquent, l'espèce microbienne semblerait plutôt être un concept (Stackebrandt *et al.*, 2002).

### **6. 1. 1. Taxinomie phénétique**

Les premières classifications bactériennes, basées sur la comparaison de critères morphologiques datent de la fin du XIX<sup>e</sup> siècle. Jusqu'au début des années 1960, la définition d'une espèce, est d'une manière générale toute la taxinomie bactérienne, reposait sur une classification phénétique ou phénotypique. Cette classification utilise des caractères tels que la morphologie, la mise en évidence d'un caractère biochimique, l'habitat, le pouvoir pathogène, etc.

### **6. 1. 2. Taxinomie numérique**

Suite au développement des techniques biochimiques analytiques, la classification a été progressivement modifiée en introduisant de nouveaux critères phénotypiques de comparaison. La taxinomie numérique définie par Sneath & Sokal permet de comparer les microorganismes sur la base de caractères morphologiques, chimiques et physiologiques informatifs et de représenter leurs degrés de similitudes sous la forme de dendrogrammes (Rosselló-Mora & Amann, 2001). Les tests phénotypiques fournissent d'utiles informations sur les capacités de l'organisme et peuvent aider à comprendre son rôle dans l'environnement où il vit. Malgré que les caractères biochimiques et physiologiques soient largement employés, il est connu que des souches appartenant à la même espèce n'ont pas forcément le même métabolisme et la même physiologie. Le développement de la phylogénie moléculaire, a donné un nouvel élan dans la taxinomie en apportant un critère de classification supplémentaire. La phylogénie tente d'établir les relations de parenté par comparaison de gènes.

### **6. 1. 3. Taxinomie phylogénétique**

Dès 1936, Kluyver et Van Niel proposaient l'utilisation d'une taxinomie phylogénétique. L'établissement de relations de parentés apparaît comme nécessaire à la mise en place d'une nouvelle systématique. Il a fallu attendre la deuxième moitié du 20<sup>ème</sup>

siècle pour que les outils nécessaires au développement d'une telle taxinomie soient disponibles et qu'une taxinomie phylogénétique commence à se mettre en place.

### Détermination du G+C %

En 1949, Chargaff *et al.* ont montré que le contenu en bases puriques et en bases pyrimidiques de l'ADN pouvait varier d'un individu à un autre mais était constant pour les individus d'une même espèce. Le contenu en base d'un ADN est exprimé par le GC %. Chez les bactéries, cette valeur est très dispersée et varie de 25 à 75 % (Rosselló-Mora & Amann, 2001). Actuellement, on admet que les bactéries dont le contenu G+C diffère de plus de 3 % ne peuvent appartenir à la même espèce. Lorsque cette différence excède 10 %, les deux bactéries appartiennent à des genres différents. Cependant, les valeurs peuvent être identiques sans que les bactéries soient proches (Rosselló-Mora & Amann, 2001).

### Les hybridations d'acides nucléiques

Les hybridations ADN-ADN se sont révélées essentielles pour la définition d'une espèce bactérienne. Leurs réalisations n'ont été possibles qu'après la découverte des phénomènes de renaturation de l'ADN (Marmur & Doty, 1962). Les méthodes d'hybridation ADN-ADN sont basées sur le fait que deux molécules d'ADN dénaturées peuvent se réassocier à condition de présenter une homologie. La renaturation est réalisée à partir d'un mélange de deux ADN dénaturés provenant de deux bactéries différentes. Dans ces conditions, on obtient d'autant plus de duplex hétérologues que les séquences d'ADN des microorganismes sont proches. Une espèce est définie phylogénétiquement comme des souches ayant des valeurs d'hybridation ADN-ADN supérieures ou égales à 70 % et des différences de température de fusion de brins de l'ADN ( $\Delta T_m$ ) inférieures ou égales à 5 °C (Grimont, 1981 ; Rosselló-Mora & Amann, 2001).

### Etude des ARN ribosomaux

En 1980, Kimura émis le concept d'horloge « évolutionnaire » : la vitesse de l'évolution est constante, les mutations qui surviennent dans le génome n'ont pas nécessairement des conséquences phénotypiques mais elles sont étroitement corrélées avec le temps. Il est ainsi possible de construire un arbre phylogénétique en utilisant des

méthodes mathématiques. La généralisation de l'analyse des séquences d'ADNr 16S a incité les auteurs à corrélérer les pourcentages d'identité entre les séquences d'ADNr 16S et les pourcentages de réassociations ADN-ADN. Il a été mis en évidence que des similitudes d'ADNr 16S inférieures à 97 % ne correspondent jamais à des pourcentages de réassociation ADN-ADN supérieures à 60 % (Devereux *et al.*, 1990 ; Fry *et al.*, 1991). Par extension on considère que des isolats dont les séquences ont un pourcentage de similitude inférieur à 97 % n'appartiennent pas à la même espèce (Stackebrandt & Goebel, 1994). S'il est compris entre 93 et 95 %, les deux souches appartiennent à des genres différents (Devereux *et al.*, 1990 ; Whitman *et al.*, 2001). Néanmoins, deux espèces peuvent avoir des séquences des ARNr 16S très proches et être différentes par hybridation ADN-ADN (Dijkshoorn *et al.*, 2000).

L'ADNr 16S utilisé d'une façon généralisée en taxinomie moléculaire présente lui aussi ses limites. Il est suffisamment discriminant pour séparer entre des espèces différentes mais il ne permet de regrouper des espèces identiques. En outre, le nombre de copies de l'opéron *rrn* est variable d'un organisme à l'autre et les gènes codant pour les ARNr 16S peuvent présenter une micro-hétérogénéité au sein des différents opérons *rrn* ; cas de *Haloarcula marismortui* qui possède 3 gènes d'ARNr 16S possédant 5 % de différences (Dennis *et al.*, 1998 ; Kamekura *et al.* 2004).

#### **6. 1. 4. Taxinomie mixte et consensuelle**

Les termes de « polyphasic taxonomy » ont été introduits en 1970 par Colwell pour faire référence à une classification qui tient compte d'un maximum de données. Aujourd'hui, l'intérêt d'une approche polyphasique intégrant les données génotypiques et phénotypiques dans les descriptions d'espèce nouvelle est nécessaire. De même que la détermination du contenu G+C du génome est exigée pour la souche type de la nouvelle espèce (Stackebrandt *et al.*, 2002).

#### **6. 2. L'approche culturelle**

L'étude de la diversité microbienne consiste traditionnellement à cultiver des microorganismes par enrichissement puis isolement avant identification de leurs caractères phénotypiques. Ainsi le phénotype de nombreuses bactéries sera décrit, et plusieurs

classifications parallèles basées sur des critères morphologiques seront établies. Il faudra attendre 1923 pour qu'apparaissent la première classification bactérienne, le *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* compilant les résultats de toutes les études menées auparavant.

Le développement de la taxinomie numérique et des approches polyphasiques ou mixtes et surtout l'apparition de la taxinomie moléculaire (en particulier l'analyse de l'ARN ribosomal ou des gènes codant pour l'ARNr (ADNr) ont permis de redonner un véritable élan à cette discipline.

### **6. 3. L'approche non culturale**

#### **6. 3. 1. Les techniques de quantification**

La quantification des microorganismes peut se faire soit directement soit indirectement après marquage d'un constituant cellulaire donné par un chromophore et observation en microscopie à épifluorescence. Des comptages cellulaires directs à partir d'échantillons naturels sont réalisés sous le microscope en utilisant des cellules de comptage. Des comptages cellulaires peuvent également être effectués après marquage direct des acides nucléiques ou des constituants cellulaires à l'aide d'un fluorophore (DAPI, acridine orange, etc.) ou marquage indirect à l'aide d'anticorps marqué ou d'une sonde fluorescente qui se fixera de façon spécifique sur la cible.

Des techniques culturales sont classiquement utilisées en quantification telles que la technique du NPP (Nombre le Plus Probable) en milieu liquide et la méthode UFC (Unités Formant Colonie) sur milieu solide. Elles permettent de dénombrer les bactéries cultivables.

#### **6. 3. 2. Les biomarqueurs cellulaires**

En dehors des acides nucléiques, les microorganismes comportent d'autres structures pouvant servir de biomarqueurs de taxons. Les biomarqueurs incluent des transporteurs de la chaîne respiratoire (quinone...), des pigments, des constituants de la paroi (acide muramique) et des lipides membranaires.

La technique FAME (Fatty Acid Methyl Ester) est fondée sur l'analyse des profils d'acides gras obtenus par chromatographie en phase gazeuse. Chaque profil est spécifique d'une souche et peut être comparé avec d'autres contenus dans la base de données (Guezennec, 1995 ; Keith-Roach *et al.*, 2002). En plus de l'établissement des profils lipidiques, il est possible de rechercher un ou plusieurs lipides marqueurs spécifiques dont la présence sera caractéristique d'un groupe de microorganismes (Kenada, 1991; Suzuki *et al.*, 1993). Les lipides polaires d'origine archéenne (à liaison éther) sont facilement différenciés de ceux d'origine bactérienne et eucaryote. Ils peuvent caractériser aussi bien les haloarchaea provenant de culture que ceux des communautés naturelles (Oren, 2002a).

### 6. 3. 3. Les acides nucléiques

La connaissance de la diversité microbienne s'est considérablement améliorée ces dernières années grâce aux apports de la biologie moléculaire et de la phylogénie. Amann *et al.* (1996) estiment que 99 % des microorganismes présents dans la nature ne sont pas accessibles par des techniques culturales standard. Les ARN ribosomiaux (5S, 16-18S, 23S), constituent des marqueurs de choix en phylogénie (Woese & Fox, 1977 ; Oren, 1999b). Les domaines de forte conservation sont utilisés dans la comparaison des espèces d'organismes éloignés, tandis que les domaines hypervariables sont plus utiles pour comparer les espèces phylogénétiquement proches (Woese, 1987 ; Winkler et Woese, 1991). Les domaines conservés sont aussi utilisés lors du développement des amorces universelles pour la PCR.

### Le clonage et le séquençage des ADNr 16S

La technique de clonage et de séquençage est l'une des premières techniques à avoir été employée en écologie microbienne pour s'affranchir de toute étape de culture (Amann, 1992 ; Eder *et al.*, 2001 ; Gabor *et al.*, 2003). Elle consiste à extraire l'ADN ou l'ARN total de l'échantillon environnemental, à amplifier spécifiquement les régions codant pour l'ARN ribosomal, puis à cloner le produit d'amplification et enfin, à séquencer et à analyser les clones de la banque. Cette approche moléculaire a permis de découvrir de nouveaux taxons microbiens mais elle est limitée, le gène de l'ARNr 16S représente en moyenne 0,05 % du génome du procaryote (Rodriguez-Valera, 2002) et a peu de valeur pour prédire de la physiologie, du style de vie et des propriétés biotechnologiques ainsi la

culture reste la méthode de choix qui permet de déterminer la physiologie et les interactions écologiques entre les microorganismes de la communauté.

### Les sondes nucléiques

A la différence des techniques d'analyses par extraction et séquençage de l'ADNr 16S, l'utilisation des sondes nucléiques permet d'accéder individuellement à chaque cellule. Cette technique implique la formation d'un duplex entre une sonde nucléique et un ARNr cible. Les sondes peuvent être aussi bien utilisées sur l'ADN fixé sur membrane (Dot ou Slot Blot après Southern), directement sur les colonies de clones, sur des cultures d'enrichissements ou sur des souches pures. De même, elles peuvent être utilisées sur des échantillons naturels (Hybridation *in situ*). Pour marquer la sonde, on utilise soit des radioéléments, soit des enzymes soit des marqueurs fluorescents (fluorescéine, rhodamine, etc.) ; on parle alors de FISH (DeLong *et al.*, 1989 ; Amann *et al.*, 1996, 1997).

A la différence des hybridations sur colonies, les hybridations sur cellules entières (FISH) permettent d'accéder directement à l'ARNr sans endommager la structure pariétale de la cellule et donc d'accéder en plus du caractère phylogénétique ou métabolique lié à la sonde à un caractère morphologique. Des sondes marquées avec un colorant fluorescent sont mélangées à l'échantillon à étudier. Les sondes diffusent dans les cellules et celles marquées peuvent alors être mises en évidence au microscope à fluorescence et quantifiées par comptage. L'hybridation de l'ADN est utile pour la détection rapide de la présence et de la concentration relative de gènes codant pour une fonction spécifique. Alors que l'hybridation des ARN est un indicateur de l'activité du gène cible. Généralement, les sondes spécifiques de l'ARNr sont souvent utilisées car la grande quantité de ribosomes, contenue, dans les cellules, permet d'obtenir un marquage plus intense.

## **6. 4. L'analyse phylogénétique**

### **6. 4. 1. Principe fondamentale**

Dans les années 1970, une révolution a lieu dans la taxinomie, indiquant qu'une classification phylogénétique était possible. De nos jours, on séquence couramment le gène de l'ARNr 16S et plusieurs raisons justifient ce choix. Le gène codant pour la sous unité

16S de l'ARN ribosomal est caractérisé par un faible taux de changements évolutifs, par une taille relativement petite mais qui fournit une information suffisante (environ 1500 paires de bases), par son omniprésence chez tous les organismes vivants cellulaires et par l'alternance de domaines conservés à hypervariables. Pour cette raison il a été choisi comme la base moléculaire pour bâtir la phylogénie du monde vivant (Ludwig & Schleifer, 1994 ; Garrity & Holt, 2001). Les caractères analysés en phylogénie moléculaire sont des séquences d'acides nucléiques ou des séquences d'acides aminés. De nombreux gènes codant pour des séquences de protéines universellement distribuées tels que *gyrB* pour la sous unité B de l'ADN gyrase et *atpD* pour la sous unité B de l'adénosine triphosphatase (ATPase), sont actuellement utilisés pour dresser des arbres phylogéniques. Cette approche offre certains avantages par rapport aux comparaisons d'ARNr. Une séquence de 20 acides aminés donne plus d'informations par site qu'une séquence à trois nucléotides et il est plus pratique d'aligner des séquences protéiques. Cependant, toutes les protéines ne conviennent pas pour étudier les changements car elles évoluent à des vitesses très différentes (Fuerst, 2002 ; Coenye *et al.*, 2005).

#### **6. 4. 2. L'alignement**

La détermination de la position phylogénétique d'une nouvelle bactérie par rapport aux autres nécessite la détermination de la séquence de son ARNr 16S. Cela peut s'effectuer par utilisation de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour amplifier l'ADNr 16S qui peut être séquencé. L'ADN linéaire obtenu est aligné avec celui d'autres organismes connus. Une base de donnée Internationale appelée « Projet de base de données ribosomiques », localisée à l'université de Michigan, contient les séquences des ARNr 16S des organismes qui ont été séquencés téléchargeables sur Internet (<http://rdp.cme.msu.edu/>). Ainsi, la comparaison de la séquence de la bactérie inconnue à celles des autres bactéries de la base de données peut être effectuée. La détermination de la parenté évolutive parmi les organismes (ou phylogénie) peut être obtenue en dressant un arbre phylogénique.

#### **7. Méthodes de reconstruction**

Après avoir aligné les séquences, il faut en déduire la phylogénie. L'analyse phylogénétique repose sur des hypothèses quant à la nature de l'évolution des gènes. Ces

hypothèses ont été modélisées en utilisant des méthodes mathématiques et l'analyse phylogénétique est désormais réalisable grâce à un ensemble de programmes informatiques (package ARB, Phylo\_Win, Phylip, etc.). Les topologies d'arbres obtenus par les différentes méthodes doivent être cohérentes et conduire à un arbre consensus. Les trois méthodes utilisées pour la construction d'arbres sont :

### **7. 1. La méthode du Neighbor-Joining (NJ) (Saitou & Nei, 1987)**

Cette méthode est la plus couramment utilisée en microbiologie (Figure 12). C'est une méthode de distance, basée sur le nombre moyen de substitutions nucléotidiques entre des séquences prises deux à deux. Elle permet de trouver les paires de séquences les plus « voisines » qui minimisent la somme des longueurs des branches à chaque étape de regroupement. C'est une méthode rapide, qui génère un arbre selon l'évolution minimale et donne de bons résultats pour des séquences proches. Elle traite toutes les substitutions de manière équivalente, ce qui fait perdre des informations et ne peut être appliquée à des séquences très éloignées. C'est une méthode de distance qui sous estime le nombre de mutations car les substitutions simplement dénombrées et ne sont pas pondérées. Or, des mutations multiples peuvent se produire. Des corrections ont été faites telle que :

- ✓ Celle de Jukes et Cantor (Jukes & cantor, 1969) qui suppose que toutes les substitutions ont une probabilité égale (les transitions et les transversions ont le même poids).
- ✓ Celle de Kimura (Kimura, 1980) repose sur l'hypothèse que les transitions se produisent à des taux plus élevés que les transversions (le poids des transversions est double par rapport à celui des transitions car le premier type est moins fréquent).

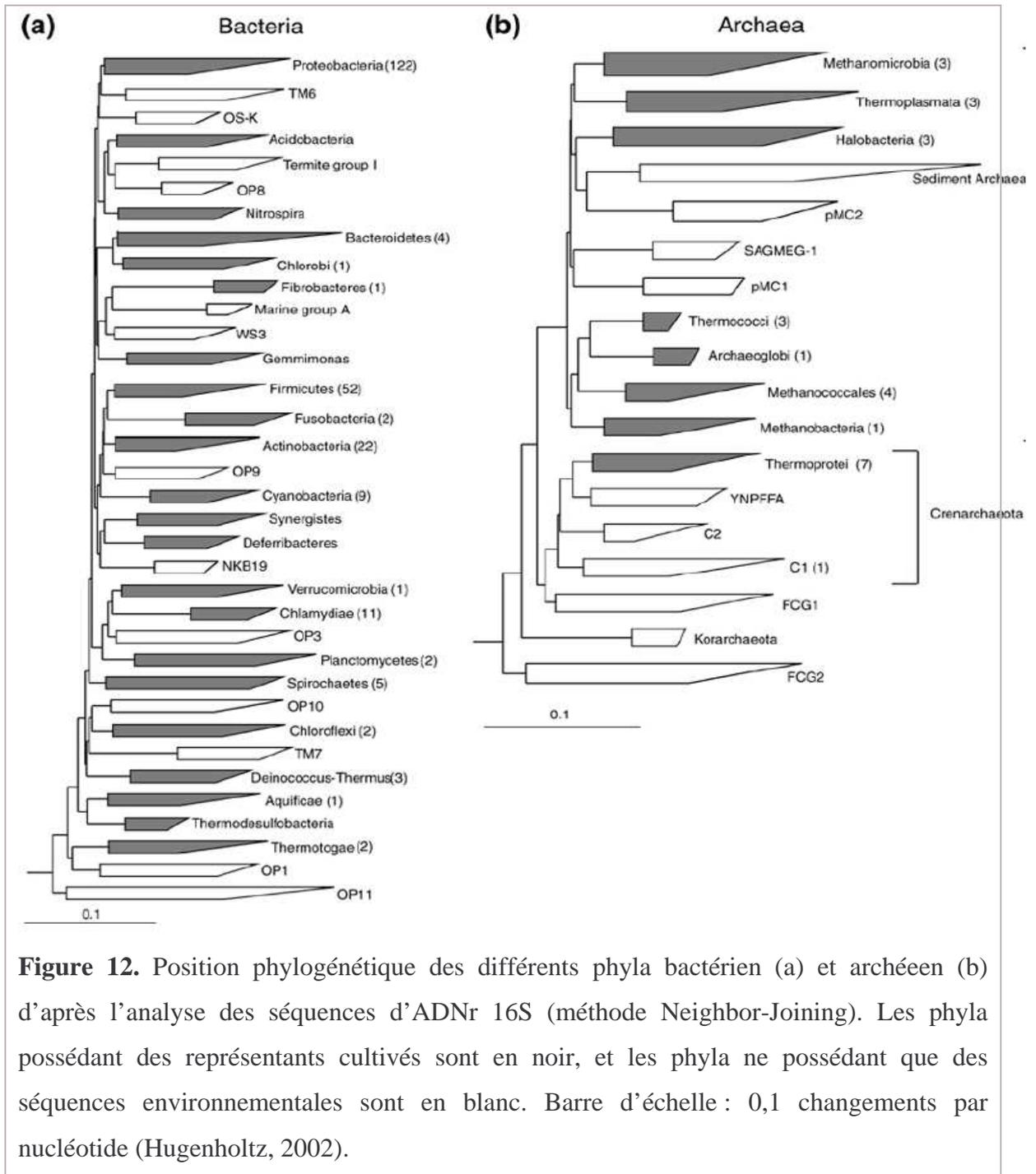
### **7. 2. La méthode du maximum de parcimonie (Fitch, 1971)**

Cette méthode vise à construire l'arbre le plus parcimonieux possible en minimisant le nombre de mutations nécessaires pour passer d'une séquence à une autre. Cette méthode considère que les sites évoluent indépendamment les uns des autres et que ceux présentant des nucléotides identiques sont « non informatifs » et ne peuvent ainsi être pris en compte dans les calculs. Les inconvénients de cette méthode sont multiples. Elle ne s'intéresse

qu'aux positions informatives, ne prend en compte qu'une partie de l'information. Elle ne peut être utilisée lorsqu'il y a un grand nombre de séquences.

### **7. 3. Méthode du maximum de vraisemblance (Felsenstein, 1981)**

La méthode du maximum de vraisemblance « maximum likelihood » est basée sur des théories statistiques élaborées. Elle va calculer la probabilité qu'à chaque branche de se trouver à une position donnée dans l'arbre phylogénétique et estimer sa longueur sous un modèle évolutif donné. Les transitions et les transversions sont pondérées différemment. Cette méthode permet de comparer des séquences éloignées mais ne peut être utilisée lorsque le nombre de séquences est important.



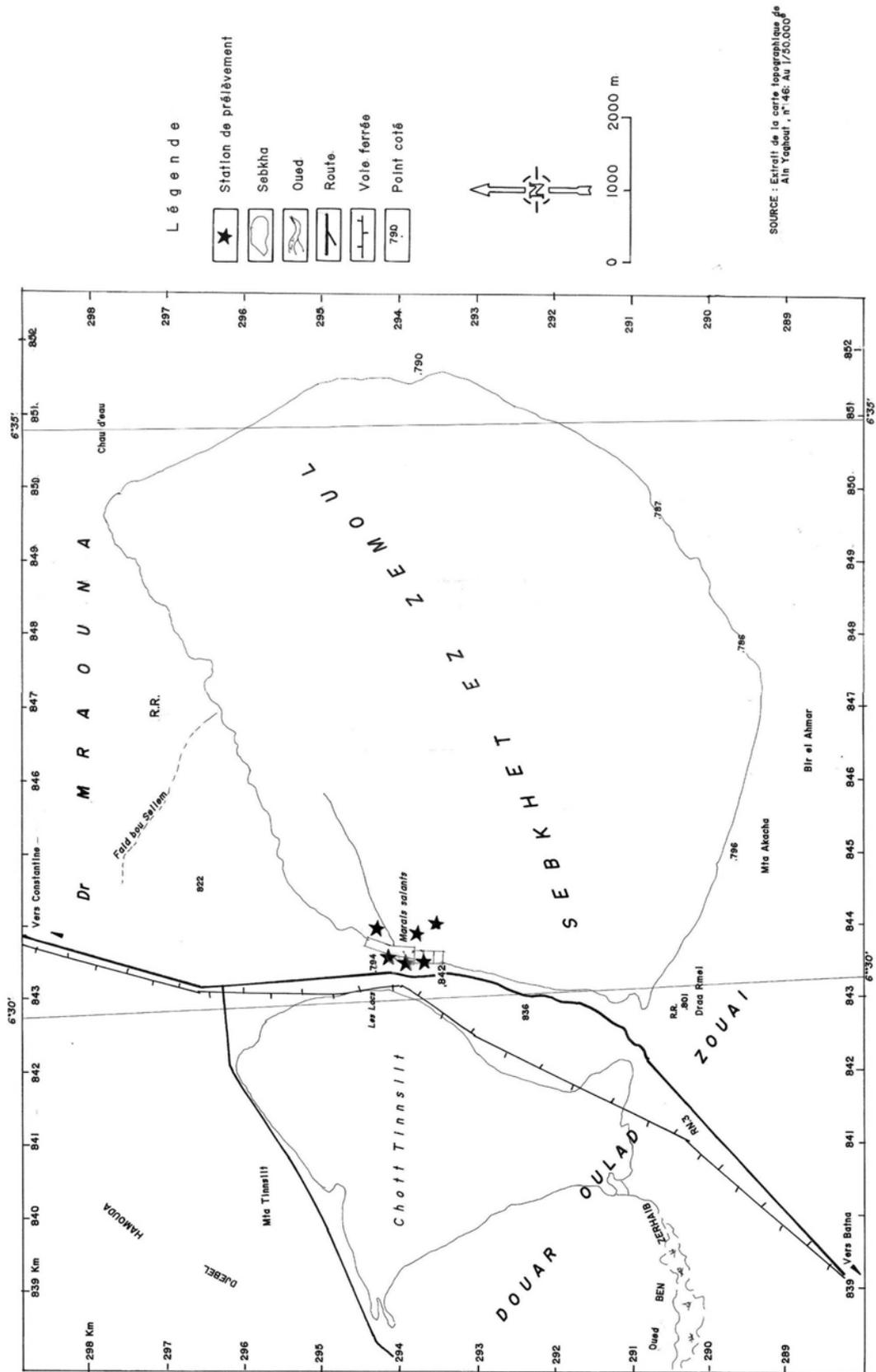


Figure 13. Localisation de la sebkha Ezzemoul.

## 1. Echantillonnage

Les échantillons de saumures ont été prélevés de la sebkha Ezzemoul localisée dans la région de Ain M'Lila (wilaya de Oum El Bouaghi). Elle est située dans la dépression formée par la gamme côtière des montagnes, au Nord, la petite kabylie et au Sud le massif de l'Aurès (longitude 6° 30' à 6° 35' Est, latitude 35° 50' à 35° 55' N). Soit à 800 mètres au Sud-Est de la route nationale principale (N3) reliant Constantine à Batna qui la sépare du chott de Tinnsilt (Figure 13 et 14). Elle a une superficie de 4400 hectare et une profondeur de 0,6 mètre.

Cette sebkha constituée par dépression retenant les eaux météoriques, est selon les définitions usuelles en limnologie, un véritable lac. C'est un type d'environnement athalassohalin largement distribué en Afrique du Nord. Elle est entourée par de la végétation (Figure 15A) et comprend 12 tables salantes (bassins de concentration) et un bassin de cristallisation (Figure 15C, D et F), destinés à la production de sel et connu sous le nom de « salin de Ouled Zouai ».



**Figure 14.** Photo satellitaire prise par Europa Technologie en 2007 (Google earth.com)

## **2. Isolement, purification et conservation des souches**

Des approches culturales et moléculaires ont été étudiées afin d'identifier la microflore isolée de la sebkha Ezzemoul. Les prélèvements ont été effectués au niveau des bassins de concentration et de cristallisation du sel.

### **2. 1. Composition chimique des milieux de cultures utilisés**

Il est connu que les bactéries hyperhalophiles ont des exigences nutritionnelles variables et leur étude nécessite l'utilisation de plus d'un milieu de culture (Oren *et al.*, 1997). Une dizaine de milieux spécifiques aux procaryotes neutrophiles et alcalophiles a été utilisés au départ avant d'opter pour sept milieux de culture. Ces milieux contiennent des sels minéraux, une source organique complexe (extrait de levure, casaminoacide...), des acides organiques et/ou des sucres (Tableau 5-Annexe 3). Ils sont conçus pour cultiver le plus grand nombre de procaryotes halophiles aérobies. Ces milieux ont servi, à la fois, pour l'isolement, et aussi de base pour les tests d'identification physiologique, biochimique et génétique.

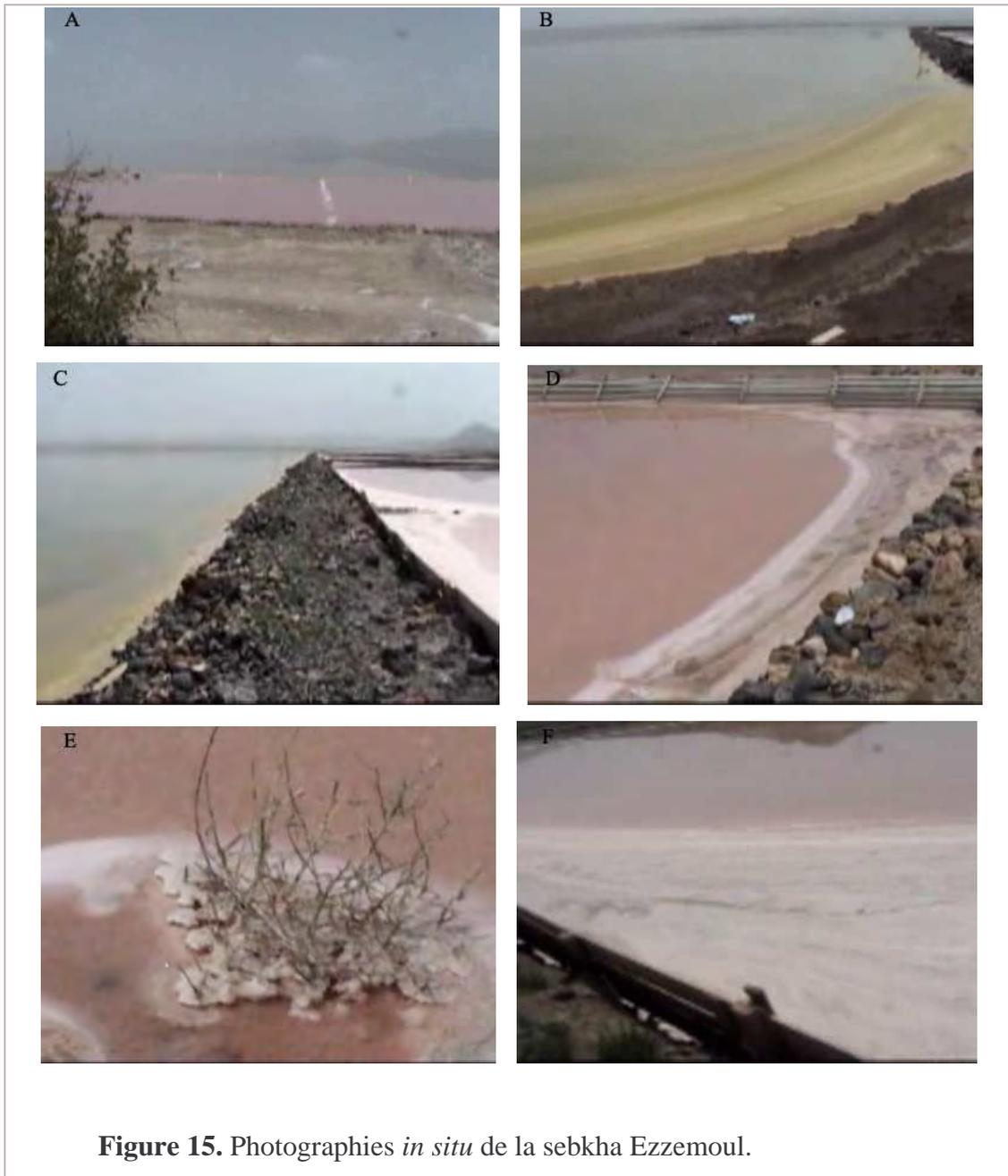
Les milieux de culture solides sont obtenus par addition de 20 g.l<sup>-1</sup> d'Agar-Agar aux milieux liquides et stérilisés à 120°C pendant 20 minutes. Le pH est ajusté à 7,0 à l'aide d'une solution de NaOH 4 M.

### **2. 2. Isolement**

L'isolement a été effectué par étalement de 0,1 ml sur boîte de l'échantillon ou de ses dilutions. Ces dernières ont été effectuées en inoculant 9 ml d'une solution de NaCl à 20 % (p/v) avec 1 ml d'échantillon.

### **2. 3. Conservation des souches**

De chaque milieu, huit à neuf colonies d'aspect différent ont été prélevées au et purifiées par stries sur les même de milieux solides. Les souches pures sont conservées sur



gélose inclinée à 4°C pendant trois mois ou en milieu liquide contenant 10 à 15 % de glycérol à – 80°C (Tindall, 1992).

#### **2. 4. Souches de référence**

Les souches types archéennes et bactériennes utilisées lors de ce travail sont répertoriées dans le Tableau 6. Leur culture a été faite sur le milieu HE de Torreblanca *et al.* (1986) à concentration saline finale de 25 % (p/v) et supplémenté de 0,1 % (p/v) de glucose (Tableau 5-Annexe 3).

### **3. Identification des souches purifiées**

L'identification des souches est faite sur la base des tests proposés par Oren *et al.* (1997) pour la description de nouveau taxon dans l'ordre des *Halobacteriales*.

#### **3. 1. Caractérisation morphologique des souches et de leurs colonies**

L'aspect macroscopique est déterminé sur milieu solide spécifique pour chaque souche après 5 jours d'incubation à 37°C. La coloration de Gram a été effectuée selon la technique modifiée par Dussault (1955) par application, après fixation, d'une solution d'acétate à 2 % (v/v) pendant 5 minutes.

Pour la coloration négative, une goutte d'une culture en croissance exponentielle est déposée sur une grille de cuivre. Après séchage, la préparation est colorée par une solution d'acétate d'uranyle (2 % dans l'eau distillée) durant 1 minute. Après séchage de 10 minutes à température ambiante, les grilles sont observées à l'aide d'un microscope électronique en transmission Zeiss EM 902 à 60 kV.

**Tableau 6.** Souches de référence utilisées.

Espèce	Souche	Source
<i>Halobacterium salinarum</i>	DSM 3754	DSM
<i>Halococcus morrhuae</i>	NRC 51001	NRC
<i>Halorubrum trapanicum</i>	NRC 34021	NRC
<i>Halorubrum coriense</i>	DSM 10284	DSM
<i>Halorubrum distributum</i>	JCM 9100	JCM
<i>Halorubrum xinjiangense</i>	JCM 12388	JCM
<i>Halorubrum terrestre</i>	JCM 10284	JCM
<i>Halorubrum sodomense</i>	DSM 3755	DSM
<i>Halorubrum tebenquichense</i>	CECT 5317	CECT
<i>Halorubrum lacusprofundi</i>	DSM 5036	DSM
<i>Halorubrum saccharovororum</i>	DSM 1137	DSM
<i>Haloarcula marismortui</i>	DSM 3752	DSM
<i>Haloarcula vallismortis</i>	DSM 3757	DSM
<i>Haloarcula hispanica</i>	DSM 4426	DSM
<i>Haloferax mediterranea</i>	ATCC 33500	ATCC
<i>Haloterrigena turkmenica</i>	DSM 5511	DSM
<i>Pseudomonas halophila</i>	DSM 3050	DSM
<i>Halovibrio denitrificans</i>	DSM 15503	DSM
<i>Halospina denitrificans</i>	DSM 15505	DSM
<i>Salicola marasensis</i>	CECT 7107	CECT

DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen; NRC, National Research Council, (Ottawa, Canada); JCM, Japanese Center of Microorganisms; CECT, Centro Espanola de Collection Typo; ATCC, American Type Culture Collection

Pour la microscopie électronique à balayage, les cellules sont fixées par une solution de formaldéhyde à 10 % (v/v) pour 1 heure puis récupérées par centrifugation à  $1\,000 \times g$  durant 20 minutes. Le pellet est resuspendu dans une solution en NaCl à 2,3 % (p/v). Une goutte est placée sur un filtre Nucléopore 13 mm en polycarbonate (dimension des pores 0,22  $\mu\text{m}$ ) et séchée pendant une nuit à température ambiante. Le spécimen est ensuite examiné au microscope électronique à balayage (XL 30 LaB6, Philips).

### 3. 2. Ultrastructure interne des souches

Elle a été révélée à partir de l'observation de coupes minces des isolats en microscopie électronique en transmission obtenue après croissance des souches sur leur milieu respectif.

Les cellules sont récupérées par centrifugation à partir de culture en phase exponentielle. Elles sont ensuite progressivement déshydratées par immersion successive dans des solutions aqueuses d'éthanol de titre croissant jusqu'à 100 %. La préparation est incluse dans une résine, puis découpée en fines sections à l'aide d'un ultra microtome. Les coupes ultrafines sont colorées par des solutions d'acétate d'uranyle et de citrate de plomb. Elles sont placées sur des grilles et observées au microscope électronique en transmission Zeiss EM 902 à 80 kV.

### 3. 3. Caractérisation physiologique

Les milieux de cultures utilisés lors de la caractérisation des souches sont ceux précédemment décrits et les tests utilisés lors de l'identification des souches sont ceux cités pour la description de nouveaux taxons par Oren *et al.* (1997).

L'influence sur la croissance de la température, du pH et de la concentration en sel est déterminée en variant un des paramètres alors que les deux autres sont maintenus constants. Pour chacun des paramètres, la gamme pour laquelle une croissance est observée a d'abord été déterminée. Cette étude est faite par ensemencement d'un milieu solide par 0,1 ml de culture en phase de croissance exponentielle.

#### ❖ Salinité

Les milieux solides à pH 7,0 contenant des concentrations finales variables en NaCl de 0,0 ; 2,5 ; 5,0 ; 7,5 ; 10,0 ; 12,5 ; 15,0 ; 17,5 ; 20,0 ; 25,0 et 30,0 % (p/v) (Colwell *et al.*, 1979). L'exigence minimale en  $Mg^{2+}$  est réalisée sur milieu solide additionné de quantités variables de  $MgCl_2$  : 0 ; 0,005 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 et 3,2 % (p/v) (Rodriguez-Valera *et al.*, 1983). L'incubation des boîtes est faite à 37°C.

#### ❖ **Température**

L'incubation des milieux solides à pH 7,0ensemencés a lieu à 4 ; 22 ; 30 ; 37 ; 40 ; 50 ; 55 et 60°C (Rodriguez-Valera *et al.*, 1980)

#### ❖ **pH**

L'intervalle de pH de croissance a été déterminé par ensemencement de milieux gélosés, sans tampon (pH varie de 4,8 à 5,0), additionné de 50 mM de tampon MOPS (pH de 6,0 à 7,0), de HEPES (pH de 7,5 à 8,0) et de Tris (pH de 8,0 à 9,0) (Stan-Lotter *et al.*, 2002).

#### ❖ **Utilisation de substrats carbonés**

Les milieux solides précédents dépourvus de toute source organique, additionnés de  $NH_4Cl$  (0,5 g.l<sup>-1</sup>), de  $KH_2PO_4$  (0,005 g.l<sup>-1</sup>), de tampon et dont le pH a été ajusté à 7,0. Les substrats sont rajoutés à une concentration finale de 1 % pour les sucres et 0,1 % pour les alcools, les acides organiques et les acides aminés (Oren *et al.*, 1997).

Glucose, lactose, xylose, galactose, fructose, arabinose, mannose, rhamnose, maltose, saccharose, amidon, salicine, cellulose, adonitol, dulcitol, glycérol, mannitol, sorbitol, inositol, propionate, oxalate, acétate, succinate, malonate, benzoate, malate, formiate, fumarate, lactate, citrate, arginine, alanine, asparagine histidine, leucine, cystine, glycine, tryptophane, tyrosine et méthionine.

#### ❖ **Production d'acides à partir de substrats carbonés**

La production d'acides à partir des sucres et d'alcools est faite sur les milieux liquides précédemment décrits non tamponnés. L'acidification du milieu après culture est mesurée par un pH-mètre.

### **3. 4. Caractérisation biochimique**

La réduction des nitrates est détectée par utilisation d'acide sulphanilique et  $\alpha$ -naphthylamine selon Smibert et Krieg (1981). La production d'indole et l'hydrolyse de l'amidon et de l'esculine sont réalisées selon la méthode décrite par Gonzalez *et al.* (1978). L'hydrolyse de la gélatine, du Tween 20, du Tween 40, du Tween 60 et du Tween 80 est testée selon la technique de Gutiérrez et Gonzalez (1972). La production de la catalase et du cytochrome oxydase est étudiée selon Gerhardt *et al.* (1994). La croissance en anaérobiose sur L-arginine est mesurée par turbidimétrie à 600 nm en milieu liquide à raison de 5 g. l<sup>-1</sup> d'Arginine-HCl (Oren & Litchfield, 1999).

### **3. 5. Sensibilité aux antibiotiques**

Cette étude est réalisée par utilisation de disques imprégnés d'antibiotiques (Oren *et al.*, 1997 ; Duckworth *et al.*, 2000). La souche est considérée sensible si la zone d'inhibition dépasse au moins deux mm autour du disque après 14 jours d'incubation à 37°C (Bonelo *et al.*, 1984). Les antibiotiques étudiés sont : la pénicilline (10 UI), le chloramphénicol (30  $\mu$ g), l'ampicilline (30  $\mu$ g), la rifampicine (30  $\mu$ g), la streptomycine (10 UI), la néomycine (30  $\mu$ g), la novobiocine (30  $\mu$ g) et la bacitracine (10  $\mu$ g).

### **3. 6. Chimiotaxonomie**

#### **3. 6. 1. Analyse des lipides polaires membranaires archéens**

Les lipides polaires membranaires archéennes sont extraits et analysés par chromatographie sur couche mince selon la méthode décrite par Oren *et al.* (1996).

20 ml de culture sont centrifugés pendant 15 minutes à  $12\,000 \times g$  et à  $4^{\circ}\text{C}$ . Le pellet est suspendu dans 1 ml d'eau distillée puis extrait par 3,75 ml d'un mélange méthanol-chloroforme (2 : 1, v/v). Après agitation pendant 4 heures, le surnageant est récupéré par centrifugation à 3 500 rpm pendant 10 minutes. Le pellet est extrait de nouveau par 4,75 ml d'un mélange méthanol-chloroforme-eau (2 : 1 : 0,8, v/v). Le surnageant est récupéré par centrifugation. On rajoute 2,5 ml de chloroforme et 2,5 ml d'eau distillée aux deux surnageants suivi d'une centrifugation à 3 500 rpm pendant 10 minutes, puis récupération de la phase profonde correspondant à la phase chloroforme et qui contient la fraction lipidique. Cette dernière est additionnée de 0,5 ml de benzène et le mélange obtenu est concentré à sec au rotavapor. Après évaporation, le produit est repris dans un petit volume de chloroforme.

Les lipides polaires sont séparés par chromatographie en une et deux dimensions sur plaques recouvertes d'une mince couche de gel de silice (Aldrich,  $20 \times 20$ ).

➤ Chromatographie monodirectionnelle

Le système solvant est un mélange de chloroforme-méthanol-acétate-eau (85 : 22,5 : 10 : 4, v/v).

➤ Chromatographie bidimensionnelle

Dans la première dimension, le système solvant est un mélange de chloroforme-méthanol-eau (65 : 25 : 4, v/v) et dans la seconde, il contient un mélange de chloroforme-méthanol-acétate-eau (80 : 12 : 15 : 4, v/v).

La révélation est faite après migration et séchage des plaques. Les spots de glycolipides sont détectés par pulvérisation de 0,5 % (p/v) de  $\alpha$ -naphthol dans 50 % (v/v) de méthanol, puis de 5 % (v/v)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  dans l'éthanol suivi d'un chauffage à  $150^{\circ}\text{C}$  (Oren, 1996) (Annexe 4).

Les phospholipides sont détectés par pulvérisation du réactif molybdate d'ammonium dans l'acide sulfurique (Kates, 1972) (Annexe 4).

Des extraits de lipides de souches témoins, *Halobacterium salinarum* DSM 3754<sup>T</sup>, *Haloarcula hispanica* DSM 4426<sup>T</sup>, *Halococcus morrhuae* NRC 51001<sup>T</sup>, *Haloferax mediterranei* ATCC 33500<sup>T</sup>, *Halorubrum coriense* DSM 10284<sup>T</sup> et *Haloterrigena turkmenica* DSM 5511<sup>T</sup> ont été utilisés.

### **3. 6. 2. Extraction et caractérisation de la bactériorubérine**

La bactériorubérine est présente chez les haloarchaea et peut être extraite et caractérisée. C'est un type de lipides neutres, dérivé isoprénoïde. Cette analyse a été effectuée selon la technique décrite par Gochnauer *et al.* (1972).

20 ml d'une culture en phase exponentielle est centrifugée pendant 10 minutes à  $12\ 000 \times g$ . Le pellet est extrait par 1 ml d'un mélange méthanol-acétone 1 : 1 (v/v). Après 4 heures d'agitation, le spectre d'absorption du mélange est déterminé par un spectrophotomètre sur une longueur d'onde de 300 à 700 nm.

### **3. 6. 3. Analyse des acides gras membranaires bactériens**

L'analyse des acides gras de la souche bactérienne B2 a été effectuée par l'équipe du Professeur Reiner M. Kroppenstedt du DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) à partir de cellules lyophilisées et broyées sous forme de poudre. La poudre est traitée par un mélange de chloroforme-méthanol (80-20, v/v), puis le résidu subi une méthanolyse en milieu basique par addition de 20 ml de méthanol-KOH (1M). Le mélange est mis à reflux pendant deux heures.

La partie insoluble est filtrée et rincée avec 20 ml de méthanol. Au filtrat, on ajoute 120 ml d'HCl à 10 % et 120 ml d'eau. Les lipides libérés par attaque basique et incluant les esters méthyliques d'acides gras sont ensuite extraits du milieu réactionnel (à raison d'un aliquote de 50 ml) par 150 ml d'heptane. La phase organique est lavée à l'eau jusqu'à pH neutre. Elle est ensuite récupérée dans un erlenmeyer, et séchée par addition de 50 g de sulfate de sodium. Après filtration et évaporation du solvant, le produit est repris dans environ 5 ml d'heptane. Cette fraction est prête pour l'analyse en chromatographie en phase gazeuse. Les esters méthylés des acides gras ont été identifiés en comparant les temps de rétention d'acides gras connus.

## **3. 7. Etude phylogénétique**

### **3. 7. 1. Extraction de l'ADN total**

➤ **Technique 1 (Marmur, 1961)**

Les cellules contenues dans 200 ml de culture ont été récupérées par centrifugation à 4°C pendant 15 minutes à 8 000 rpm. Le culot est lavé deux fois par une solution de NaCl à 25 % (p/v) suivi de centrifugation dans les conditions déjà décrites. Le culot est dissous dans 50 ml d'eau MilliQ stérile additionné de SDS à 25 % (p/v) pour avoir une concentration finale de 1 %. Le tout est placé dans un bain marie à 60°C pendant 10 minutes. Les lysats sont placés sur la glace. Une solution de NaCl 5 M est rajoutée pour avoir une concentration finale de 1 M. On ajoute 1 volume de chloroforme et l'ensemble est centrifugé à 7 000 rpm pendant 15 minutes. 0,1 volume d'acétate-Na (3 M, pH 5,2) et 2 volumes d'éthanol froid sont rajoutés au surnageant. Le tout est placé à - 20°C durant 30 minutes. La pelote est récupérée et resuspendue dans 4 ml de 0,1 × SSC puis 20 × SSC pour avoir une concentration finale de 1 M. Ajouter 100 µl d'une solution d'ARNase (60 µg/ml) et le tout est incubé pendant 2 heures à 60°C. Ajouter 50 µl d'une solution de protéinase K (10 mg/ml) et le tout est incubé à 37°C pour 1 heure. Un volume de chloroforme est ajouté, suivi d'une centrifugation à 3 200 rpm pendant 10 minutes pour séparer entre les deux phases. Le surnageant est récupéré dans un nouveau tube et l'ADN est extrait par 0,1 volume d'acétate-Na (3 M pH 5,2) et 0,56 volume d'isopropanyl. L'ADN libéré est dissout dans 500 µl d'eau MilliQ. L'ADN a été purifié par une extraction avec 250 µl de phénol et 250 µl de chloroforme suivi d'une centrifugation à 13 000 rpm pendant 5 minutes. Le surnageant est précipité par 0,1 volume d'acétate-Na (3 M pH 5,2) et 2 volumes d'éthanol absolu froid. Le tout est placé à - 20°C durant 24 heures. L'ADN a été obtenu sous forme de culot suite à une centrifugation à 13 000 rpm pendant 15 minutes. Le culot est resuspendu dans 500 µl d'éthanol 70 % (v/v) (lavage de l'ADN et élimination des sels). Centrifugation pendant 15 minutes à 13 000 rpm. Le culot d'ADN est séché à l'air à température ambiante, repris dans 500 µl d'eau MilliQ stérile et conservé à - 20°C.

➤ **Technique 2 (Marmur, 1961 modifiée par Lind & Ursing, 1986)**

La seconde méthode d'extraction et de purification de l'ADN utilisée est celle décrite par Lind et Ursing (1986) qui est une modification de la technique de Marmur (1961) et applicable aux halobactéries.

200 ml de culture en phase exponentielle sont centrifugés durant 20 minutes à 9 000 rpm et à 4°C dans une centrifugeuse de type Sorvall RC 5B. Le culot est lavé deux fois par une

solution de NaCl à 25 % (p/v) suivi de centrifugation dans les conditions décrites précédemment.

Les cellules sont resuspendues dans 20 ml d'eau distillée, agitées rigoureusement et incubées à 37°C jusqu'à observation de la lyse cellulaire. On ajoute 1 volume de chloroforme, l'ensemble est agité durant 30 minutes puis centrifugé à 7 000 rpm pendant 15 minutes. Le surnageant est prélevé et précipité par 2 volumes d'éthanol froid à 96°. Incubation à - 20°C pendant 24 heures. La pelote est récupérée et resuspendue dans 4 ml de 0,1 × SSC, puis addition de 200 µl de 20 × SSC. Par la suite, 100 µl d'ARNase (60 mg/ml) sont rajoutés, puis l'ensemble est incubé à 60°C pendant 2 heures. On ajoute 50 µl de protéinase K (10 mg/ml) et on laisse 2 heures à 37°C (digestion des protéines). Addition d'un volume de chloroforme et centrifugation à 3200 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant est récupéré et l'ADN est précipité par 0,1 volume d'acétate-Na (3 M pH 5,2) et 0,56 volume d'isopropanol. L'ADN est récupéré et resuspendu dans 1 ml d'eau MilliQ stérile puis conservé à - 20°C.

### 3. 7. 2. Contrôle de la pureté et détermination de la concentration de l'ADN en solution

La pureté de l'ADN est évaluée par mesure des rapports  $Abs_{260}/Abs_{280}$  et  $Abs_{260}/Abs_{230}$ . Idéalement, le rapport  $A_{260}/280$  doit être compris entre 1,8 et 2,0. Un rapport inférieur à 1,8 indique une contamination par des protéines ou du phénol et lorsqu'il est supérieur à 2,0, la contamination est due à la présence d'ARN. Le rapport  $A_{260}/230$  doit être compris entre 0,3 et 0,9. Il est supérieur à 0,9 lors d'une contamination par des sels.

La concentration de l'ADN peut être calculée par mesure d'absorbance à 260 nm, longueur d'onde à laquelle une unité de DO correspond à 50 µg /ml double brin ou 40 µg /ml d'ADN simple brin. Elle a lieu dans un Biophotometer Eppendorf-high ray light.

$$\text{Concentration } (\mu\text{g/ ml}) = \text{Abs}_{260} \times 50 \times \text{volume du mélange} / \text{volume de l'ADN}$$

Volume du mélange : volume d'ADN + volume d'eau MilliQ.

### 3. 7. 3. Détermination du contenu en G+C de l'ADN génomique

Le contenu en guanine et cytosine de l'ADN génomique des souches est déterminé par la méthode de dénaturation thermique selon Marmur et Doty (1962). En effet, lorsque l'ADN natif est soumis à un agent dénaturant comme la température, la double hélice se sépare. Cette modification se traduit par une augmentation de l'absorbance à 260 nm. Un système analyseur ; programmeur de température et enregistreur de type recorder R 100A couplé à un spectrophotomètre de type Perkin-Elmer UV-Vis Lambda 3B a été utilisé. Il permet de suivre les variations de densité optique de la solution de l'ADN en fonction de la température. La température de fusion  $T_m$  « pour melting temperature » est celle qui correspond à une augmentation de la DO atteignant 50 % de la DO maximale. Elle est déterminée par la méthode graphique décrite par Ferragut et Leclerc (1976). Le contenu en G+C est calculé à partir du  $T_m$  selon l'équation de Owen et Hill (1979) dans un tampon SSC 1× (0,15 M NaCl et 0,015 M tri-sodium citrate, pH 7,0).

$$T_m = 69,3 + 0,41 (G+C)$$

### 3. 7. 4. La Réaction de Polymérisation en Chaîne ou technique PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction) consiste à amplifier sélectivement une séquence particulière d'ADN par action d'une ADN polymérase thermostable. L'amplification s'effectue sur un fragment d'ADN à partir de deux amorces oligonucléotidiques s'appariant spécifiquement aux extrémités des deux brins complémentaires qui délimitent la partie d'ADN à amplifier.

#### ➤ Amplification des séquences des ADNr

Le marqueur moléculaire choisi dans cette étude phylogénétique est le gène ribosomal 16S. Très représenté dans les banques de données, ce marqueur nous permettra d'affilier nos séquences à un groupe d'organismes connus.

Les gènes codant l'ARN ribosomal 16S des haloarchaea sont amplifiés par utilisation de deux paires d'amorces (ou primers) : le premier jeu : amorce directe F8 et la reverse 1462R (Lizama *et al.*, 2002) et le second jeu d'amorce : directe 21F (DeLong, 1992) et la

reverse 1525R (McGenity *et al.*, 1998). Pour les bactéries, les amorces utilisées pour l'amplification du gène de l'ARNr 16S sont 16F27 et 1525R, décrits par (Saiki *et al.*, 1988) (Tableau 7).

**Tableau 7.** Spécificité et description des amorces d'amplification.

Amorces	Localisation	Séquence	Spécificité	
<b>Sens</b>	<b>Forward</b> (8-		Archaea	Bacteria
F8	29)	5'-TTGATCCTGCCGGAGGCCATTC-3'	+	
21F	(7-26)	5'- TTCCGGTTGATCCTGCCGGA -3'	+	
16F27	(8-27)	5' - AGAGTTTGATCMTGGCTCAG -3'		+
<b>Sens</b>	<b>Reverse</b>			
1462R	(1462-1441)	5'- ATCCAGCCGCAGATCCCCCTAC -3'	+	
1525R	(1541-1525)	5' - AAGGAGGTGATCCAGCC -3'	+	+

$T_m$  est définie comme la température de fusion du primer et estimée par l'équation de Suggs *et al.* (1981).

$$T_m = 4N_{G+C} + 2N_{A+T}$$

$N_{G+C}$   $N_{A+T}$  est la somme des nucléotides A, C, G et T.

L'amplification est réalisée pour un volume de 50  $\mu$ l dans un thermocycleur de type Perkin-Elmer Modèle 480 selon les cycles correspondant à chaque paire d'amorces. La composition du milieu de réaction et les cycles employés figurent les tableaux 8 et 9.

**Tableau 8.** Mélange réactionnel.

Composés	Volumes ( $\mu$ l)
ADN	1
Tampon (100 mM Tris/HCl, pH 8,3 ; 500 mM KCl) (Perkin Elmer)	5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM) (Perkin Elmer)	3
Taq polymérase (Amplitaq DNA polymerase, Perkin Elmer)	0,25
dNTPs (Ultrapure dNTP set, Pharmacia Biotech, cat. 27-2035-01)	1
Amorce F (20 pmol/ $\mu$ l) (Perkin Elmer)	1
Amorce R (20 pmol/ $\mu$ l) (Perkin Elmer)	1
Eau MilliQ	38,75

**Tableau 9.** Cycles employés.

Paires d'amorces	Pré dénaturation	Dénaturation	Association	Elongation	Fin d'amplification
F8/1462R		1 min à 94°C	1 min à 55°C	2 min à 72°C	10 min à 72°C
21F/1525R	5 min à 94°C	30s à 95°C	1 min à 53°C	1 min 30s à 72°C	1 min à 72°C
16F27/1525R	5 min à 95°C	30s à 95°C	1 min à 55°C	1 min 30s à 72°C	1 min à 72°C

➤ **Electrophorèse sur gel d'agarose et purification des produits de la PCR**

Pour s'assurer de la qualité et de la spécificité de l'amplification, une électrophorèse des produits de PCR est effectuée sur un gel d'agarose-TAE (Tris-HCl 1,6 mM ; acétate de sodium 1,6 mM ; EDTA 0,04 mM (pH 8) ; agarose 1 % (p/v) ; bromure d'éthydiuim (0,5 µg/µl). Les produits de la PCR sont additionnés de 0,1 % d'une solution de dépôt (bleu de bromophénol 0,25 % (p/v) ; xylène cyanol 0,25 % (p/v) ; EDTA 25 mM ; glycérol 50 % (v/v)). La migration se fait dans un tampon TAE, sous une tension de 100 volts. L'électrophorèse est suivie grâce au dépôt dans un puit d'un marqueur ou « ladder » (Amplisize™ Molecular Ruler de 2000 à 50 paires de bases). Les fragments d'ADN sont visibles aux UV à 300 nm grâce aux BET contenu dans le gel et qui s'insère entre les plateaux de base de l'ADN. Le gel est ensuite photographié sur une table UV.

Le séquençage de l'ADN produit par PCR nécessite une étape de purification éliminant les impuretés consécutives aux réactions antérieures. Dans ce but, nous avons utilisé les MicroSpin Columns (Microcon-100 concentrator, Amicon) qui permettent de récupérer 50 à 90 % de l'ADN initialement présent avec un taux de pureté de 70 à 90 %, selon les estimations du fabricant.

➤ **La réaction de séquence et le séquençage**

La technique de séquençage utilisée est adaptée de celle décrite par Sanger *et al.* (1977).

Elle est basée sur l'incorporation de didésoxynucléotides. La polymérase permettant l'amplification du gène d'intérêt est mise en présence d'oligonucléotides non marqués (dNTP) et de didésoxynucléotides (ddNTP) marqués par des fluochromes différents selon leur nature. L'incorporation d'un ddNTP entraîne l'arrêt de l'élongation. Ainsi, on obtient théoriquement des séquences d'ADN de toutes tailles dont le dernier nucléotide est fluorescent.

La réaction de séquence utilise la chimie du « Big Dye Terminator » (Applied Biosystem) selon les recommandations du fabricant. La solution commerciale « Big Dye Terminator » contient les dNTP, les ddNTP marqués ainsi que l'ADN polymérase. Le mélange réactionnel pour une réaction contient : le tampon de dilution du Big Dye 0,75 µl, la solution Big Dye 0,5 µl ; l'amorce 5 pmol ; le produit PCR 30 à 50 ng et l'eau MilliQ 5 µl. la réaction s'effectue dans un thermocycler.

Les amorces utilisées pour le séquençage des séquences issues de souches d'archaea halophiles sont semblables à celles utilisées pour l'amplification de l'ADNr 16S. Tandis que pour les bactéries halophiles, des amorces supplémentaires internes décrites par Lane *et al.* (1991) sont utilisées afin de couvrir la totalité de la séquence de la molécule. Ces amorces sont :

16SF357 : 5' - CTCCTACGGGAGGCAGCA -3'

16SR519 : 5' - GWATTACCGCGGCKGCTG -3'

16SF945 : 5' - GGGCCCCGCACAAGCGGTGG -3'

Les produits amplifiés sont ensuite purifiés avec le kit « Montage SEQ Sequencing Reaction Cleanup » (Millipore).

Le séquençage a été effectué par le laboratoire du génome à Grenade (Espagne) selon le protocole Applied Biosystems sur le séquenceur automatique (ABI-Modèle 373).

### ➤ Analyse des séquences

Dans un premier temps les séquences des gènes des ARNr 16S obtenues ont été soumises à une recherche d'homologie de séquences en utilisant le programme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) sur le site NCBI (National Center for Biotechnology Information) pour rechercher les séquences les plus proches déposées dans GenBank.

Les alignements de séquences sont réalisés grâce au logiciel CLUSTAL W 1.8 (Thompson *et al.*, 1994). L'homologie des séquences pairées a aussi été évaluée et le taux de substitution par transformation a été soumis à la méthode de Tamura-Nei qui tient compte des transitions et des transversions. La matrice des taux de substitution résultante a été analysée par la méthode de Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987) du logiciel MEGA 3 (Kumar *et al.*, 2004). Les niveaux de confiance de la topologie des arbres phylogénétiques obtenus par la méthode de Neighbor-Joining (MEGA 3), ont été estimés par la méthode des analyses de rééchantillonnage des données avec 100 répliques.

#### ➤ **Numéros d'accèsion des séquences de nucléotides**

Les séquences du gène codant pour la sous unité 16S de l'ARN ribosomal des souches 1'2, 4'1, 5.1, S1, B2 et 5-3 obtenues lors de cette étude, ont été déposées dans la banque GenBank sous les numéros d'accès respectifs de DQ138366, DQ149846, DQ118426, DQ120725, DQ129689 et EF442769. Les numéros d'accès des séquences ADN<sub>r</sub> 16S des souches utilisées comme références et extraites de la base de données GenBank sont regroupé dans le tableau 10-Annexe 6.

### **3. 7. 5. Hybridation ADN-ADN**

#### ➤ **Principe**

La technique d'hybridation utilisée est celle à l'hydroxyapatite. C'est est un gel de phosphate de calcium de formule  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$  qui permet l'adsorption des ADN mono et bicaténaires puis leur élution différentielle. Avec un tampon phosphate de molarité inférieure à 0,20 M, seul l'ADN monocaténaire est élué ; au-dessus de 0,20 M tout l'ADN mono et bicaténaire est extrait. Les solutions d'ADN cible et d'ADN marqué sont mélangées dénaturées et incubées dans des conditions convenables de température et de force ionique. Elles sont ensuite mises en contactes avec l'hydroxyapatite et incubées à une température convenable puis équilibrée avec un tampon phosphate 0,14 M. Après trois lavages et centrifugations avec le tampon précédent, l'ADN non hybridé est élué. L'hybride est recueilli après deux lavages par le tampon 0,40 M et centrifugation. La

comparaison des quantités de radioactivités éluées respectivement avec les tampons 0,14 M et 0,4 M, permet de calculer le pourcentage d'hybridation.

La méthode utilisée est celle du DIG-DNA Labeling and detection kit (Boehringer Mannheim Nick) décrite par Ziemke *et al.* (1998) et qui est une modification de la technique de Lind et Ursing (1986). Elle consiste à faire un double marquage de la sonde (sonde « froide ») par la digoxygénine-11-2'-dioxy-uridine-5'-triphosphate (DIG-11-dUTP) et la biotine 16-2'-dioxy-uridine-5'-triphosphate (biotine-16-dUTP). La détection s'est basée sur l'utilisation d'anticorps anti-digoxygénine ayant une activité phosphatase alcaline (Anti-DIG-AP) qui se fixent sur des dNTP marqués à la digoxygénine (DIG) contenus dans la sonde. La phosphatase alcaline provoque l'apparition d'un précipité coloré (jaune) après réaction avec un substrat, le para-nitrophénylephosphate, révélant ainsi le fragment nucléotidique recherché.

#### ➤ Préparation de la sonde

Les sondes sont obtenues par extraction de l'ADN génomique de la souche à hybrider. Le marquage de cet ADN se fait en tubes eppendorf de 1,5 ml. Dans lequel sont introduits 3 µl d'ADN (0,3 µg/ µl), 5 µl de mélange de nucléotides, 1 µl de Tampon 10X et 1 µl d'enzyme.

Le mélange de nucléotide est constitué de 3 volumes de dATP, 3 volumes de dCTP, 3 volumes de dGTP, 2 volumes de dTTP et 1 volume de dUTP (marqué avec 0,75 par la digoxygénine et 0,25 par la biotine). Les tubes eppendorf sont incubés à 15°C pendant 90 minutes.

Après incubation et pour précipiter la sonde, 390 µl d'eau MilliQ, 45 µl d'acétate-Na (3 M pH 5,2) et 890 µl d'éthanol froid sont ajoutés au mélange précédent. L'ensemble est placé à - 20 °C pendant 24 heures puis centrifugé à 13 000 rpm pendant 15 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 500 µl d'éthanol froid à 70 % (v/v). Le tout est centrifugé à 13 000 rpm durant 15 minutes. Le culot est séché puis dissous dans 100 µl d'eau MilliQ.

La vérification du marquage est faite en plaques de streptavidine (Streptavidin-Coated Microtiter Plates, Boehringer cat. 1645692). On dépose sur la plaque, par puit, 200 µl de tampon phosphate (0,14 M et 0,2 % SDS à pH 6,8), 5 µl d'albumine à 4 % (p/v) et 2 µl de sonde. La plaque est incubée à température ambiante avec agitation pendant 1 heure.

\* : la sonde a été préalablement dénaturée à 100 °C pendant 10 minutes et conservée sur glace avant son dépôt.

Pour détecter le marquage, les puits sont rincés avec 200 µl de tampon 1 (Annexe 6) chacun puis séchés. Cette opération est répétée trois fois. On dépose 200 µl d'une solution de détection (Annexe 6) par puit. On incube à température ambiante avec agitation pendant 1 heure.

Le marquage est révélé par élimination de la solution de détection des puits. On rince les puits avec 200 µl de tampon 1 chacun suivi d'un séchage. On ajoute 250 µl de la solution de révélation (Annexe 6) et on incube à 37°C. La lecture est faite dans le lecteur d'ELISA à 405 nm après développement de la couleur jaune.

### ➤ Hybridation

Elle est réalisée en tubes eppendorf à température au dessous de la  $T_m$  de l'ADN de la souche à étudier et dont le mélange est constitué de 15 µg ADN (0,3 µg / µl) et 8 µl d'ADN marqué. Un des tubes eppendorf a reçu le mélange formé par l'ADN marqué et son homologue non marqué et les autres contiennent l'ADN marqué et celui provenant de la souche avec laquelle a lieu l'hybridation. Les tubes contenant les solutions sont portés à 100°C durant 10 minutes puis placés immédiatement sur la glace pendant 10 minutes. Après centrifugation, on ajoute 28 µl de tampon phosphate 1 M et on complète le mélange à 100 µl avec de l'eau MilliQ. Le mélange est recouvert d'une goutte d'huile de paraffine et l'hybridation se déroule durant 16 heures à une température  $T^*(^{\circ}\text{C})$  au dessous de la  $T_m$ .

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

La purification de l'ADN est effectuée par élimination de toute l'huile et le mélange est transféré dans un nouveau tube eppendorf. Le volume est estimé à l'aide d'une micropipette puis on lui ajoute un volume égal d'eau MilliQ. La séparation des simples brins des doubles est faite sur un support d'hydroxyapatite (HA) équilibrée. Les brins simples sont élués par le tampon phosphate 0,14 M (pH 6,8) et les doubles brins par le tampon phosphate à 0,36 M.

L'équilibrage de l'hydroxyapatite est effectué par répartition d'1 ml d'hydroxyapatite à 0,1 % (p/v) par eppendorf. La phase aqueuse est éliminée et le dépôt est rincé avec 1 ml de tampon phosphate 0,14 M et 0,2 % (p/v) SDS. Le surnageant est éliminé après centrifugation à 13 000 rpm pendant 1 minute. Cette opération est répétée trois fois. Addition de 200 µl par eppendorf d'hydroxyapatite. On élimine le surnageant après une centrifugation à 13 000 rpm pendant 1 minute.

#### ❖ **Séparation des brins simples**

Deux aliquotes de 50 µl de chaque mélange d'ADN sont déposés dans un tube eppendorf contenant l'hydroxyapatite équilibrée. On mélange doucement et on incube à  $T_m - 35^\circ\text{C}$  pendant 30 minutes. Le surnageant est récupéré après centrifugation à 13 000 rpm pendant 1 minute. Les eppendorf à hydroxyapatite reçoivent chacun 450 µl de tampon phosphate 0,14 M et 0,2 % (p/v). On mélange doucement et on incube à  $T_m - 35^\circ\text{C}$  pendant 5 minutes. Le surnageant est récupéré et rajouté au précédent après une centrifugation dans les mêmes conditions. On ajoute 500 µl du tampon précédent, on mélange et on incube dans les mêmes conditions. Le surnageant récupéré est rajouté aux précédents.

#### ❖ **Séparation des doubles brins**

Les eppendorf à hydroxyapatite précédents reçoivent chacun 200 µl de tampon phosphate 0,4 M. On mélange rapidement et on centrifuge à 13 000 rpm pendant 1 minute. Les surnageants sont transférés dans de nouveaux eppendorfs. On ajoute 200 µl du même tampon aux eppendorf à hydroxyapatite. Après mélange rapide, on centrifuge. On récupère le surnageant qui est additionné au précédent.

#### ❖ **La réalisation de la droite étalon**

Une courbe étalon est élaborée, 4 µl d'une solution d'ADN marqué à une concentration de 5 ng/µl sont mélangés avec 800 µl de tampon phosphate 0,14 M et 0,2 % SDS (p/v) (solution mère). Une série de dilution décimale est effectuée. Les tubes d'eppendorf de la courbe d'étalonnage (solution mère et dilutions) et ceux contenant les

doubles brins d'ADN sont portés à 100 °C pendant 10 minutes puis placés immédiatement sur la glace pendant 10 minutes. Chaque puit de la plaque de streptavidine reçoit un aliquote de 200 µl du contenu des eppendorfs de la courbe d'étalonnage, de ceux des surnageants de simples ou doubles brins d'ADN. On ajoute 4 µl d'albumine 10 % (p/v). On incube à température ambiante avec agitation pendant 2 heures. Les étapes de détection, de révélation et de lecture dans le lecteur d'ELISA sont faites comme précédemment.

La lecture de l'absorbance effectuée à 405 nm permet de tracer la courbe étalon de la densité optique en fonction de la concentration en ADN marqué.

**Tableau 11.** Résultats de l'analyse physico-chimiques (données obtenues de l'Entreprise Nationale de Sel de Constantine).

Echantillon	Salinité tot. (%)	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	CO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Na <sup>+</sup>
1	27	0,96	8,17	184,7	0	1,8	18,67	119,5
2	29	0,96	1,46	205,9	0	1,27	16,45	133,4
3	30	0,48	12,84	205,9	0	2,44	25,8	133,4

Échantillon 1, bassin de concentration de sel; Echantillon 2 et 3, bassin de cristallisation.

**Tableau 12.** Désignation des souches isolées selon le milieu de culture utilisé.

Souche	Code	Milieu de culture	Souche	Code	Milieu de culture	Souche	Code	Milieu de culture
1	1'1	1	15	4'1	4	29	5-8	6
2	1'2	1	16	4'2	4	30	5-9	6
3	1'3	1	17	4'3	4	31	S1	7
4	2a	2	18	5.1	4	32	S2	7
5	2a	2	19	5.2	5	33	S3	7
6	2c	2	20	5.3	5	34	S4	7
7	B1	3	21	5RB	5	35	S5	7
8	B2	3	22	5-1	6	36	S6	7
9	B3	3	29	5-2	6	37	S7	7
10	B4	3	24	5-3	6	38	S8	7
11	B5	3	25	5-4	6	39	S9	7
12	B6	3	26	5-5	6	40	S10	7
13	B7	3	27	5-6	6			
14	B8	3	28	5-7	6			

Le but de ce travail de thèse, est d'étudier à l'aide de techniques culturales et de phylogénie moléculaires, la microflore inféodée à la sebkha Ezzemoul située à Ain M'Lila (Oum El Bouaghi).

Cette étude a donc consisté en l'utilisation de techniques culturales d'isolements qui semblent appropriées pour une telle approche. Un grand nombre de cultures a été réalisé en multipliant les conditions physico-chimiques et en utilisant une large gamme de sources de carbone avant d'opter pour sept milieux de culture.

### **1. Analyse physico-chimiques des saumures de la sebkha Ezzemoul**

D'après l'analyse physico-chimique (Tableau 11), la salinité totale augmente du dernier bassin de concentration du sel au bassin de cristallisation. Les ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  sont dominants comme dans le Grand Lac salé Arm (USA) et le lac Natrun en Egypte. (Larsen, 1980 ; Post, 1977). La concentration en ion  $\text{Na}^+$  dans le bassin de cristallisation est nettement supérieure à celle de la Mer Morte alors que c'est l'opposé avec les cations divalents ( $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{Ca}^{2+}$ ) (Beyth, 1980). Les carbonates n'ont pas été détectés lors de l'analyse. En general, les lacs hypersalins neutrophiles contiennent peu de carbonates en comparaison aux lacs natronés.

Le pH varie de 7,3 à 7,5 selon les tables salantes. Il est légèrement alcalin et supérieur à celui de la Mer Morte mais reste nettement inférieur à celui des lacs natronés (Larsen 1980 ; Grant & Tindall, 1986).

### **2. Analyse microbienne des saumures de la sebkha Ezzemoul**

Plus de soixante colonies ont été prélevées puis cultivées sur milieux solides selon leur provenance. Une quarantaine de souches ont été retenues pour une complète caractérisation. Comme indiqué dans le tableau 12, les isolats sont désignés selon un code composé de lettres et de numéros provenant de différents bassins de concentration de sel et de cristallisation de la sebkha Ezzemoul.

Afin de déterminer la position taxinomique des souches étudiées, nous avons d'abord analysé la morphologie de ces isolats et déterminé certains de leurs caractères physiologiques et biochimiques ainsi que la sensibilité aux antibiotiques les plus utilisés

dans une telle étude. Nous avons utilisé des techniques moléculaires basées sur l'analyse des gènes codant pour les 16S ARN ribosomiaux archéens et bactériens. Deux souches ont réagi avec les amorces spécifiques au domaine Bacteria (la souche B2 et 5-3).

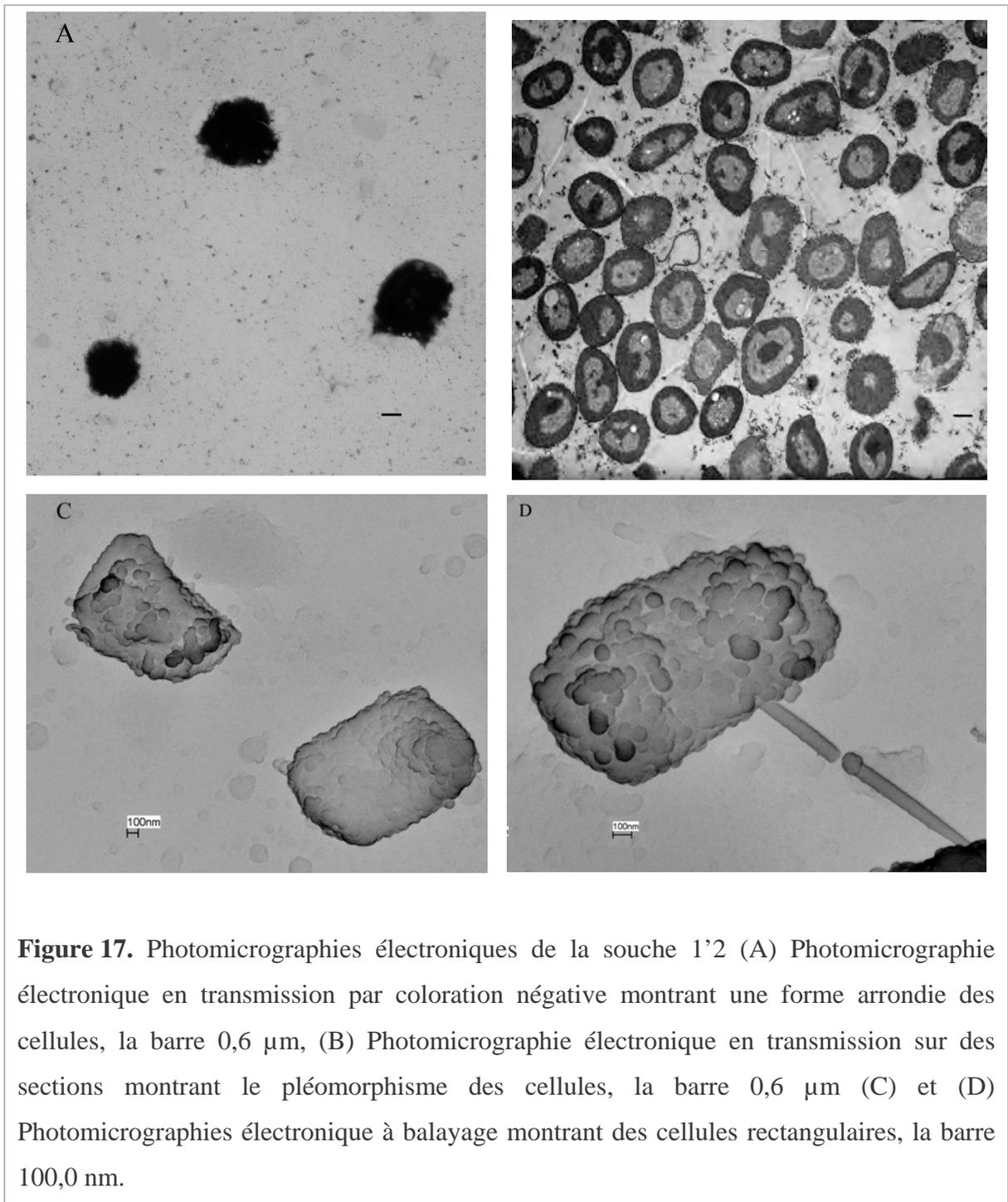
Seize souches (deux souches bactériennes et quatorze souches archéennes) ont été sélectionnées pour déterminer la séquence du gène d'ARNr 16S et de préciser ainsi leur affiliation respective. La composition des lipides polaires des souches archéennes, ou de celles des acides gras membranaires bactérienne a aussi été effectuée. De même, des études d'homologies ADN-ADN ont été entreprises pour quelques souches trouvées taxinomiquement intéressantes.

## 1. Morphologie des souches d'haloarchaea

Les colonies produites sont généralement rondes d'un diamètre d'environ 1 à 2 mm, convexes, entières et bombées après 5 à 7 jours d'incubation à 37 °C. Elles sont toutes pigmentées en rouge, en pourpre ou en orange. La pigmentation est un trait qui caractérise en général, les Archaea halophiles extrêmes due à la présence de la bactériorubérine (Grant *et al.*, 2001 ; Oren & Rodriguez-Valera, 2001). On a noté que la pigmentation des colonies variait selon la salinité, elle devient moins intense lorsque la salinité augmentait. De même, la culture sur milieu liquide réalisée à différentes concentrations de NaCl a montré que la production de pigment diminue lorsque la salinité augmente (Figure 16). Ces observations rejoignent celles rapportées par Rodriguez *et al.* (1980).



La coloration de Gram réalisée selon la technique de Dussault (1955) a donné un résultat négatif pour toutes les souches étudiées. Même si les haloarchaea sont dépourvues de réelle paroi, réagissent à la coloration en général comme les bactéries à Gram négatif, à l'exception du genre haloalcalophile, *Natronococcus* dont la coloration de Gram est variable (Tindall *et al.*, 1984 ; Grant *et al.*, 2001).

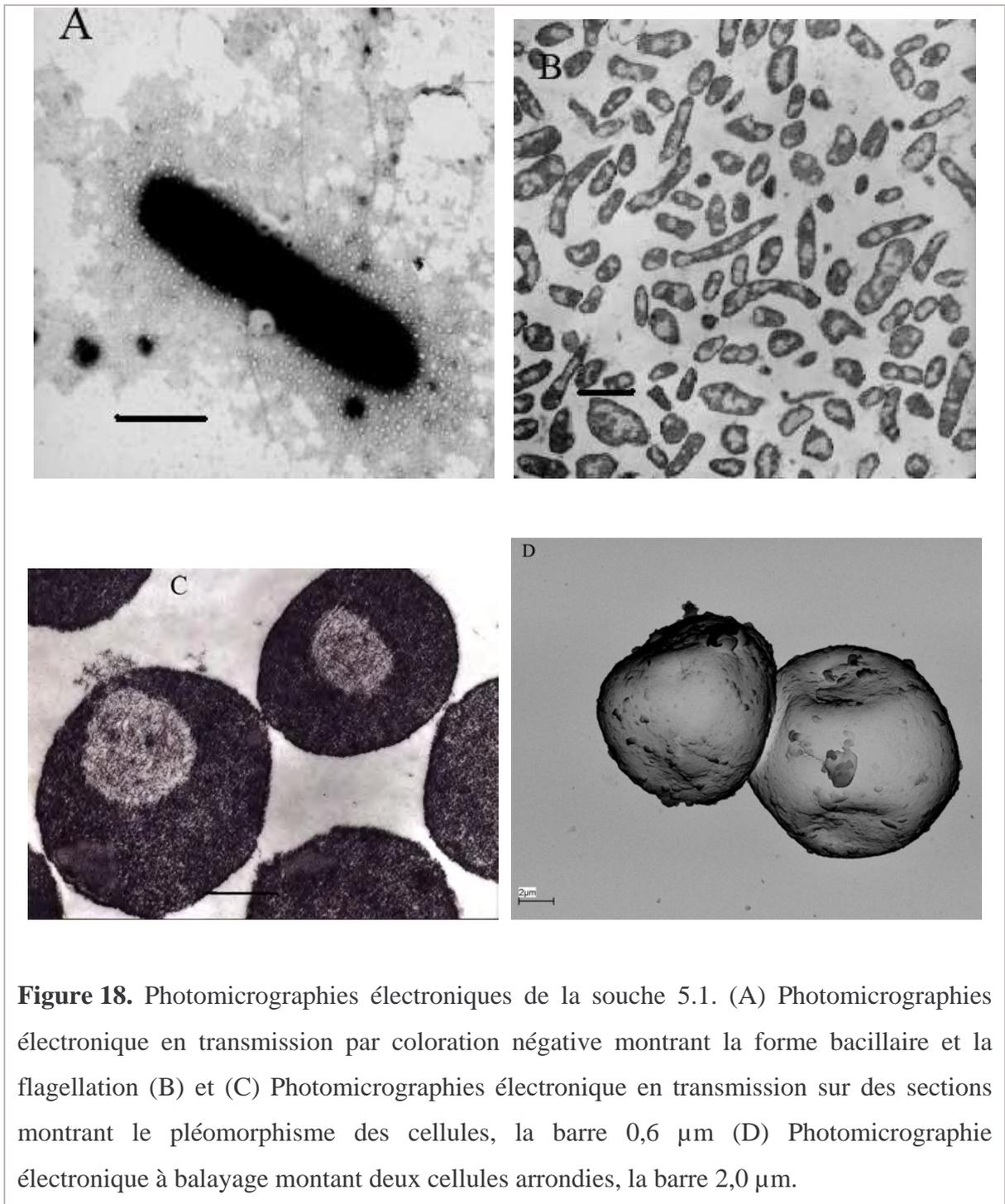


Les formes des cellules sont variables allant des formes légèrement sphériques aux bâtonnets réguliers et irréguliers. Les dimensions cellulaires et la flagellation de sept souches, ont été obtenues à l'aide de photomicrographies électroniques (Tableau 13). Les observations en microscopie électronique en transmission et à balayage des cellules ont également permis de mettre en évidence une importante diversité morphologique : des coques de tailles variables, des bâtonnets réguliers et irréguliers et des formes encore moins classiques tels que des triangles, des carrés et des rectangles, ce qui démontrait un polymorphisme cellulaire assez prononcé de ces isolats. Ce pléomorphisme caractérise les souches d'Archaea halophiles extrêmes étudiées (Figures 17-20) et qui est une autre propriété de ce type de procaryote dépourvu de muréine (Grant *et al.*, 2001), à l'opposé des bactéries qui sont généralement génétiquement monomorphes..

**Tableau 13.** Formes et dimensions cellulaires de quelques souches d'halobactéries isolées obtenues par microscopie électronique en transmission.

Souches	Formes	Dimensions (µm)
1'2	Bâtonnet court ou bâtonnet pléomorphe non flagellé	0,6-0,8 × 0,8-1,0
2a	Bâtonnet flagellé	0,6-0,8 × 1,0-1,2
5'RB	Bâtonnet pléomorphe non flagellé	0,6-0,7 × 0,7-0,9
5.1	Bâtonnet ou bâtonnet pléomorphe flagellé	0,6 × 1,5-3,0
B3	Bâtonnet ou bâtonnet pléomorphe	0,3-0,8 × 0,5-1,7
5-2	Bâtonnet ou bâtonnet pléomorphe flagellé	0,4-0,6 × 1,0-2,4
S6	Cocci non flagellé	0,9-1,1

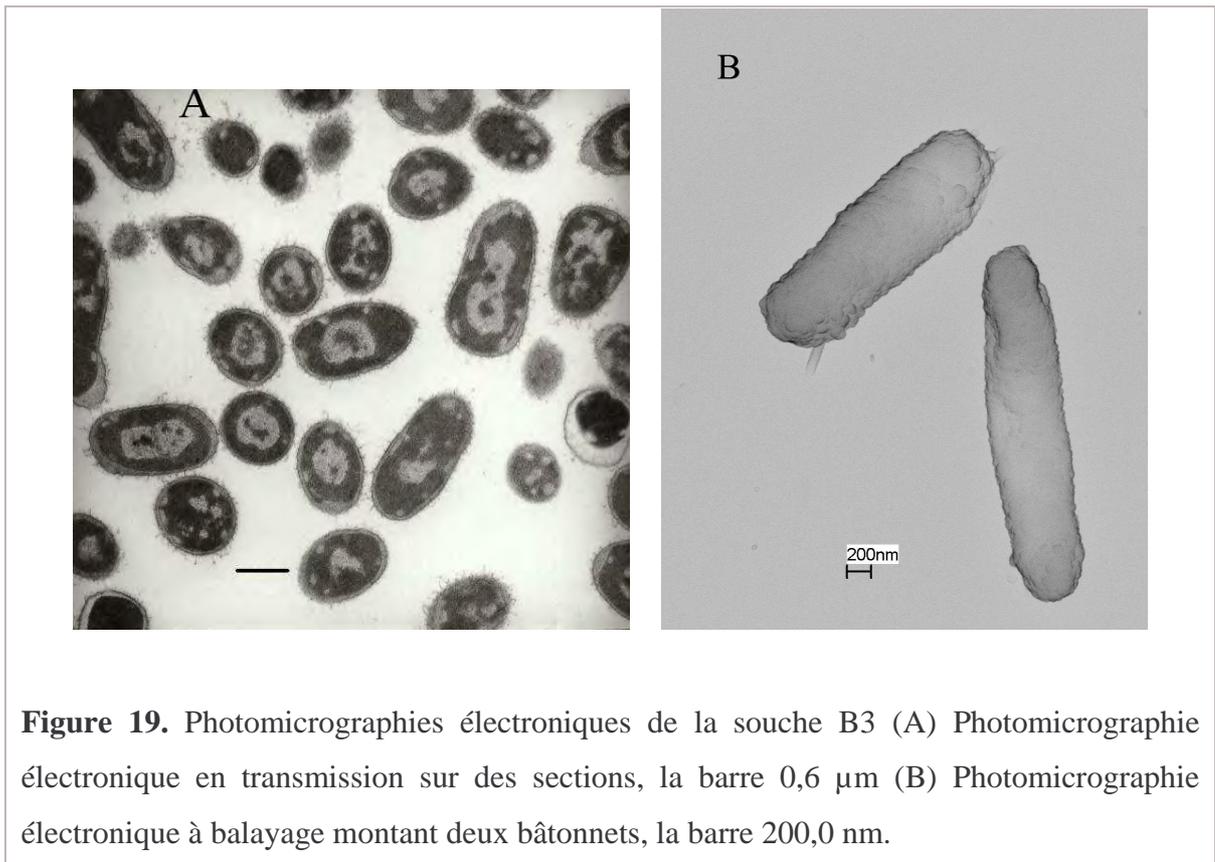
Les cellules de la souche 1'2 se présentent sous forme de bâtonnets courts ou légèrement arrondis (Figure 17). La photomicrographie électronique sur des sections (Figure 17B) a montré la présence d'une fine enveloppe à l'extérieur et du corps brillant qui se trouve à l'intérieur de la cellule. Alors que la microscopie électronique à balayage (Figure 17C et D) a permis de mettre en évidence des formes rectangulaires non fréquentes chez les bactéries mais largement répandues chez les haloarchaea et spécialement chez le genre *Haloarcula* (Grant *et al.*, 2001).



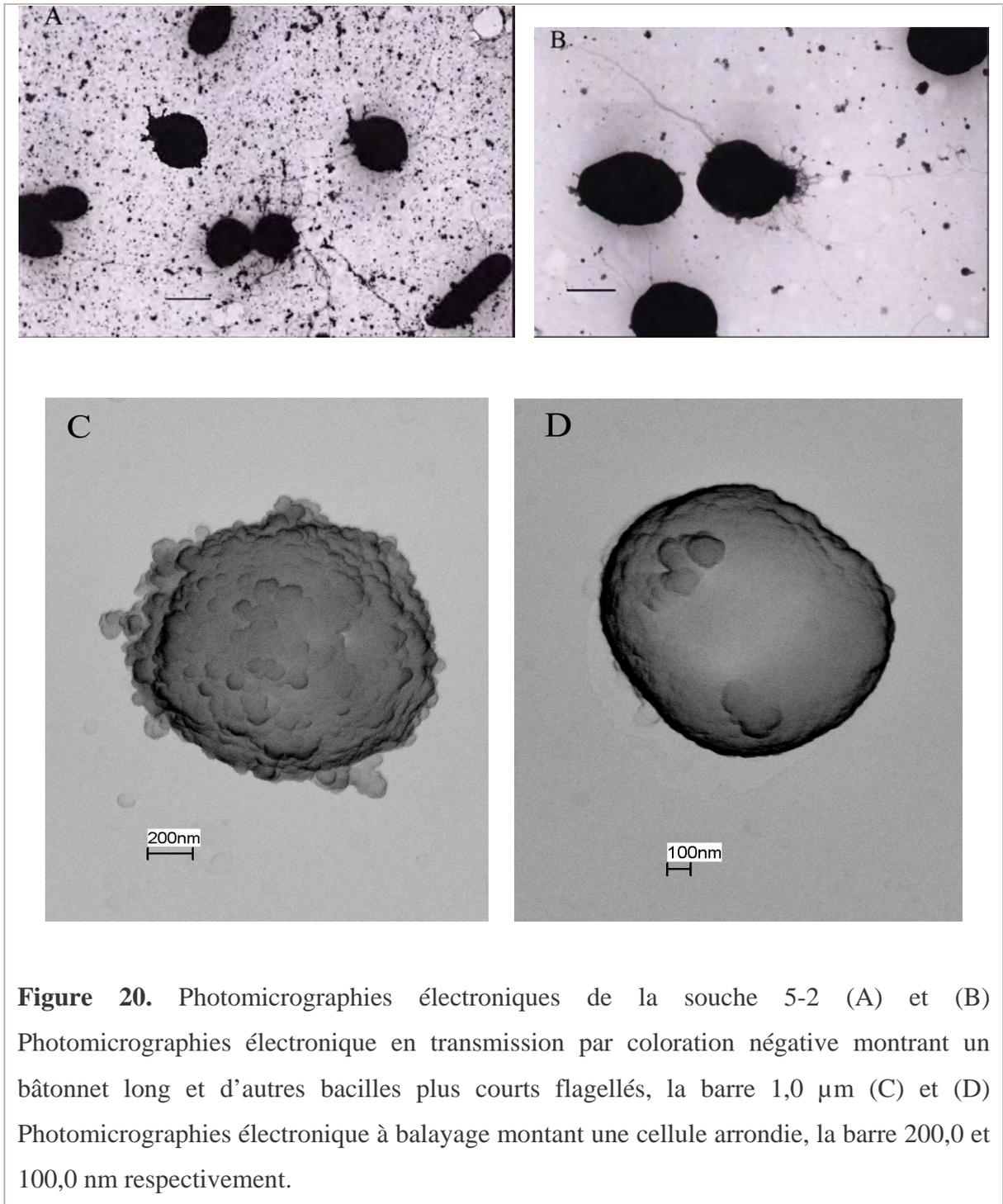
**Figure 18.** Photomicrographies électroniques de la souche 5.1. (A) Photomicrographies électronique en transmission par coloration négative montrant la forme bacillaire et la flagellation (B) et (C) Photomicrographies électronique en transmission sur des sections montrant le pléomorphisme des cellules, la barre 0,6 µm (D) Photomicrographie électronique à balayage montrant deux cellules arrondies, la barre 2,0 µm.

A l'instar de la souche 1'2, la forme bâtonnet flagellé prédomine chez la souche 5.1. Elle se présente sous forme de bacilles réguliers et irréguliers (Figure 18A et B). La micrographie électronique sur des sections (18B et C) a montré la présence d'une fine enveloppe et d'une zone claire au centre correspondant au nucléoïde. On a noté aussi la présence d'un corpuscule attaché à la face interne de la membrane cytoplasmique. Il a déjà été observé par Stoeckenius et Rowen en 1967 mais dont la nature chimique n'a pas été déterminée. La microscopie électronique à balayage (18D) a montré la présence de deux cellules accolées issues probablement d'une division cellulaire.

La photomicrographie électronique en transmission sur des sections des cellules de l'isolat B3 a montré la présence de bâtonnets et de cocci (Figure 19A). Alors que celle à balayage (Figure 19B) a montré une dominance de la forme bacillaire.



Pour la souche 5-2, différentes formes ont été observées par microscopie électronique, des bacilles et des cocci pourvus de plusieurs flagelles (Figure 20).



**Figure 20.** Photomicrographies électroniques de la souche 5-2 (A) et (B) Photomicrographies électronique en transmission par coloration négative montrant un bâtonnet long et d'autres bacilles plus courts flagellés, la barre 1,0  $\mu\text{m}$  (C) et (D) Photomicrographies électronique à balayage montrant une cellule arrondie, la barre 200,0 et 100,0 nm respectivement.

**Tableau 14.** Croissance à différentes concentrations de NaCl.

Souches	Concentrations de NaCl % (p/v)										
	0,0	2,5	5,0	7,5	10,0	12,5	15,0	17,5	20,0	25,0	30,0
1'1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
1'2	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
1'3	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
2a	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
2b	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
2c	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
B1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
B3	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
B4	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
B5	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
B6	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
B7	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
B8	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
4'1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
4'2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
4'3	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
5.1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
5.2	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
5.3	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
5RB	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
5-1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
5-2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
5-4	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
5-5	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
5-6	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
5-7	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
5-8	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
5-9	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
S1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
S2	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
S3	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
S4	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
S5	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
S6	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
S7	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
S8	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
S9	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
S10	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

+, croissance ; -, absence de croissance.

## 2. Caractéristiques physiologiques des souches d'haloarchaea

Les résultats de la caractérisation physiologique des souches sont représentés dans les tableaux de 14 à 22.

### 2. 1. Spectre salin

Toutes les souches archéennes étudiées, à l'exception de la souche 5.1, peuvent croître dans des milieux de culture dont la concentration en NaCl peut atteindre 30 % (p/v) (5,2 M), avec un optimum de croissance à 15 ou 20 % (p/v) (3,4 ou 4,3 M) selon les souches. Mais aucune croissance n'a été observée au dessous de 10 % (p/v) (1,7 M) (Tableau 14) et se lysent en eau distillée. Ce comportement est similaire à celui de toutes les espèces d'archaea halophiles extrêmes décrites qui sont incapables de croître au dessous de 9 % (p/v) de NaCl (Grant *et al.*, 2001 ; Castillo *et al.*, 2005). Les cellules des halophiles extrêmes ont une exigence pour l'ion  $\text{Na}^+$  et plusieurs travaux ont montré l'importance de cet ion dans le maintien de l'intégrité pariétale et dans les processus de transport de (Lanyi, 1978 ; Madigan *et al.*, 2000). De même l'absence de ce dernier ne peut être pallié par l'addition de LiCl ou de KCl.

Toutes exigent la présence de magnésium dans le milieu de culture à des teneurs variables (Tableau 15), pareillement à la plupart des espèces d'haloarchaea décrites (Grant *et al.*, 2001 ; Stan-Lotter *et al.*, 2002 ; Vreeland *et al.*, 2002). Les plus exigeantes sont les souches 5-5, 5-8, S6 et S7 mais moins que certaines espèces décrites comme *Halorubrum sodomense* (Oren, 1983b) et *Halobaculum gomorrense* (Oren *et al.*, 1995), isolées de la Mer Morte.

**Tableau 15.** Croissance à différentes concentrations de MgCl<sub>2</sub>.

Souches	Concentrations de MgCl <sub>2</sub> % (p/v)							
	0,0	0,005	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	3,2
1'1	-	-	+	+	+	+	+	+
1'2	-	-	+	+	+	+	+	+
1'3	-	-	+	+	+	+	+	+
2a	-	-	+	+	+	+	+	+
2b	-	-	-	+	+	+	+	+
2c	-	-	-	+	+	+	+	+
B1	-	-	-	-	+	+	+	+
B3	-	-	-	+	+	+	+	+
B4	-	-	-	+	+	+	+	+
B5	-	-	-	+	+	+	+	+
B6	-	-	-	+	+	+	+	+
B7	-	+	+	+	+	+	+	+
B8	-	+	+	+	+	+	+	+
4'1	-	-	+	+	+	+	+	+
4'2	-	-	+	+	+	+	+	+
4'3	-	-	+	+	+	+	+	+
5.1	-	-	-	+	+	+	+	+
5.2	-	-	-	+	+	+	+	+
5.3	-	-	+	+	+	+	+	+
5RB	-	-	-	-	+	+	+	+
5-1	-	-	-	+	+	+	+	+
5-2	-	-	+	+	+	+	+	+
5-4	-	-	-	+	+	+	+	+
5-5	-	-	-	-	-	+	+	+
5-6	-	-	+	+	+	+	+	+
5-7	-	-	+	+	+	+	+	+
5-8	-	-	-	-	-	+	+	+
5-9	-	-	-	+	+	+	+	+
S1	-	-	+	+	+	+	+	+
S2	-	-	-	+	+	+	+	+
S3	-	-	-	+	+	+	+	+
S4	-	-	+	+	+	+	+	+
S5	-	-	+	+	+	+	+	+
S6	-	-	-	-	-	+	+	+
S7	-	-	-	-	-	+	+	+
S8	-	-	+	+	+	+	+	+
S9	-	-	+	+	+	+	+	+
S10	-	-	+	+	+	+	+	+

+, croissance ; -, absence de croissance.

L'exigence de cet ion apparaît refléter la source de l'organisme. Ainsi, les espèces isolées de la Mer Morte qui est plus concentrée en ion  $Mg^{2+}$  qu'en ion  $Na^+$ , exigent une concentration élevée en ion  $Mg^{2+}$  mais modérée en ion  $Na^+$ . Alors que celles isolées des lacs hypersalés alcalins, qui sont déficients en ion  $Mg^{2+}$ , croissent en absence ou en présence de faibles concentrations en ion  $Mg^{2+}$ . Le magnésium est nécessaire pour les halophiles extrêmes car il intervient dans la stabilisation des molécules fortement acides comme il a été suggéré par certains auteurs (Ebel *et al.*, 1999 ; Madern, 2000).

En accord avec le pléomorphisme cellulaire et les exigences salines rapportées dans des études antérieures (Grant *et al.*, 2001), les souches isolées peuvent, certainement, être définies comme des microorganismes halophiles extrêmes.

## 2. 2. Spectre de température et de pH

La gamme de température explorée varie de 4 à 60°C. Il est trouvé que les isolats peuvent tolérer des variations de températures de 30 à 50°C. Sept d'entre elles sont aussi capables de croître à 22°C alors que les souches 1'2 et S1 se développent à 55°C (Tableau 16). A l'exception de l'espèce psychrotrophe *Halorubrum lacusprofundi*, isolée du lac hypersalé de l'antarctique, les autres membres de la famille des *Halobacteriaceae* sont plutôt des thermotolérants (Grant *et al.*, 2001 ; Montalvo-Rodriguez *et al.*, 2000 ; Castillo *et al.*, 2005 ; Itoh *et al.*, 2005), vu que la majorité des environnements hypersalés soit localisé en régions arides et semi arides. La température optimale de croissance de l'ensemble des souches est généralement dans la gamme 37-40°C.

L'intervalle de pH permettant la croissance de l'ensemble des souches se situe entre 7,0 et 9,0 mais quelques unes sont capables de croître à pH 6,5. La souche S1 possède un intervalle de pH plus considérable que les autres souches et tolère des variations de pH de 5,0 à 9,0 (Tableau 17). L'optimum de croissance de l'ensemble des souches est de 7,0-7,5 et peuvent donc être considérées comme souches neutrophiles. Ce fait peut s'expliquer par la composition ionique des saumures de la sebkha et par les valeurs légèrement alcalines du pH. En outre, les sept genres décrits comme alcalophiles ont été isolés uniquement d'environnements natronés (Kamekura, 1999a ; Grant *et al.*, 2001 ; Itoh *et al.*, 2005).

**Tableau 16.** Spectre de température.

Souches	Températures (°C)							
	4	22	30	37	40	50	55	60
1'1	-	-	+	+	+	+	-	-
1'2	-	-	+	+	+	+	+	-
1'3	-	-	+	+	+	+	-	-
2a	-	-	+	+	+	+	-	-
2b	-	-	+	+	+	+	-	-
2c	-	+	+	+	+	+	-	-
B1	-	-	+	+	+	+	-	-
B3	-	-	+	+	+	+	-	-
B4	-	-	+	+	+	+	-	-
B5	-	-	+	+	+	+	-	-
B6	-	-	+	+	+	+	-	-
B7	-	-	+	+	+	+	-	-
B8	-	-	+	+	+	+	-	-
4'1	-	-	+	+	+	+	-	-
4'2	-	-	+	+	+	+	-	-
4'3	-	+	+	+	+	+	-	-
5.1	-	+	+	+	+	+	-	-
5.2	-	-	+	+	+	+	-	-
5.3	-	+	+	+	+	+	-	-
5RB	-	-	+	+	+	+	-	-
5-1	-	+	+	+	+	+	-	-
5-2	-	+	+	+	+	+	-	-
5-4	-	-	+	+	+	+	-	-
5-5	-	-	+	+	+	+	-	-
5-6	-	-	+	+	+	+	-	-
5-7	-	+	+	+	+	+	-	-
5-8	-	-	+	+	+	+	-	-
5-9	-	-	+	+	+	+	-	-
S1	-	-	+	+	+	+	+	-
S2	-	-	+	+	+	+	-	-
S3	-	-	+	+	+	+	-	-
S4	-	-	+	+	+	+	-	-
S5	-	-	+	+	+	+	-	-
S6	-	-	+	+	+	+	-	-
S7	-	-	+	+	+	+	-	-
S8	-	-	+	+	+	+	-	-
S9	-	-	+	+	+	+	-	-
S10	-	-	+	+	+	+	-	-

+, croissance ; -, absence de croissance.

Tableau 17. Spectre de pH.

Souches	pH							
	5,0	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0
1'1	-	-	+	+	+	+	+	+
1'2	-	-	-	+	+	+	+	+
1'3	-	-	-	+	+	+	+	+
2a	-	-	+	+	+	+	+	+
2b	-	-	-	+	+	+	+	+
2c	-	-	-	+	+	+	+	+
B1	-	-	-	+	+	+	+	+
B3	-	-	+	+	+	+	+	+
B4	-	-	+	+	+	+	+	+
B5	-	-	-	+	+	+	+	+
B6	-	-	-	+	+	+	+	+
B7	-	-	+	+	+	+	+	+
B8	-	-	-	+	+	+	+	+
4'1	-	-	+	+	+	+	+	+
4'2	-	-	-	+	+	+	+	+
4'3	-	-	-	+	+	+	+	+
5.1	-	-	+	+	+	+	+	+
5.2	-	-	+	+	+	+	+	+
5.3	-	-	+	+	+	+	+	+
5RB	-	-	+	+	+	+	+	+
5-1	-	-	+	+	+	+	+	+
5-2	-	-	+	+	+	+	+	+
5-4	-	-	-	+	+	+	+	+
5-5	-	-	-	+	+	+	+	+
5-6	-	-	-	+	+	+	+	+
5-7	-	-	+	+	+	+	+	+
5-8	-	-	+	+	+	+	+	+
5-9	-	-	+	+	+	+	+	+
S1	+	+	+	+	+	+	+	+
S2	-	-	+	+	+	+	+	+
S3	-	-	+	+	+	+	+	+
S4	-	-	+	+	+	+	+	+
S5	-	-	-	+	+	+	+	+
S6	-	-	+	+	+	+	+	+
S7	-	-	+	+	+	+	+	+
S8	-	-	-	+	+	+	+	+
S9	-	-	-	+	+	+	+	+
S10	-	-	-	+	+	+	+	+

+, croissance ; -, absence de croissance.

**Tableau 18.** Utilisation des sucres.

Souches	Glucose	Lactose	Xylose	Galactose	Fructose	Arabinose	Mannose	Rhamnose	Maltose	Saccharose	Amidon	Salicine	Cellulose
1'1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1'2	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+
1'3	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
2a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
B3	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
B4	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B5	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
B6	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
B7	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B8	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4'1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
4'2	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
4'3	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.1	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
5.2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
5RB	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
5-1	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-
5-2	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
5-4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
5-5	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
5-6	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
5-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-8	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
5-9	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
S1	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
S2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
S3	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
S4	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
S5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
S7	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S8	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-
S9	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
S10	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

### 2. 3. Utilisation de substances organiques

Le glucose est le monosaccharide le plus assimilé par l'ensemble des souches étudiées. D'après les résultats présentés dans le tableau 18, les souches 1'2 et 5-1 sont les plus utilisatrices de sucres (mono et disaccharides) comme source unique de carbone et d'énergie. Par contre les souches 1'1, 2a, 2b et 2c sont incapables de les assimiler. Cette propriété est largement répandue chez ce groupe (Mormile *et al.*, 2003 ; Oren & Mana, 2003 ; Grüber *et al.*, 2004 ; Litchfield *et al.*, 2006) et ceci en dépit du fait que les gènes responsables du catabolisme des sucres soient identifiés dans le génome de *Halobacterium* NRC-1 (Ng *et al.*, 2000). L'assimilation des sucres a été observée principalement avec quelques membres des genres *Haloarcula*, *Haloferax* et *Halorubrum* (Oren, 1999b ; Grant *et al.*, 2001). Il faudra noter que même si les sucres soient peu métabolisés par ce groupe de procaryotes, ils stimulent cependant leur croissance (Oren, 2002).

L'amidon et la cellulose sont utilisés lors de la croissance de certaines souches en absence de tout autre substrat carboné. La croissance sur l'amidon comme seule source de carbone et d'énergie a été souvent observée (Grant *et al.*, 2001). La dépendance de nombreuses souches isolées de la Mer Morte à l'amidon a été mise en évidence par Oren (1983b). Mais peu de travaux ont rapporté l'utilisation de la cellulose par les archaea halophiles extrêmes (Birbir *et al.*, 2004 ; Elevi *et al.*, 2004).

Le glycérol est largement assimilé et le mannitol l'est faiblement par les isolats (Tableau 19). En effet, une affinité des haloarchaea isolées de la Mer Morte pour le glycérol produit par *Dunaliella* a été observée par Oren (1994, 1995). Quand au mannitol, il est probablement transformé en fructose par une mannitol déshydrogénase présente chez de nombreuses haloarchaea (Altekar & Rangaswamy, 1992).

**Tableau 19.** Utilisation des alcools.

Souches	Adonitol	Dulcitol	Glycérol	Mannitol	Sorbitol	Inositol
1'1	-	-	-	-	-	-
1'2	-	-	+	+	-	-
1'3	-	-	+	-	-	-
2a	-	-	-	-	-	-
2b	-	-	-	-	-	-
2c	-	-	-	-	-	-
B1	-	-	+	-	-	-
B3	-	-	+	-	-	-
B4	-	-	-	-	-	-
B5	-	-	-	+	-	-
B6	-	-	-	-	-	-
B7	-	-	+	-	-	-
B8	-	-	-	-	-	-
4'1	-	-	-	-	-	-
4'2	-	-	+	-	-	-
4'3	-	-	+	-	-	-
5.1	-	-	+	+	-	-
5.2	-	-	-	-	-	-
5.3	-	-	-	-	-	-
5RB	-	-	-	-	-	-
5-1	-	-	+	-	-	-
5-2	-	-	+	-	-	-
5-4	-	-	-	-	-	-
5-5	-	-	+	-	-	-
5-6	-	-	+	-	-	-
5-7	-	-	-	-	-	-
5-8	-	-	-	-	-	-
5-9	-	-	+	-	-	-
S1	-	-	+	+	-	-
S2	-	-	+	-	-	-
S3	-	-	-	-	-	-
S4	-	-	-	-	-	-
S5	-	-	+	-	-	-
S6	-	-	-	-	-	-
S7	-	-	-	-	-	-
S8	-	-	-	-	-	-
S9	-	-	-	+	-	-
S10	-	-	-	-	-	-

**Tableau 20.** Utilisation des acides organiques.

Souches	Propionate	Oxalate	Acétate	Succinate	Malonate	Benzoate	Malate	Formiate	Fumarate	Lactate	Citrate
1'1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1'2	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
1'3	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
2a	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2c	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
B1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
B3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B4	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
B5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
B6	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
B7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B8	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
4'1	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
4'2	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
4'3	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
5.1	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
5.2	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
5.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5RB	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
5-1	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+
5-2	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-
5-4	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5-5	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5-6	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5-7	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
5-8	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
5-9	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
S1	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
S2	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
S3	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
S4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S5	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
S6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S8	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
S9	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
S10	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

La capacité de certaines souches à utiliser des acides organiques tels que le citrate, le propionate et les intermédiaires du cycle de Krebs (le malate et le succinate) ainsi que l'acétate a été observée (Tableau 20). Ce résultat a été rapporté par d'autres auteurs et notamment pour l'acétate qui est utilisé par les espèces des genres *Haloarcula* et *Haloferax* via le cycle Shunt du glyoxylate (Tindall, 1992 ; Bräsen & Schönheit, 2001 ; Oren, 2002). Chez *Halobacterium salinarum*, les enzymes du cycle du glyoxylate et du cycle tricarboxylique ne sont détectées qu'après croissance de l'organisme sur l'acétate (Hochstein, 1988). Ce dernier peut être obtenu à partir du glycérol qui est la principale source de carbone disponible pour les communautés microbiennes halophiles dans les lacs hypersalés (Oren, 1995).

Malgré qu'il soit connu que les halobactéries préfèrent utiliser les acides aminés aux sucres, ils sembleraient qu'ils soient peu utilisés par nos souches. Néanmoins, la souche 1'2 est capable de se développer sur l'arginine, l'alanine, l'asparagine, l'histidine et la tyrosine comme unique source de carbone, d'azote et d'énergie (Tableau 21). Par ailleurs, elle possède plus de capacités à utiliser les sucres, les alcools, les acides organiques et les acides aminés que les autres souches. Contrairement aux espèces d'halobactéries décrites comme étant incapables d'utiliser les acides aminés comme seule source de carbone et d'énergie (Wainø *et al.*, 2000 ; Vreeland *et al.*, 2002 ; Ventosa *et al.*, 2004). Elles exigent la présence de facteurs de croissances dans le milieu de culture.

**Tableau 21.** Utilisation des acides aminés.

Souches	Arg	Lys	Ala	Asp	His	Leu	Cys	Gly	Try	Tyr	Met
1'1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1'2	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-
1'3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2c	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B3	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B6	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B7	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
B8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4'1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4'2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4'3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5RB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
S2	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
S3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S5	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S9	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tableau 22.** Production d'acides à partir de sucres et d'alcools.

Souches	Glucose	Lactose	Galactose	Maltose	Saccharose	Xylose	Arabinose	Fructose	Glycérol	Mannitol
1'1	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
1'2	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+
1'3	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
2a	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
2b	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
2c	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
B1	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
B3	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
B4	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
B5	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
B6	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
B7	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B8	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
4'1	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
4'2	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
4'3	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
5.1	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
5.2	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
5.3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5RB	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
5-1	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
5-2	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
5-4	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
5-5	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
5-6	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
5-7	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
5-8	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
5-9	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+
S2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S3	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
S4	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
S5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S6	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
S7	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
S8	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
S9	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+
S10	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-

## 2. 4. Production d'acides à partir de sucres et d'alcools

Selon le tableau 22, la croissance sur les sucres et les alcools tests utilisés s'accompagne parfois d'une production d'acides responsable de la réduction du pH. Une production de pyruvate, d'acétate et de lactate a été observée lorsque la croissance de *Halorubrum saccharovorum* a lieu sur des hexoses (Hochstein, 1988). Selon nos données, la réduction du pH est observée le plus souvent en présence de glucose. En effet, il a été remarqué que la quantité d'acides produite dépend de la nature du sucre. Ainsi il a été observé que la quantité d'acétate, de pyruvate et de lactate produite à partir de glucose par *Halorubrum saccharovorum* est 5 à 7 fois supérieure à celle produite à partir d'autres hexoses (Oren, 1999b).

Il arrive que la croissance des archaea halophiles extrêmes sur les sucres ne puisse être détectée et selon certains auteurs cet échec n'est pas obligatoirement dû à une absence de croissance, ni à un faible taux de ces procaryotes mais plutôt à une « autodestruction » par production d'acides en excès (Hochstein, 1988).

## 3. Propriétés biochimiques des souches d'haloarchaea

Toutes les souches étudiées sont catalase et oxydase positives et c'est le cas de toutes les espèces d'haloarchaea décrites. Les résultats de l'hydrolyse de polymères ou de l'utilisation du nitrate et de l'arginine en anaérobiose sont résumés dans le tableau 23.

L'hydrolyse de l'amidon est effectuée par plus de souches que celles de la gélatine et de l'esculine. L'hydrolyse de l'amidon a été observée chez de nombreuses halobactéries (Oren, 1983b ; Oren *et al.*, 1999 ; Oren *et al.*, 2002b) et dont l'enzyme responsable a été identifiée comme étant une amyloglucosidase chez *Halorubrum sodomense* (Oren, 1983a). Toutes les souches ne produisent pas d'indole. C'est un caractère fréquent chez les halobactéries (Grant *et al.*, 2001 ; Fan *et al.*, 2004 ; Castillo *et al.*, 2005).

**Tableau 23.** Caractérisation biochimique des souches.

Souches	Amidon	Gélatine	Tween 20	Tween 40	Tween 60	Tween 80	Esculine	Indole	Nitrate	Arginine
1'1	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+
1'2	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
1'3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
2a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
2b	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
2c	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B3	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
B4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B6	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B7	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
B8	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
4'1	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
4'2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4'3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5.1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
5.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5RB	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-1	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
5-2	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
5-4	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
5-5	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-7	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-8	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
5-9	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
S1	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
S2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S3	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+
S4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S5	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
S6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S8	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
S9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S10	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Il semblerait que les lipides soient peu dégradés par les souches isolées. Les Tween 20, 40, 60 et 80 sont hydrolysés seulement par la souche S3. Egalement, très peu de souches d'halobactéries décrites dans la littérature produisent une lipase (Hezayen *et al.*, 2002 ; Birbir & Sesal, 2003 ; Birbir *et al.*, 2004 ; Fan *et al.*, 2004).

Les halophiles extrêmes sont des chimioorganotrophes aérobies qui dégradent les sources de carbone via le cycle de Krebs (Gosh & Sonawat, 1998) et la chaîne respiratoire (Schafer *et al.*, 1996). Mais elles sont également capables d'un mode d'existence alternée. En réponse à la faible solubilité de l'oxygène dans les saumures saturées, certaines halobactéries produisent des vésicules à gaz leur permettant de s'approcher de la surface. Alors que d'autres croissent en anaérobiose en utilisant des substances inorganiques tel que le nitrate comme accepteur final d'électron (Xin *et al.*, 2000 ; Wainø *et al.*, 2000 ; Fan *et al.*, 2004 ; Xu *et al.*, 2004). La capacité de réduire les nitrates en anaérobiose a été observée avec huit sur l'ensemble des souches étudiées.

Les souches 1'1, 2a, 2b et 2c fermentent l'arginine. L'assimilation de l'arginine en anaérobiose et à l'obscurité n'a été rapportée qu'avec quelques souches de *Halobacterium salinarum* (Hartmann *et al.*, 1980 ; Javor, 1984 ; Oren & Litchfield, 1999). Mais peu est connu sur l'importance écologique de la fermentation de l'arginine par les populations de *Halobacterium* dans leur biotope.

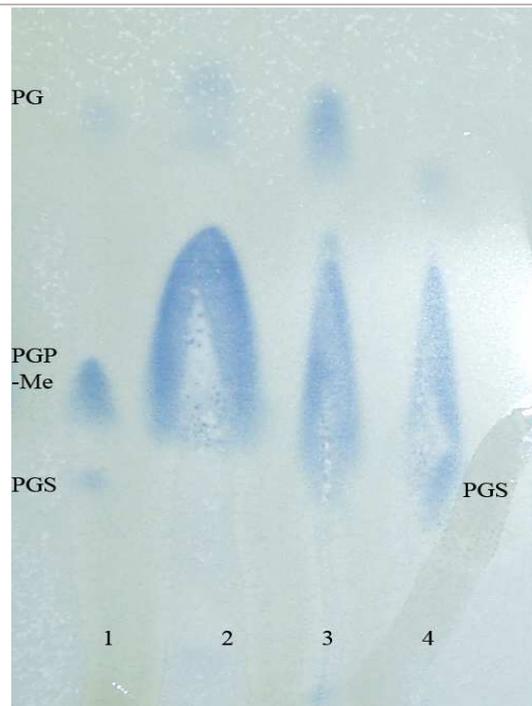
#### 4. Antibiogramme

La sensibilité aux antibiotiques permet de grouper les microorganismes en Archaea ou en Bacteria. Selon les résultats du tableau 24, toutes les souches sont sensibles à la bacitracine (10 µg) et à la novobiocine (30 µg) et les souches B7 et S4 le sont également à la rifampicine (30 µg). Mais elles sont généralement résistantes à ceux inhibant la croissance des bactéries comme l'ampicilline (30 µg), le chloramphénicol (30 µg), la néomycine (30 µg), la pénicilline G (10 UI), la streptomycine (10 UI) et la rifampicine. Ce résultat concorde en général avec les travaux réalisés sur les halobactéries (Grant *et al.*, 2001 ; Birbir *et al.*, 2004 ; Elevi *et al.*, 2004).

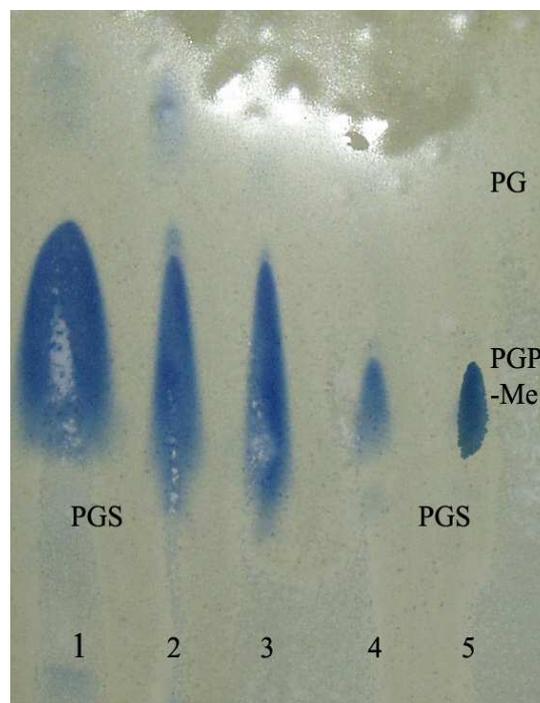
Ba, bacitracine ; No, novobiocine ; Ri, rifampicine ; Am, ampicilline ; Ch, chloramphénicol ; Né, néomycine ; Pe, Pénicilline G ; St, streptomycine. +, résistante ; -, sensible.

**Tableau 24.** Résultats de la sensibilité aux antibiotiques.

Souches	Ba	No	Ri	Am	Ch	Né	Pe	St
1'1	-	-	+	+	+	+	+	+
1'2	-	-	+	+	+	+	+	+
1'3	-	-	+	+	+	+	+	+
2a	-	-	+	+	+	+	+	+
2b	-	-	+	+	+	+	+	+
2c	-	-	+	+	+	+	+	+
B1	-	-	+	+	+	+	+	+
B3	-	-	+	+	+	+	+	+
B4	-	-	+	+	+	+	+	+
B5	-	-	+	+	+	+	+	+
B6	-	-	+	+	+	+	+	+
B7	-	-	-	+	+	+	+	+
B8	-	-	+	+	+	+	+	+
4'1	-	-	+	+	+	+	+	+
4'2	-	-	+	+	+	+	+	+
4'3	-	-	+	+	+	+	+	+
5.1	-	-	+	+	+	+	+	+
5.2	-	-	+	+	+	+	+	+
5.3	-	-	+	+	+	+	+	+
5RB	-	-	+	+	+	+	+	+
5-1	-	-	+	+	+	+	+	+
5-2	-	-	+	+	+	+	+	+
5-4	-	-	+	+	+	+	+	+
5-5	-	-	+	+	+	+	+	+
5-6	-	-	+	+	+	+	+	+
5-7	-	-	+	+	+	+	+	+
5-8	-	-	+	+	+	+	+	+
5-9	-	-	+	+	+	+	+	+
S1	-	-	+	+	+	+	+	+
S2	-	-	+	+	+	+	+	+
S3	-	-	+	+	+	+	+	+
S4	-	-	-	+	+	+	+	+
S5	-	-	+	+	+	+	+	+
S6	-	-	+	+	+	+	+	+
S7	-	-	+	+	+	+	+	+
S8	-	-	+	+	+	+	+	+
S9	-	-	+	+	+	+	+	+
S10	-	-	+	+	+	+	+	+



**Figure 21.** Chromatographie sur couche mince des phospholipides de *Halobacterium salinarum* DSM 3754<sup>T</sup> (1), *Haloterrigena turkmenica* DSM 5511<sup>T</sup> (2), *Halorubrum coriense* DSM 10384<sup>T</sup> (3) et la souche 5.1 (4).



**Figure 22.** Chromatographie sur couche mince des phospholipides de *Haloterrigena turkmenica* DSM 5511<sup>T</sup> (1), *Halorubrum coriense* DSM 10384<sup>T</sup> (2), la souche S1 (3), la souche B4 (4) et la souche 4'1 (5).

## 5. Chimiotaxinomie

### 5. 1. Analyse de lipides polaires membranaires

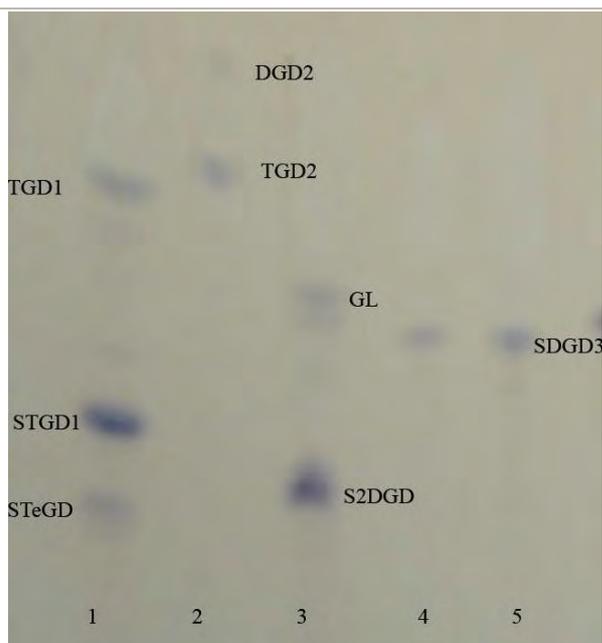
C'est un test d'une grande importance dans la taxinomie des haloarchaea vu que chaque genre possède une composition spécifique en glycolipides. Les lipides polaires extraits des souches ont été analysés selon la technique décrite par Oren *et al.* (1996). Les souches de référence utilisées sont : *Halobacterium salinarum* DSM 3754<sup>T</sup>, *Halococcus morrhuae* NRC 51001<sup>T</sup>, *Haloarcula hispanica* DSM 4426<sup>T</sup>, *Haloferax mediterranei* ATCC 33500<sup>T</sup>, *Halorubrum coriense* DSM 10284<sup>T</sup> et *Haloterrigena turkmenica* DSM 5511<sup>T</sup>.

Après migration sur plaque de gel de silice et détection par pulvérisation de réactifs spécifiques, les glycolipides ont donné des spots pourpres alors que les phospholipides des spots bleus. Ces derniers disparaissent dans les cinq premières minutes. Les figures de 21 à 24 montrent les résultats obtenus par chromatographie sur couche mince de silice. La comparaison des profils des lipides polaires des souches étudiées à ceux des souches de référence utilisées est présentée dans le tableau 25.

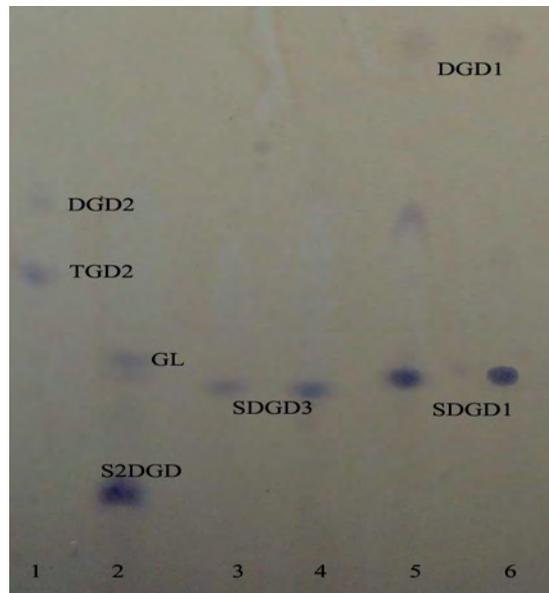
Les souches 1'1, 2a, 2b et 2c possèdent une composition de lipides polaires similaire à celle de *Halobacterium salinarum* DSM 3754<sup>T</sup>. Une présence de PGP-Me, de PG et de PGS comme phospholipides et de trois glycolipides ; STeGD, STGD1 et TGD1. Les deux premiers glycolipides sont caractéristiques du genre *Halobacterium*.

Les souches 1'3, B5, S1 et S9 possèdent le PGP-Me, le PG et le PGS et deux glycolipides ayant les mêmes profils de migration sur plaque de silice que les glycolipides TGD2 et DGD-2. Le premier est celui caractéristique du genre *Haloarcula*.

Les souches B7, B8 et S4 se démarquent des autres souches par la présence de TGD1 comme glycolipide qui est un trait caractéristique du genre *Halococcus*. En outre, on note la présence d'un second glycolipide DGD1 et une absence de PGS comme pour la souche témoin utilisée *Halococcus morrhuae* NRC 51001<sup>T</sup>.



**Figure 23.** Chromatographie sur couche mince des glycolipides de *Halobacterium salinarum* DSM 3754<sup>T</sup> (1), *Haloarcula hispanica* DSM 4426<sup>T</sup> (2), *Haloterrigena turkmenica* DSM 5511<sup>T</sup> (3), *Halorubrum coriense* DSM 10284<sup>T</sup> (4) et la souche 5.1 (5).



**Figure 24.** Chromatographie sur couche mince des glycolipides de *Haloarcula hispanica* DSM 4426<sup>T</sup> (1), *Haloterrigena turkmenica* DSM 5511<sup>T</sup> (2), *Halorubrum coriense* DSM 10284<sup>T</sup> (3), la souche S6 (4), *Haloferax mediterranei* ATCC 33500<sup>T</sup> (5) et la souche 4'1 (6).

**Tableau 25.** Profils des lipides polaires membranaires des souches archéennes isolées et des espèces de référence.

Souche	Phospholipides			Glycolipides								
	PG	PGP-Me	PGS	STeGD	STGD1	S <sub>2</sub> DGD1	SDGD3	SDGD1	TGD1	TGD2	DGD1	DGD2
<b>1</b>	+	+	+	+*	+*	-	-	-	+	-	-	-
1'1	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
2a	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
2b	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
2c	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
<b>2</b>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+*	-	+
1'3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
B5	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
S1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
S9	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<b>3</b>	+	+	-	-	-	-	-	-	+*	-	+	-
B7	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
B8	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
S4	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<b>4</b>	+	+	-	-	-	-	-	+*	-	-	+	-
4'1	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
4'2	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
4'3	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
S3	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
S8	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
5-5	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
5-6	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
5-8	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

1, *Halobacterium salinarum* DSM 3754<sup>T</sup>; 2, *Haloarcula hispanica* DSM 4426<sup>T</sup>; 3, *Halococcus morrhuae* NRC 51001<sup>T</sup>; 4, *Haloferax mediterranei* ATCC 33500<sup>T</sup>.

PG, phosphatidylglycérol ; PGP-Me, phosphatidylglycérol phosphate méthyle ester ; PGS, phosphatidylglycérol sulfate ; STeGD, tétraglycosyl sulfate ; STGD1, triglycosyl sulfate ; S<sub>2</sub>DGD, diglycosyl bisulfate ; SDGD3 et SDGD1, diglycosyl sulfate ; TGD1 et TGD2, triglycosyl ; DGD1 et DGD2, diglycosyl.

\*, glycolipide caractéristique du genre. +, présence; -, absence.

Quand aux souches 4'1, 4'2, 4'3, S3 et S8 ont la même composition de lipides polaires que le genre *Haloferax*. Elle est marquée par une présence de SDGD1 et de DGD1 comme glycolipide et une absence de PGS. Alors que les souches 5-5, 5-6 et 5-8 ont un profil de lipides polaires similaire à celui des souches précédentes. Présence de SDGD1 mais absence de DGD1 qui est une particularité du genre *Halobaculum* (Oren *et al.*, 1995).

Les souches 1'2, B1, B4, 5.1, 5.2, 5.3, 5'RB, 5-1, 5-2, 5-4, 5-7, 5-9, S2, S6, S7 et S10 possèdent un glycolipide similaire à celui de l'espèce *Halorubrum coriense* DSM 10284<sup>T</sup>, utilisée comme souche témoin. Il s'agit de SDGD3, le seul glycolipide présent chez cette espèce et les espèces neutrophiles du genre *Halorubrum* (McGenity & Grant, 2001). Cependant, la souche S7 ne semble pas contenir de PGS qui fait également défaut chez *Halorubrum tebenquichense* (Lizama *et al.*, 2002).

Les souches B3, B6 et S5 possèdent un seul glycolipide similaire à celui rencontré chez le genre *Haloterrigena*. Il s'agit de S<sub>2</sub>-DGD, glycolipide présent chez l'espèce neutrophile *Haloterrigena turkmenica* DSM 5511<sup>T</sup> (Ventosa *et al.*, 1999).

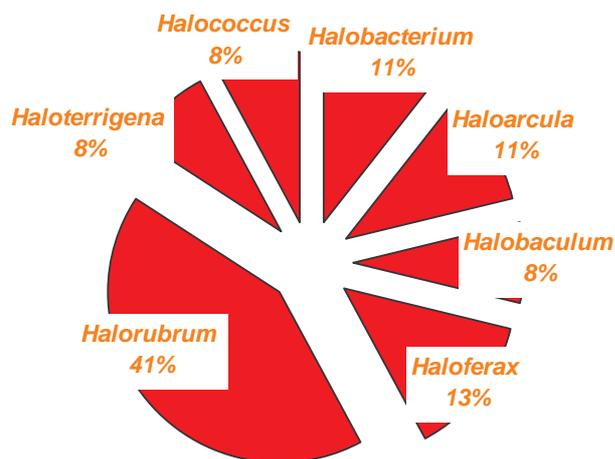
**Tableau 25.** Profils des lipides polaires membranaires des souches archéennes isolées et des espèces de référence (suite).

Souches	Phospholipides			Glycolipides								
	PG	PGP-Me	PGS	STeGD	STGD1	S <sub>2</sub> DGD1	SDGD3	SDGD1	TGD1	TGD2	DGD1	DGD2
<b>5</b>	+	+	+	-	-	-	+*	-	-	-	-	-
1'2	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
B1	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
B4	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
5.1	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
5.2	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
5.3	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
5'RB	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
5-1	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
5-2	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
5-4	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
5-7	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
5-9	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
S2	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
S6	+	+	+	-	-	-	Gl	-	-	-	-	-
S7	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
S10	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<b>6</b>	+	+	-	-	-	+*	-	-	-	-	-	-
B3	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
B6	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
S5	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

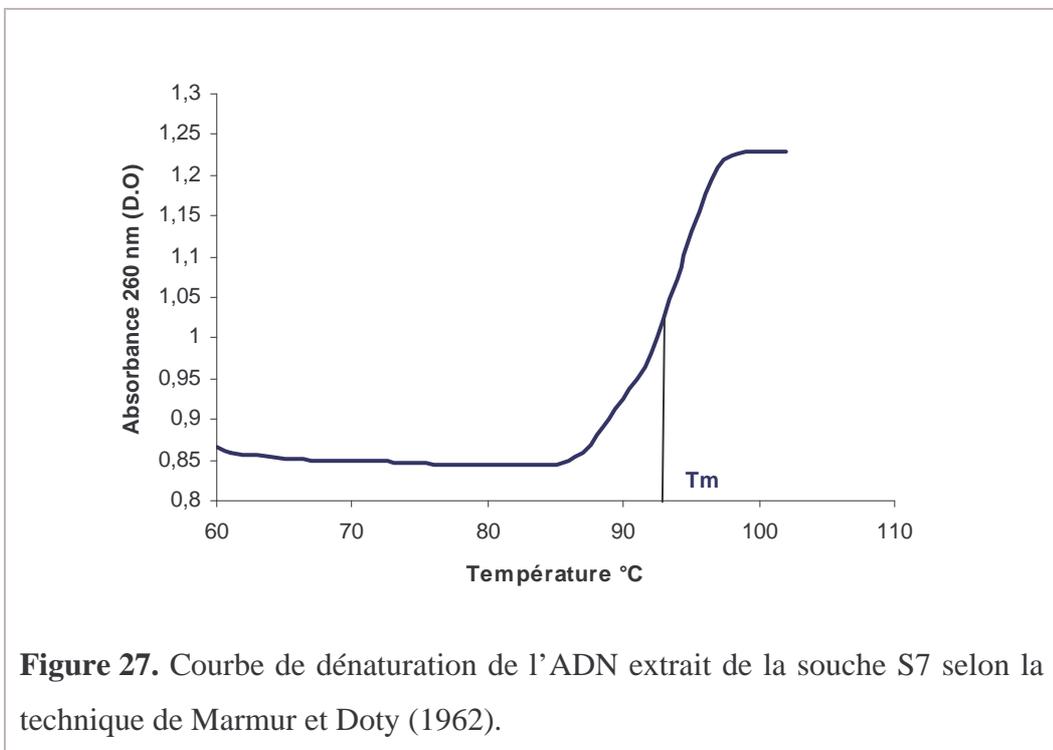
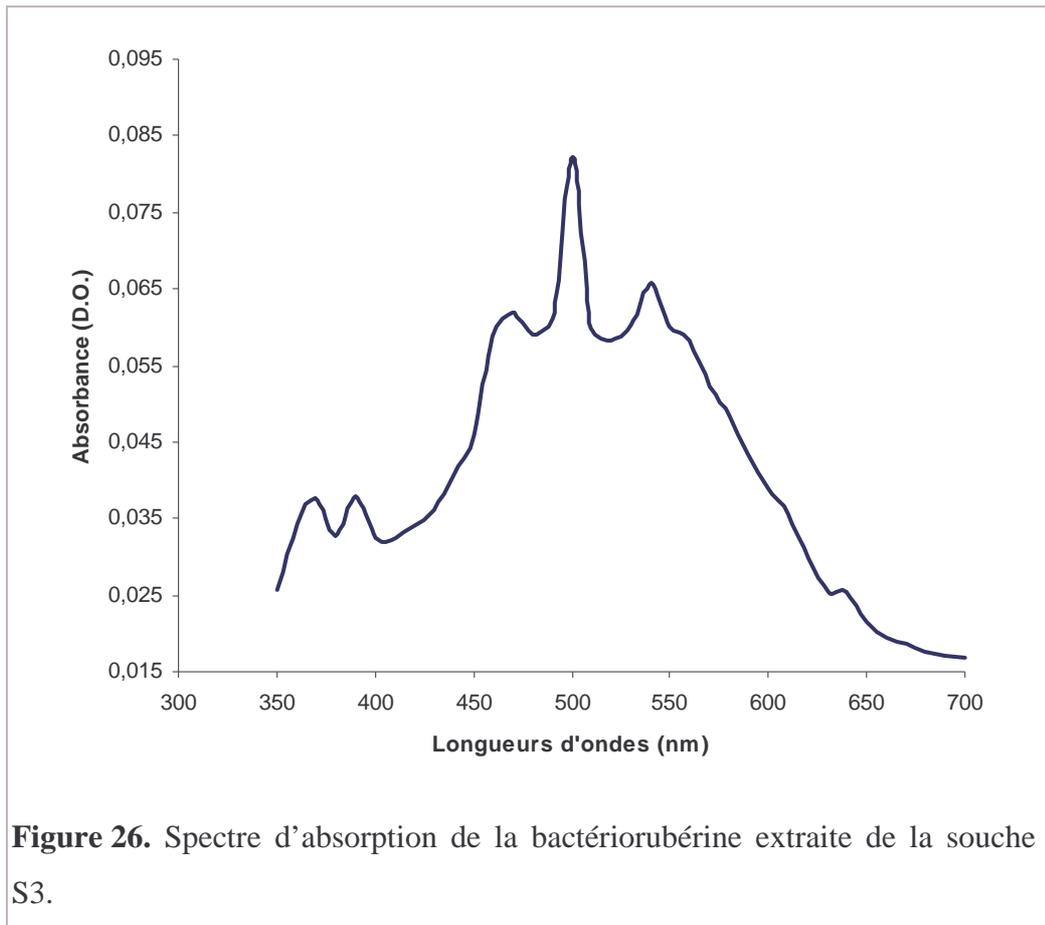
5, *Halorubrum coriense* DSM 10284<sup>T</sup>; 6, *Haloterrigena turkmenica* DSM 5511<sup>T</sup>. PG, phosphatidylglycérol ; PGP-Me, phosphatidylglycérol phosphate méthyle ester ; PGS, phosphatidylglycérol sulfate ; SteGD, tétraglycosyl sulfate ; STGD1, triglycosyl sulfate ; S<sub>2</sub>DGD, diglycosyl bisulfate ; SDGD3 et SDGD1, diglycosyl sulfate ; TGD1 et TGD2, triglycosyl ; DGD1 et DGD2, diglycosyl.

\*, glycolipide caractéristique du genre. +, présence ; -, absence.

Les résultats de l'analyse des lipides polaires membranaires ont indiqué que les souches isolées étaient étroitement apparentées à sept genres décrits, *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Halobaculum*, *Halococcus*, *Haloferax*, *Halorubrum* et *Haloterrigena* de la famille des *Halobacteriaceae*. Parmi les genres identifiés, *Halorubrum* regroupe près de 41 % des souches (Figure 25), ce qui suggère une abondance de ce dernier par rapport aux autres. *Halorubrum* est largement distribué dans les environnements hypersalins comme l'ont montré plusieurs études (McGenity & Grant, 2001 ; Pasié *et al.*, 2005) et contient de nombreux représentants cultivés et décrits (McGenity et Grant, 2001 ; Lizama *et al.*, 2002 ; Ventosa *et al.*, 2004 ; fan *et al.*, 2004, Feng *et al.*, 2004 ; Feng *et al.*, 2005 ; Kharroub *et al.*, 2006 ; Cui *et al.*, 2006).



**Figure 25.** Proportion des genres d'haloarchaea isolés selon l'analyse de la composition de lipides polaires.



## 5. 2. Caractérisation de la bactériorubérine

L'extraction du pigment de type caroténoïde des cellules archéennes a été effectuée selon la technique de Gochnauer *et al.* (1972). Le spectre d'absorption de l'extrait cellulaire de la souche S3 est présenté dans la Figure 26, profil représentatif de l'ensemble des souches. L'extrait cellulaire du mélange méthanol-acétone a présenté des maximums d'absorption à 370, 390, 470, 500 et 540 nm et qui selon Gochnauer *et al.* (1972) et Oren (1983b) correspondent aux pics d'absorption de l' $\alpha$ -bactériorubérine qui un des composant de la membrane rouge des archaea halophiles extrêmes.

## 6. Caractérisation des acides nucléiques

### 6. 1. Détermination du contenu en guanine et cytosine de l'ADN génomique

Après une étude de la position systématique, basée sur des caractères phénotypiques, nous avons complété la description de vingt cinq souches par l'étude de la composition en bases de l'ADN génomique (GC mol%) selon la technique de dénaturation thermique de Marmur et Doty (1962). Dans cette technique, l'ADN à analyser est extrait, purifié puis soumis à une dénaturation thermique. La séparation de la double hélice est suivie par mesure de l'absorbance à 260 nm. Un exemple de courbe sigmoïde obtenue est présenté sur la Figure 27.

Les températures de fusion  $T_m$  (correspondant à une augmentation de la DO atteignant 50 % de la DO maximale) déterminées pour chaque ADN ont été utilisées dans le calcul du contenu en G+C génomique selon l'équation de Owen & Hill (1979).

Le Tableau 26 présente les différentes valeurs de température de fusion et du contenu en G+C des souches étudiées. Ces valeurs varient de 52,9 à 64,6 mol%. Elles sont dans l'ensemble cohérentes avec les taux du contenu en G+C de la famille des *Halobacteriaceae* et qui varie de 46,9 à 71,2 mol% (Tableau 27-Annexe 9). Les deux souches ayant un GC mol% légèrement inférieur à cette gamme correspondent aux souches S3 et S6.

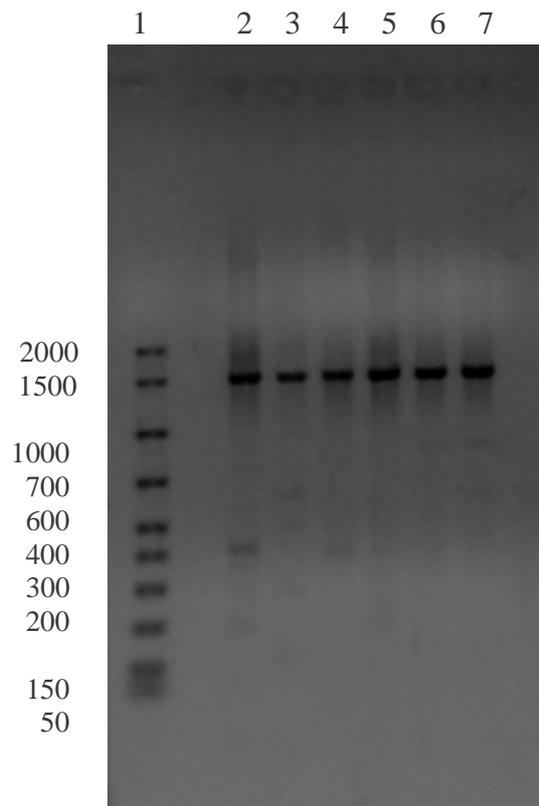
**Tableau 26.** Valeur de Température de fusion ( $T_m$ ) et du contenu en G+C des souches d'haloarchaea étudiées.

Souches	$T_m$ (°C)	G+C (mol %)
1'1	95,2 ± 0,25	63,2 ± 0,6
1'2	95,0 ± 0,2	62,7 ± 0,5
2a	95,5 ± 0,35	63,9 ± 0,7
2b	93,2 ± 0,4	58,3 ± 1,0
B1	93,5 ± 0,4	59,0 ± 1,0
B3	94,0 ± 0,4	60,2 ± 0,9
B4	93,7 ± 0,4	59,5 ± 0,9
4'1	93,0 ± 0,3	57,8 ± 0,6
4'2	93,7 ± 0,4	59,5 ± 0,8
5.1	94,7 ± 0,25	61,9 ± 0,5
5.2	94,0 ± 0,3	60,2 ± 0,7
5'RB	95,7 ± 0,25	64,4 ± 0,6
5-1	95,0 ± 0,25	62,7 ± 0,5
5-2	94,3 ± 0,4	61,0 ± 0,8
5-4	94,5 ± 0,4	61,5 ± 0,7
5-5	95,8 ± 0,3	64,6 ± 0,8
5-7	93,0 ± 0,4	57,8 ± 0,9
S1	94,5 ± 0,25	61,5 ± 0,8
S2	92,4 ± 0,5	56,5 ± 1,1
S3	91,0 ± 0,6	52,9 ± 1,2
S4	94,9 ± 0,4	62,4 ± 0,9
S6	91,2 ± 0,3	53,4 ± 0,7
S7	92,0 ± 0,7	55,4 ± 1,2
S9	92,5 ± 0,6	56,6 ± 1,0
S10	95,0 ± 0,5	62,7 ± 0,9

## 6. 2. Amplification et séquençage du gène d'ARN ribosomal 16S

Les ADN codant pour les ARN ribosomaux 16S des souches archéennes ont d'abord été amplifiés par la technique de la PCR. Une électrophorèse des produits de la PCR est effectuée sur gel d'agarose-TAE. Après migration, le gel est photographié sur table UV (Figure 28).

Les bandes d'ADN ont migré dans la région 1 500 paires de bases du gel d'agarose à 1 %. Les produits de la PCR purifiés des quatorze ont été séquencés et les séquences obtenues (Annexe 8) ont été comparées avec celles d'autres organismes de la base de données GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) (Benson *et al.*, 1999).



**Figure 28.** Résultats de l'amplification de l'ADN ribosomal 16S des souches archéennes. Ladder (canal 1) ; souche 1'2 (canal 2) ; souche 2a (canal 3) ; souche 4'1 (canal 4) ; souche 5.1 (canal 5) ; souche B1 (canal 6) et souche S1 (canal 7).

L'analyse des séquences d'ADNr 16S de la banque de souches archéennes a indiqué que les souches isolées étaient apparentées à des organismes cultivés de la famille des *Halobacteriaceae* provenant d'environnements hypersalins. Elle sont affiliées à cinq genres neutrophiles, *Halobacterium* (Elazari-Volcani, 1957), *Haloarcula* (Torreblanca *et al.*, 1986), *Haloferax* (Torreblanca *et al.*, 1986), *Halorubrum* (McGenity & Grant, 1995) et *Haloterrigena* (Ventosa *et al.*, 1999), hormis la séquence de la souche S3 plus éloignée de l'espèce décrite la plus proche (93 % d'identité avec *Halorhabdus utahensis*) et 96 % de similitude avec la souche non décrite *Haloalcaliphilum atacamensis* (Tableau 28).

### Genre *Halobacterium*

La séquence 16S d'ADN ribosomal de la souche 2a présente une excellente homologie (99 %) aux séquences des souches type de *Halobacterium salinarum* DSM 3754<sup>T</sup> et *Halobacterium noricense* DSM 15987<sup>T</sup>. Cependant, ce degré élevé de similitude n'inclut pas nécessairement cet isolat dans les espèces *Halobacterium salinarum* ou *Halobacterium noricense*. Cette approche moléculaire est limitée car le gène de l'ARNr 16S représente en moyenne 0,05 % du génome du procaryote (Rodriguez-Valera, 2002). Ainsi la séquence de l'ADNr 16S de *Halococcus dombrowskii* DSM 14522<sup>T</sup> présente 99,3 % d'homologie avec celle de l'espèce *Halococcus morrhuae* ATCC 17082<sup>T</sup>, et pourtant ce sont deux espèces différentes (Stan-Lotter *et al.*, 2002).

### Genre *Haloarcula*

La séquence de la souche S1 est affiliée aux membres du genre *Haloarcula* avec une homologie de 97 % avec les souches types des espèces de *Haloarcula hispanica* ATCC 33960<sup>T</sup>, *Haloarcula marismortui* HC8, *Haloarcula argentinensis* JCM 9737<sup>T</sup> et *Haloarcula vallismortis* DSM 3756<sup>T</sup>.

### Genre *Haloferax*

De même une seule souche 4'1 est phylogénétiquement liée aux membres du genre *Haloferax*. Le pourcentage de similitude est de 97 % avec les séquences 16S des ADN ribosomiaux de *Haloferax lucentensis* CECT 5871<sup>T</sup>, *Haloferax volcanii* NCIMB 2012<sup>T</sup>, *Haloferax alexandrinus* JCM 10717<sup>T</sup> et *Haloferax denitrificans* ATCC 35960<sup>T</sup>. La souche

4'1 est aussi apparentée à *Haloferax mediterranei* ATCC 33500<sup>T</sup>, *Haloferax gibbonsii* ATCC 33959<sup>T</sup> et *Haloferax sulfurifontis* DSM 16227<sup>T</sup> avec une homologie de 96 %.

#### Genre *Halorubrum*

Les séquences des souches 1'2, B1, 5.1, 5'RB, 5-1, 5-2, S2, S6 et S7 sont affiliées aux espèces neutrophiles du genre *Halorubrum*. Il s'agit de *Halorubrum coriense* DSM 10284<sup>T</sup>, *Halorubrum trapanicum* NRC 34021<sup>T</sup>, *Halorubrum distributum* JCM 9100<sup>T</sup>, *Halorubrum xinjiangense* JCM 12388<sup>T</sup>, *Halorubrum sodomense* DSM 3755<sup>T</sup>, *Halorubrum terrestre* DSM 10247<sup>T</sup>, *Halorubrum saccharovororum* DSM 1137<sup>T</sup> et *Halorubrum lacusprofundi* DSM 5036<sup>T</sup>. Les similarités basées sur la comparaison des séquences varient entre 93 et 98 % (Tableau 28).

#### Genre *Haloterrigena*

La séquence 16S de l'ADNr de la souche B3 présente 98 % d'homologie à celle de *Haloterrigena thermotolerans* DSM 11552<sup>T</sup> et 97 % à celle de *Haloterrigena saccharevitans* JCM 12889<sup>T</sup> (Tableau 28).

**Tableau 28.** Affiliation phylogénétique des souches archéennes étudiées.

Souche	Groupe	Identité (%)	Espèces proches	Numéro d'accèsion
2a <sup>1</sup>	<i>Halobacterium</i>	99	<i>Halobacterium salinarum</i>	AJ496185
		99	<i>Halobacterium noricense</i>	AJ496185
S1 <sup>2</sup>	<i>Haloarcula</i>	97	<i>Haloarcula hispanica</i>	U68541
		97	<i>Haloarcula marismortui</i> rrb	AF034620
		97	<i>Haloarcula argentinensis</i>	D50849
		97	<i>Haloarcula vallismortis</i>	U17593
4'1 <sup>2</sup>	<i>Haloferax</i>	97	<i>Haloferax lucentensis</i>	AH003665
		97	<i>Haloferax volcanii</i>	K00421
		97	<i>Haloferax alexandrinus</i>	AB037474
		97	<i>Haloferax denitrificans</i>	D14128
		96	<i>Haloferax mediterranei</i>	D11107
		96	<i>Haloferax gibbonsii</i>	D13378
		96	<i>Haloferax sulfurifontis</i>	AY458601
B1 <sup>1</sup>	<i>Halorubrum</i>	98	<i>Halorubrum coriense</i>	S70839
		98	<i>Halorubrum trapanicum</i>	X82168
		98	<i>Halorubrum xinjiangense</i>	AY510707
		98	<i>Halorubrum sodomense</i>	X82169
		98	<i>Halorubrum distributum</i>	D63572
1'2 <sup>2</sup>	<i>Halorubrum</i>	98	<i>Halorubrum saccharovororum</i>	U17364
		96	<i>Halorubrum lacusprofundi</i>	X82170
		96	<i>Halorubrum alkaliphilum</i>	AY510708
		96	<i>Halorubrum tibetense</i>	AY149598
		96	<i>Halorubrum vacuolatum</i>	D87972
5'RB <sup>1</sup>	<i>Halorubrum</i>	98	<i>Halorubrum coriense</i>	S70839
		98	<i>Halorubrum trapanicum</i>	X82168
		98	<i>Halorubrum xinjiangense</i>	AY510707
		98	<i>Halorubrum sodomense</i>	X82169
		97	<i>Halorubrum distributum</i>	D63572

\*, Résultats de BLAST.

**Tableau 28.** Affiliation phylogénétique des souches archéennes étudiées (suite).

Souche	Groupe	Identité (%)*	Espèces proches	Numéro d'accèsion
5.1 <sup>1</sup>	<i>Halorubrum</i>	97	<i>Halorubrum coriense</i>	S70839
		97	<i>Halorubrum sodomense</i>	X82169
		96	<i>Halorubrum trapanicum</i>	X82168
		96	<i>Halorubrum distributum</i>	D63572
		96	<i>Halorubrum xinjiangense</i>	AY510707
		95	<i>Halorubrum terrestre</i>	AB090169
		94	<i>Halorubrum tebenquichense</i>	AJ276887
		93	<i>Halorubrum saccharovororum</i>	U17364
93	<i>Halorubrum lacusprofundi</i>	X82170		
5-1 <sup>1</sup>	<i>Halorubrum</i>	98	<i>Halorubrum coriense</i>	S70839
		98	<i>Halorubrum trapanicum</i>	X82168
		98	<i>Halorubrum distributum</i>	D63572
		98	<i>Halorubrum xinjiangense</i>	AY510707
		97	<i>Halorubrum sodomense</i>	X82169
		97	<i>Halorubrum terrestre</i>	AB090169
5-2 <sup>1</sup>	<i>Halorubrum</i>	98	<i>Halorubrum coriense</i>	S70839
		98	<i>Halorubrum trapanicum</i>	X82168
		98	<i>Halorubrum distributum</i>	D63572
		98	<i>Halorubrum xinjiangense</i>	AY510707
		97	<i>Halorubrum sodomense</i>	X82169
S2 <sup>1</sup>	<i>Halorubrum</i>	98	<i>Halorubrum ezzemoulense</i>	DQ118426
		97	<i>Halorubrum coriense</i>	S70839
		97	<i>Halorubrum distributum</i>	D63572
		97	<i>Halorubrum sodomense</i>	X82169
		97	<i>Halorubrum trapanicum</i>	X82168
		97	<i>Halorubrum terrestre</i>	AB090169
		97	<i>Halorubrum xinjiangense</i>	AY510707
		96	<i>Halorubrum tebenquichense</i>	AJ276887

\*, Résultats du BLAST.

**Tableau 28.** Affiliation phylogénétique des souches archéennes étudiées (suite).

Souche	Groupe	Identité (%) <sup>*</sup>	Souches proches	Numéro d'accension
S6 <sup>1</sup>	<i>Halorubrum</i>	97	<i>Halorubrum coriense</i>	S70839
		97	<i>Halorubrum trapanicum</i>	X82168
		97	<i>Halorubrum xinjiangense</i>	AY510707
		97	<i>Halorubrum sodomense</i>	X82169
		97	<i>Halorubrum distributum</i>	D63572
		96	<i>Halorubrum tebenquichense</i>	AJ276887
S7 <sup>2</sup>	<i>Halorubrum</i>	97	<i>Halorubrum coriense</i>	S70839
		97	<i>Halorubrum ezzemoulense</i>	DQ118426
		96	<i>Halorubrum sodomense</i>	X82169
		96	<i>Halorubrum tebenquichense</i>	AJ276887
		96	<i>Halorubrum terrestre</i>	AB090169
		96	<i>Halorubrum trapanicum</i>	X82168
		96	<i>Halorubrum xinjiangense</i>	AY510707
B3 <sup>2</sup>	<i>Haloterrigena</i>	98	<i>Haloterrigena thermotolerans</i>	AF115478
		97	<i>Haloterrigena saccharevitans</i>	AY820137
		95	<i>Haloterrigena turkmenica</i>	AB004878
		95	<i>Natrinema versiforme</i>	AB023426
S3 <sup>1</sup>		96	<i>Haloalcaliphilum atacamensis</i>	AJ277204
		93	<i>Halorhabdus utahensis</i>	AF071880
		92	<i>Haloarcula marismortui</i>	AY596227
		92	<i>Haloferax volcanii</i>	K00421
		90	<i>Halomicrobium mukohataei</i>	D50850
		91	<i>Halosimplex carlsbadense</i>	AJ586107

<sup>\*</sup>, Résultats du BLAST.

<sup>1</sup>, sequences obtenues avec amorces F8/R1462, <sup>2</sup>, séquences obtenues avec amorces 21F/1525R.

### 6. 3. Discussion

Toutes les souches archéennes isolées appartiennent au groupe d'archaea halophiles extrême aérobies de la famille des *Halobacteriaceae*. La caractérisation phénétique réalisée a permis d'avoir accès aux propriétés physiologiques et biochimiques de ces microorganismes. Toutes les souches donnent des colonies pigmentées en rouge, en orange ou en saumon sur milieu solide due à la présence de bactériorubérine, caractérisée par les valeurs maximales du spectre d'absorption de l'extrait cellulaire. Les photomicrographies électroniques réalisées ont mis en évidence l'existence d'un réel pléomorphisme, qui est un trait fréquent chez ce type de procaryotes. Aucune des souches isolées n'était capable de croître au dessous d'une concentration de 10 % (p/v) de NaCl et toutes exigent la présence de magnésium. Elles sont, par ailleurs, toutes neutrophiles mais capables de croître sur une large gamme de pH (Tableau 29).

L'utilisation de substrats carbonés comme source unique de carbone, d'énergie et/ou d'azote par les isolats est faible ou encore absente et c'est le cas de la plupart des halobactéries (Tableau 27-Annexe 9). L'acétate et le glycérol sont les deux composés les plus assimilés qui selon Oren (1994) et Oren (1999b) sont les plus fréquemment disponibles dans les environnements hypersalins. Une telle physiologie est largement répandue dans ce groupe.

Ce sont des isolats hétérotrophes aérobies à Gram négatif et quelques souches réduisent le nitrate en anaérobiose et/ou fermentent l'arginine. Elles sont toutes sensibles à la bacitracine et à la novobiocine mais résistantes aux antibiotiques inhibant la croissance des bactéries.

La détermination de la composition des lipides polaires membranaires a été d'une grande utilité dans la classification des différentes souches. Elle a permis de générer environ sept genres : *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Halococcus*, *Haloferax*, *Halobaculum*, *Halorubrum* et *Haloterrigena*. Une majorité des souches isolées est retrouvée dans le genre *Halorubrum*. Ce dernier a d'ailleurs été retrouvé dans les lacs hypersalins de différents continents (McGenity & Grant, 2001; Lizama *et al.*, 2002 ; Fan *et al.*, 2004 ; Feng *et al.*, 2004, 2005 ; Kharroub *et al.*, 2006 ; Cui *et al.*, 2006).

**Tableau 29.** Caractérisation morphologique, physiologique, biochimique et génétique des souches d'halobactéries isolées de la sebka Ezzemoul.

Propriétés	1'2	2a	4'1	5'RB	5.1	5-1	5-2
Pigmentation	Orange	Rouge	Pourpre	Rouge	Rouge	Orange	Rouge
Morphologie cellulaire	Pléomo.	Bât. flagellé	Pléomo.	Pléomo.	Bât. flagellé	Pléomo.	Bât. ou cocci flagellé
Gamme de NaCl (M)	3,0-5,2	3,4-5,2	1,7-5,2	1,7-5,2	2,5-4,3	1,7-5,2	1,7-5,2
Optimum (M)	4,3	4,3	3,4	4,3	3,4	3,4	3,4
Exige Mg <sup>2+</sup>	+	+	+	+	+	+	+
Gamme de temp. (°C)	30-55	30-50	30-50	30-50	22-50	22-50	30-50
Optimum (°C)	40	40	40	40	37-40	37-40	40
Gamme de pH	7,0-9,0	6,5-9,0	6,5-9,0	6,5-9,0	6,5-9,0	6,5-9,0	6,5-9,0
Optimum	7,5	7,5	7,5	7,5	7,0-7,5	6,5-7,0	7,5-8,0
Utilisation des acides aminés	+	-	-	-	-	-	-
Prod. d'acide à partir du glucose	+	-	+	+	+	+	+
Hydr.:							
amidon	+	-	+	+	-	+	+
gélatine	+	-	-	-	-	+	-
Esculine	+	-	+	-	-	-	+
T 40	-	-	-	-	-	-	-
T 60	-	-	-	-	-	-	-
T 80	-	-	-	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	+
Oxydase	+	+	+	+	+	+	+
Réd. NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	+	-	-	-	+	-	-
Prod. d'indole	-	-	-	-	-	-	-

nd, non déterminé ; +, réaction positive ; -, réaction négative. Pléom. Pléomorphe ; bât, bâtonnet ; T, Tween.

Le contenu en guanine et cytosine de l'ADN génomique des souches archéennes isolées déterminé par la méthode de dénaturation thermique selon Marmur et Doty (1962) varie de 52,9 à 64,6 mol % (Tableau 29). Elles sont dans l'ensemble cohérentes avec le contenu en GC des membres de la famille des *Haloacteriaceae* (Tableau 27-Annexe 9).

Quand à l'analyse moléculaire basée sur le séquençage du gène d'ARN ribosomal des souches a fourni des informations supplémentaires dans l'affiliation de ces souches. Elles sont apparentées à cinq genres connus d'haloarchaea. Il s'agit de *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Haloferax*, *Halorubrum* et *Haloterrigena* (Tableau 29).

**Tableau 29.** Caractérisation morphologique, physiologique, biochimique et génétique des souches d'halobactéries isolées de la sebkha Ezzemoul (suite).

Propriétés	1'2	2a	4'1	5'RB	5.1	5-1	5-2
Lip. pol :							
Phosph.	PG, PGP-Me PGS	PG, PGP-Me PGS	PG, PGP-Me	PG, PGP-Me PGS	PG, PGP-Me PGS	PG, PGP-Me PGS	PG, PGP-Me PGS
Glyco.	SDGD3	STeGD, STGD1, TGD1	SDGD1, DGD1	SDGD3	SDGD3	SDGD3	SDGD3
GC mol%	62,7	63,9	59,5	64,4	61,9	62,7	61,0
Similitude ADNr 16S	<i>Hrr.</i>	<i>Hb.</i>	<i>Hf.</i>	<i>Hrr.</i>	<i>Hrr.</i>	<i>Hrr.</i>	<i>Hrr.</i>

nd, non déterminé ; +, réaction positive ; -, réaction négative ; lip. pol, lipides polaires ; phosph, phospholipides ; Glyco, glycolipides.

*Hrr.*, *Halorubrum*; *Hb.*, *Halobacterium* ; *Hf.*, *Haloferax*.

**Tableau 29.** Caractérisation morphologique, physiologique, biochimique et génétique des souches d'halobactéries isolées de la sebkha Ezzemoul (suite).

Propriétés	B1	B3	S1	S2	S3	S6	S7
Pigmentation	rouge	orange	orange	rouge	orange	rouge	rouge
Morphologie Cellulaire	bât	cocci	pléom.	bât	bât	cocci	bât
Gamme de NaCl (M)	1,7-5,2	2,5-5,2	1,7-5,2	2,5-5,2	2,5-5,2	2,5-5,2	2,5-5,2
Optimum de NaCl (M)	3,4	4,3	3,4	4,3	4,3	3,4	4,3
Exige Mg <sup>2+</sup>	+	+	+	+	+	+	+
Gamme de temp. (°C)	30-50	30-50	30-55	30-50	30-50	30-50	30-50
Optimum (°C)	40	40	45	40	40	40	40

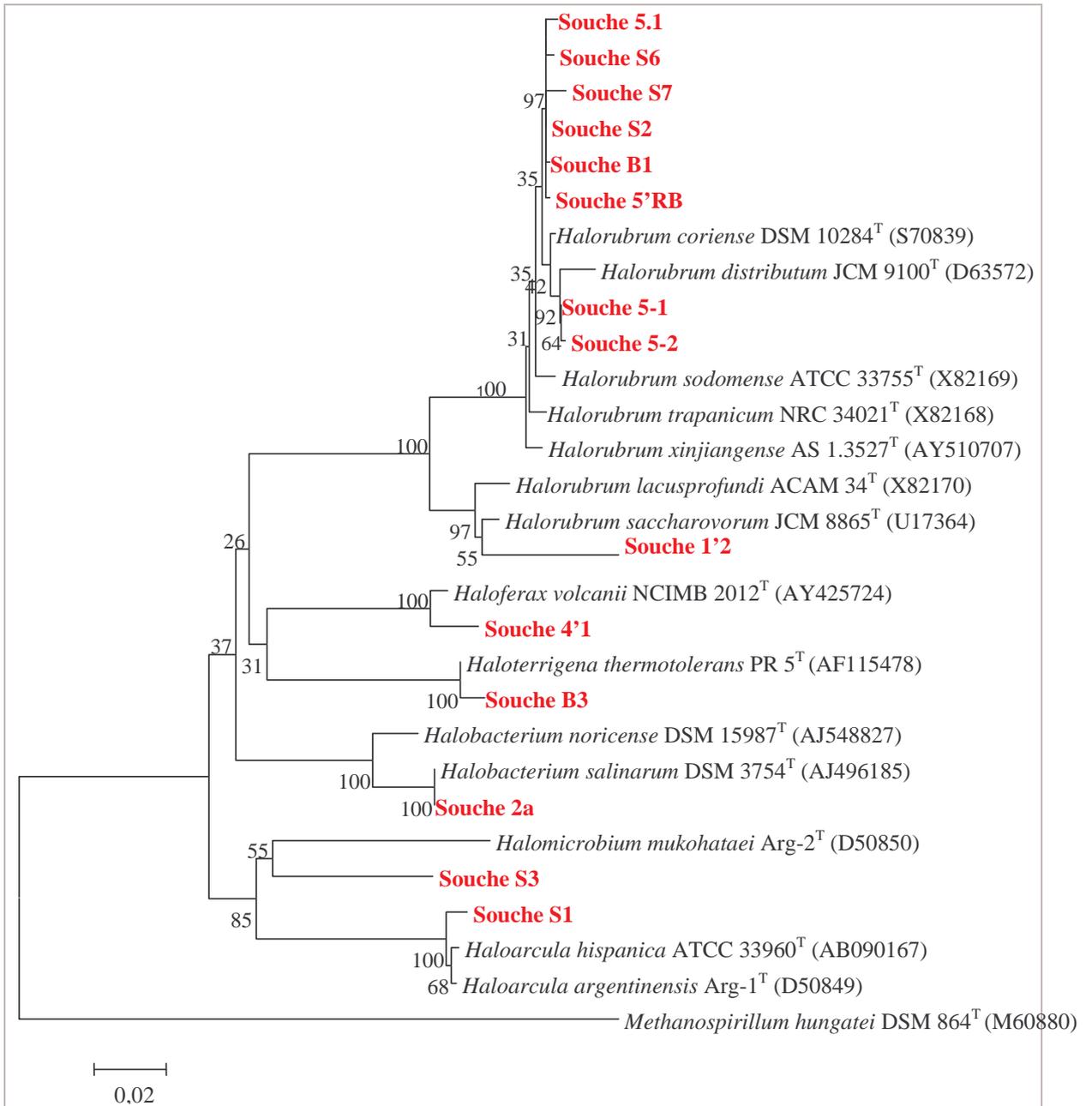
nd, non déterminé ; +, réaction positive ; -, réaction négative.

**Tableau 29.** Caractérisation morphologique, physiologique, biochimique et génétique des souches d'halobactéries isolées de la sebkha Ezzemoul (suite).

Propriétés	B1	B3	S1	S2	S3	S6	S7
Gamme de pH	7,0-9,0	6,5-9,0	5,0-9,0	6,5-9,0	6,5-9,0	6,5-9,0	6,5-9,0
Optimum	7,5-8,0	7,0	7,5-8,0	7,0	6,5-7,0	7,0-7,5	7,0-7,5
Utilisation des acides aminés	-	-	+	+	-	-	-
Prod. d'acide à partir du glucose	+	+	+	+	+	-	+
Hydr.:							
amidon	+	+	+	+	-	-	-
gélatine	-	-	+	-	+	-	-
Esculine	-	-	+	-	+	-	-
T 40	-	-	-	-	+	-	-
T 60	-	-	-	-	+	-	-
T 80	-	-	-	-	+	-	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	+
Oxydase	+	+	+	+	+	+	+
Réd. NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-	+	-	-	+	-	-
Prod. d'indole	-	-	-	-	-	-	-
Lip.pol :							
Phosph.	PG, PGP-Me PGS	PG, PGP-Me	PG, PGP-Me PGS	PG, PGP-Me PGS	PG, PGP-Me	PG, PGP-Me PGS	PG, PGP-Me
Glyco.	SDGD3	S <sub>2</sub> DGD1	TGD2, DGD2	SDGD3	SDGD1, DGD1	Gl	SDGD3
GC mol%	59,0	60,2	61,5	56,5	52,9	53,4	55,4
Similitude ADNr 16S	<i>Hrr.</i>	<i>Ht.</i>	<i>Ha.</i>	<i>Hrr.</i>	nd	<i>Hrr.</i>	<i>Hrr.</i>

Gl, glycolipide ; nd, non déterminé ; +, réaction positive ; -, réaction négative.

*Hrr.*, *Halorubrum* ; *Hb.*, *Halobacterium* ; *Hf.*, *Haloferax*; *Ha.*, *Haloarcula*; *Ht.*, *Haloterrigena*.



**Figure 29.** Arbre phylogénétique basé sur le gène codant l'ARNr 16S montrant la position des souches archéennes isolées. La séquence du gène codant l'ARNr 16S de *Methanospirillum hungatei* DSM 864<sup>T</sup> est utilisée comme outgroup. Les valeurs au niveau des nœuds indiquent les probabilités calculées par bootstrap ; les numéros d'accèsion dans la base de données GenBank sont reportés en face de chaque souche. La barre représente 2 substitutions par 100 nucléotides.

La diversité archéenne des saumures de la sebkha Ezzemoul est discutée ci-dessous, en s'appuyant également sur les arbres phylogénétiques (Figures 29 et 30) et le calcul des distances génétiques (Tableau 30) représentent une vision synthétique de la diversité des haloarchaea isolées de la sebkha Ezzemoul et identifiées par les différentes approches culturelles et moléculaires durant cette étude. La diversité des séquences archéennes obtenues est représentée dans l'arbre phylogénétique (Figure 29) qui inclut également les séquences proches d'haloarchaea. Cet arbre permet mieux de visualiser les affiliations des souches. Les alignements des séquences d'ADNr sont réalisés par Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). L'arbre est construit à partir de Neighbor-Joining en utilisant le test de « bootstrap » (nombres sur les branches) de 100 répliquions en utilisant les distances de Tamura-Nei qui prend en compte les transitions et les transversions du programme Mega 3 (Kumar *et al.*, 2004). L'enracinement a été réalisé en utilisant la séquence ribosomale de l'archéobactérie *Methanospirillum hungatei* DSM 864<sup>T</sup>.

Encore pour mieux cerner l'affiliation des souches étudiées aux espèces connues d'halobactéries, des calculs de distance génétique entre les séquences des gènes d'ARN ribosomiaux ont été entrepris selon le test de Tamura-Nei. Le résultat de cette étude est représenté dans le tableau 30. Les distances génétiques qui les séparent des souches de références sont variables. La souche 5.1 par exemple semble plus liée à *Halorubrum coriense* DSM 10284<sup>T</sup> qu'à *Halorubrum sodomense* ATCC 33755<sup>T</sup> et dont la distance génétique a été estimée à 0,0078 et ceci malgré le fait que la séquence du gène d'ARNr soit similaire à 97 % avec celles des deux espèces précédentes. Il en est de même avec les souches 5-1, 5'RB, S6, 5-2 et B1 affiliées au genre *Halorubrum* où les plus faibles distances sont notées avec l'espèce *Halorubrum coriense* DSM 10284<sup>T</sup>. En outre de faibles distances génétiques sont notées entre certaines souches affiliées au genre *Halorubrum* (Tableau 30). Le calcul des distances a donné un résultat nul entre la souche 2a et la souche type de l'espèce *Halobacterium salinarum* DSM 3757<sup>T</sup>, qui est le reflet d'une étroite parenté entre elles mais n'inclut pas nécessairement la souche 2a dans cette espèce. La souche S3 forme un clade avec

**Tableau 30.** Matrice de distances génétiques archéennes calculées selon Tamura-Nei du programme Mega 3.

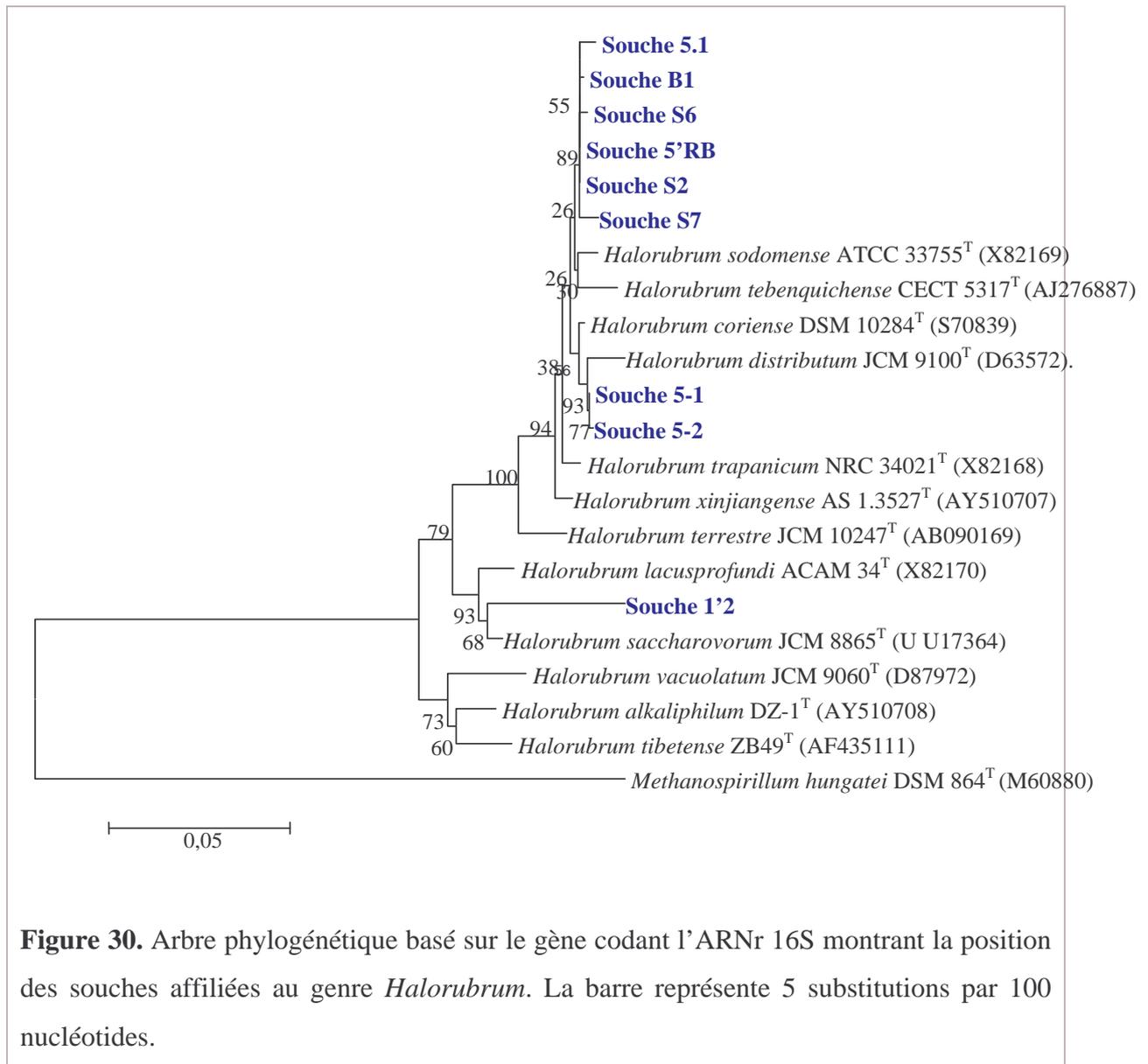
S	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1														
2	0,029													
3	0,141	0,136												
4	0,145	0,135	0,012											
5	0,145	0,135	0,014	0,009										
6	0,147	0,142	0,012	0,013	0,009									
7	0,156	0,152	0,023	0,021	0,016	0,013								
8	0,125	0,128	0,049	0,546	0,524	0,056	0,062							
9	0,132	0,129	0,053	0,058	0,053	0,057	0,063	0,013						
10	0,132	0,121	0,138	0,137	0,137	0,141	0,150	0,124	0,124					
11	0,275	0,267	0,314	0,316	0,315	0,322	0,328	0,302	0,300	0,283				
12	0,170	0,169	0,174	0,163	0,159	0,169	0,174	0,158	0,153	0,174	0,393			
13	0,143	0,149	0,165	0,160	0,168	0,165	0,173	0,163	0,164	0,143	0,281	0,116		
14	0,110	0,103	0,137	0,139	0,144	0,146	0,154	0,136	0,138	0,104	0,270	0,173	0,150	
15	0,143	0,149	0,163	0,159	0,156	0,164	0,172	0,162	0,163	0,144	0,284	0,113	0,003	0,149
16	0,146	0,142	0,011	0,012	0,014	0,007	0,019	0,054	0,058	0,140	0,325	0,169	0,163	0,145
17	0,150	0,146	0,087	0,088	0,077	0,085	0,092	0,042	0,052	0,146	0,332	0,182	0,175	0,160
18	0,139	0,131	0,147	0,146	0,146	0,150	0,160	0,133	0,133	0,018	0,289	0,180	0,148	0,113
19	0,145	0,140	0,013	0,014	0,017	0,010	0,021	0,054	0,061	0,144	0,328	0,175	0,166	0,144
20	0,143	0,149	0,167	0,165	0,162	0,169	0,176	0,167	0,168	0,145	0,281	0,117	0,007	0,151
21	0,142	0,138	0,007	0,009	0,011	0,004	0,015	0,051	0,054	0,136	0,320	0,169	0,160	0,141
22	0,117	0,111	0,144	0,145	0,151	0,152	0,161	0,144	0,146	0,109	0,279	0,181	0,155	0,006
23	0,000	0,029	0,141	0,145	0,145	0,147	0,156	0,125	0,132	0,132	0,275	0,170	0,143	0,110
24	0,145	0,141	0,014	0,011	0,006	0,004	0,010	0,052	0,053	0,140	0,322	0,165	0,163	0,142
25	0,141	0,136	0,009	0,010	0,012	0,005	0,016	0,052	0,056	0,138	0,322	0,171	0,159	0,143
26	0,111	0,101	0,162	0,155	0,155	0,162	0,169	0,157	0,160	0,121	0,283	0,105	0,112	0,109
27	0,145	0,140	0,010	0,011	0,013	0,006	0,018	0,053	0,057	0,139	0,323	0,172	0,163	0,144
28	0,147	0,142	0,015	0,012	0,007	0,005	0,011	0,053	0,054	0,141	0,322	0,163	0,162	0,140
29	0,143	0,139	0,009	0,010	0,012	0,005	0,016	0,052	0,056	0,135	0,322	0,171	0,162	0,143

S, souche ; 1, *Halobacterium salinarum* DSM 3757<sup>T</sup>; 2, *Halobacterium noricense* DSM 15987<sup>T</sup>; 3, *Halorubrum sodomense* ATCC 33755<sup>T</sup>; 4, *Halorubrum trapanicum* NRC 34021<sup>T</sup>; 5, *Halorubrum xinjiangense* AS 1.3527<sup>T</sup>; 6, *Halorubrum coriense* DSM 10284<sup>T</sup>; 7, *Halorubrum distributum* JCM 9100<sup>T</sup>; 8, *Halorubrum saccharovororum* JCM 8865<sup>T</sup>; 9, *Halorubrum lacusprofundi* ACAM 34<sup>T</sup>; 10, *Haloferax volcanii* NCIMB 2012<sup>T</sup>; 11, *Methanospirillum hungatei* DSM 864<sup>T</sup>; 12, *Halomicrobium mukohataei* Arg-2<sup>T</sup>; 13, *Haloarcula hispanica* ATCC 33960<sup>T</sup>; 14, *Haloterrigena thermotolerans* PR-5<sup>T</sup>

**Tableau 30.** Matrice de distances génétiques archéennes calculées selon Tamura-Nei du programme Mega 3 (suite).

S	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
15														
16	0,162													
17	0,174	0,092												
18	0,148	0,150	0,154											
19	0,165	0,009	0,094	0,151										
20	0,010	0,167	0,174	0,150	0,171									
21	0,159	0,003	0,088	0,146	0,005	0,164								
22	0,154	0,149	0,168	0,118	0,151	0,156	0,148							
23	0,143	0,146	0,150	0,139	0,145	0,143	0,142	0,117						
24	0,162	0,010	0,081	0,149	0,012	0,166	0,006	0,148	0,145					
25	0,157	0,004	0,089	0,147	0,006	0,163	0,001	0,149	0,141	0,007				
26	0,113	0,161	0,171	0,128	0,163	0,113	0,157	0,117	0,111	0,157	0,159			
27	0,162	0,005	0,090	0,148	0,007	0,167	0,002	0,151	0,145	0,009	0,003	0,160		
28	0,160	0,011	0,083	0,150	0,013	0,164	0,007	0,147	0,147	0,001	0,009	0,156	0,010	
29	0,160	0,004	0,089	0,144	0,006	0,166	0,001	0,149	0,143	0,007	0,002	0,159	0,003	0,009

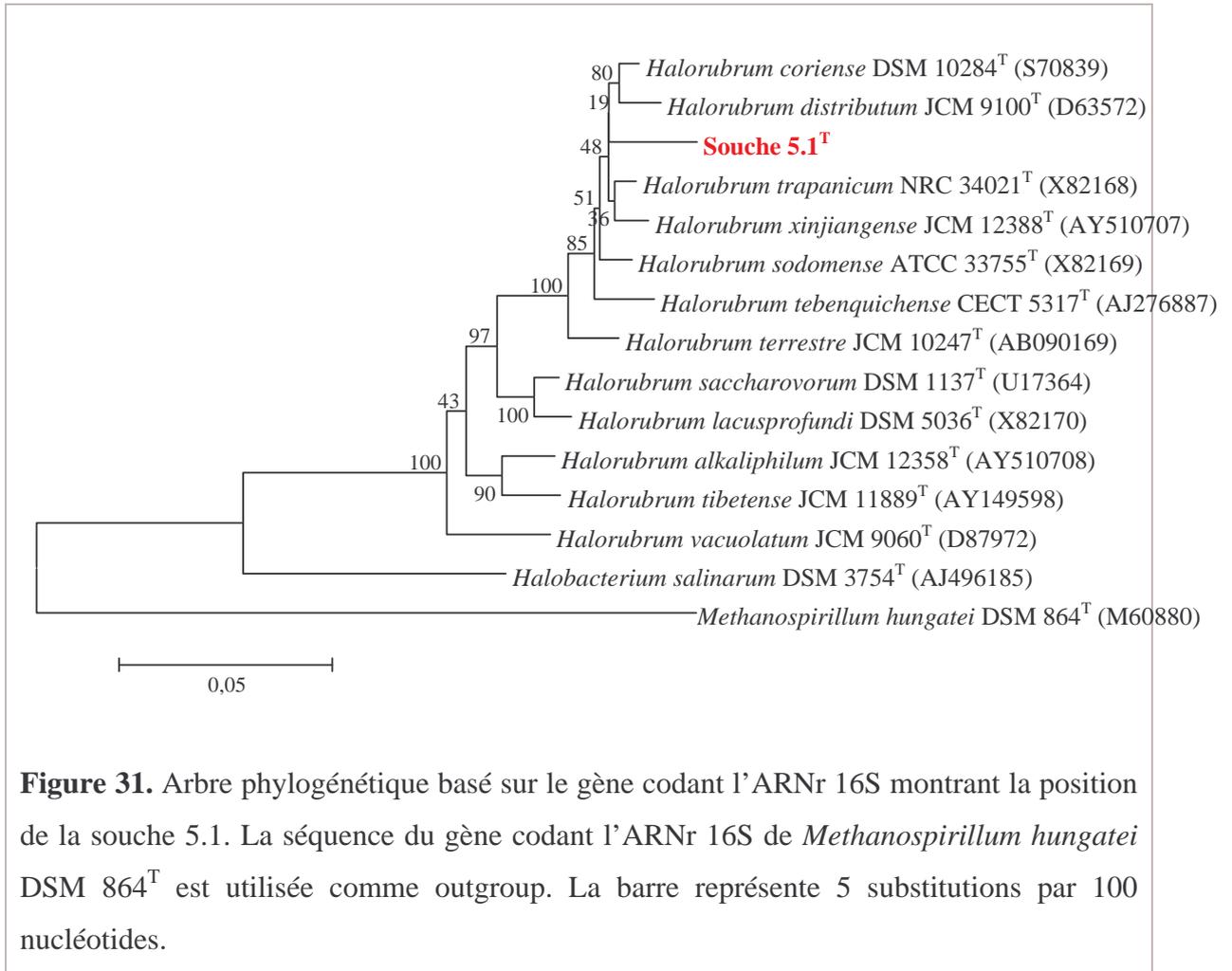
S, souche ; 15, *Haloarcula argentinensis* Arg-1<sup>T</sup> ; 16, Souche 5.1 ; 17, Souche 1'2 ; 18, Souche 4'1 ; 19, Souche S7 ; 20, Souche S1 ; 21, Souche S2 ; 22, Souche B3 ; 23, Souche 2a ; 24, Souche 5-1 ; 25, souche 5'RB ; 26, Souche S3 ; 27, Souche S6 ; 28, Souche 5-2 ; 29, Souche B1.



**Figure 30.** Arbre phylogénétique basé sur le gène codant l'ARNr 16S montrant la position des souches affiliées au genre *Halorubrum*. La barre représente 5 substitutions par 100 nucléotides.

Les analyses phylogénétiques ont indiqué l'affiliation de neuf souches au genre *Halorubrum*. L'arbre phylogénétique construit avec les séquences des ADNr 16S de ces souches et espèces proches possède une topologie avec deux clades (Figure 30). Le premier clade regroupe les séquences de *Halorubrum saccharovorum* JCM 8865<sup>T</sup>, *Halorubrum lacusprofundi* ACAM34<sup>T</sup> et la souche 1'2, tandis que le deuxième clade regroupe les séquences des autres souches affiliées au genre *Halorubrum* avec celles de *Halorubrum coriense* DSM 10284<sup>T</sup>, *Halorubrum distributum* JCM 9100<sup>T</sup>, *Halorubrum sodomense* ATCC 33755<sup>T</sup>, *Halorubrum trapanicum* NRC 34021<sup>T</sup> et *Halorubrum xinjiangense* AS 1.3527<sup>T</sup>.

Les résultats de l'analyse des lipides polaires obtenus concordent dans l'ensemble avec ceux de l'étude phylogénétique basée sur la comparaison des séquences de l'ADNr 16S à celles de la base de données (Tableau 28). Ainsi, la souche 2a possède les glycolipides, S-TGD-1 et S-TeGD-1, caractéristiques du genre *Halobacterium*. De même, le séquençage a confirmé son apparenté aux deux seules espèces décrites du genre *Halobacterium* (*Halobacterium salinarum* et *Halobacterium noricense*). Il en est de même des autres souches où le résultat du type de glycolipide corrobore avec celui du séquençage. La seule exception à cette règle est représentée par la souche S3 dont la composition des lipides polaires membranaires est similaire à celle des membres du genre *Haloferax*. Mais, malgré cette similitude, l'analyse phylogénétique a démontré que la souche S3 est apparentée à un degré moindre aux séquences du gène d'ADNr des espèces du genre *Haloferax* (92 %) et ne présente que 96 % d'identité avec la séquence la plus proche en banque celle de *Haloalcaliphilum atacamensis*, une haloarchaea non décrite. En outre, toute deux possèdent la même composition de lipides polaires.



**Figure 31.** Arbre phylogénétique basé sur le gène codant l'ARNr 16S montrant la position de la souche 5.1. La séquence du gène codant l'ARNr 16S de *Methanospirillum hungatei* DSM 864<sup>T</sup> est utilisée comme outgroup. La barre représente 5 substitutions par 100 nucléotides.

## 6. 4. Hybridation ADN-ADN

Avec l'ensemble des résultats des analyses phénotypiques et génotypiques et spécialement ceux des lipides polaires membranaires, il est possible de classifier les souches isolées de la sebkha Ezzemoul mais la détermination de l'homologie ADN-ADN permet encore de regrouper sans ambiguïté les souches dans leur taxon respectif. En effet, selon Stackebrandt *et al.* (2002), les hybridations ADN-ADN se sont révélées essentielles pour la définition d'une espèce bactérienne.

Le critère d'homologie pouvant exister entre l'ADN de la souche 5.1 et ceux des souches types d'espèces proches d'*Halorubrum* selon la technique décrite par Ziemke *et al.* (1998).

### 6. 4. 1. Hybridation de la souche 5.1

La séquence de l'ADN ribosomal 16S de la souche 5.1 a été comparée avec les souches provenant de la banque de gènes dont douze souches de *Halorubrum*. La comparaison phylogénétique par analyse de Neighbor-Joining avec positionnement d'une séquence de *Methanospirillum hungatei* DSM 864<sup>T</sup> comme souche ancestrale (positionnement non théorique) est représentée dans la figure 31.

L'ADN extrait de la souche 5.1 a été doublement marqué par la digoxigénine et la biotine. La sonde a été ensuite hybridée avec des ADN provenant d'espèces proches de *Halorubrum* (*Halorubrum coriense* DSM 10284<sup>T</sup>, *Halorubrum sodomense* DSM 3755<sup>T</sup>, *Halorubrum distributum* JCM 9100<sup>T</sup>, *Halorubrum trapanicum* NRC 34021<sup>T</sup>, *Halorubrum xinjiangense* JCM 12388<sup>T</sup>, *Halorubrum tebenquichense* CECT 5317<sup>T</sup>, *Halorubrum terrestre* DSM 10247<sup>T</sup>, *Halorubrum saccharovororum* DSM 1137<sup>T</sup>, *Halorubrum lacusprofundi* DSM 5036<sup>T</sup>).

La quantification des concentrations de la sonde double et simple brin est réalisée par rapport à la droite étalon. Le tableau 31 résume les concentrations des sondes simples et doubles brins (BR % et RBR %).

**Tableau 31.** Taux d'hybridations ADN-ADN de la souche 5.1 et espèces proches d'*Halorubrum*.

Souches	Absorbance	ADN (pg)	S = s × 5 D = d × 2	S + D	BR (%)	RBR (%)
5.1 1s	0,394	388,66	1943,3	4180,62	<b>53,51</b>	<b>100</b>
5.1 1d	0,832	1118,66	2234,32			
5.1 2s	0,436	458,66	2293,33	4167,39	44,97	
5.1 2d	0,723	937	1874			
1 1s	0,562	668,66	3343,32	3702,62	<b>9,7</b>	<b>18,2</b>
1 1d	0,2686	179,66	359,32			
1 2s	0,53	615,33	3076,65	3353,98	8,27	15,45
1 2d	0,244	138,66	277,33			
2 1s	0,5977	728,33	3641,66	4402,32	<b>17,3</b>	<b>32,4</b>
2 1d	0,3889	380,33	760,66			
2 2s	0,5835	704,5	3522,5	4153,16	15,8	29,53
2 2d	0,35	315,33	630,66			
3 1s	0,6126	753 ?1	3765,5	4250	<b>11,4</b>	<b>21,3</b>
3 1d	0,306	242,25	484,5			
3 2s	0,6350	790,33	3951,65	4290,98	9,95	18,59
3 2d	0,2890	213,66	427,33			
4 1s	0,5520	652	3260	3599,33	<b>9,4</b>	<b>17,5</b>
4 1d	0,2626	169,66	339,33			
4 2s	0,6300	782	3910	4307,33	9,2	17,19
4 2d	0,2800	198,66	397,33			
5 1s	0,5265	609,5	3047,5	3346,5	8,93	16,69
5 1d	0,2505	149,5	299			
5 2s	0,4795	531,16	2955,8	3249,46	<b>9,04</b>	<b>16,9</b>
5 2d	0,2489	146,83	293,66			
6 1s	0,5310	617	3085	3320	<b>7,08</b>	<b>13,25</b>
6 1d	0,2313	117,5	235			

**Tableau 31.** Taux d'hybridations ADN-ADN de la souche 5.1 et espèces proches d'*Halorubrum* (suite).

Souches	Absorbance	ADN (pg)	S = s × 5 D = d × 2	S + D	BR (%)	RBR (%)
6 2s	0,5830	703,6	3518,33	3752,99	6,25	11,68
6 2d	0,2312	117,33	234,66			
7 1s	0,5165	592,87	2964,36	3215,49	<b>7,81</b>	<b>14,6</b>
7 1d	0,2361	125,56	251,13			
7 2s	0,4950	557	2785	2891	3,66	6,83
7 2d	0,1926	53	106			
8 1s	0,5218	601,66	3008,33	3197,33	<b>5,91</b>	<b>11,05</b>
8 1d	0,2175	94,5	189			
8 2s	0,5125	586,16	2930,83	3057,3	4,13	7,71
8 2d	0,1987	63,16	126,33			
9 1s	0,5019	568,66	2843,3	2987,3	<b>4,8</b>	<b>9,03</b>
9 1d	0,204	72	144			
9 2s	0,4987	563,16	2815,83	2907,83	3,16	5,90
9 2d	0,1884	46	92			

1, *Halorubrum coriense* DSM 10284<sup>T</sup>; 2, *Halorubrum sodomense* DSM 3755<sup>T</sup>; 3, *Halorubrum distributum* JCM 9100<sup>T</sup>; 4, *Halorubrum trapanicum* NRC 34021<sup>T</sup>; 5, *Halorubrum xinjiangense* JCM 12388<sup>T</sup>; 6, *Halorubrum tebenquichense* CECT 5317<sup>T</sup>; 7, *Halorubrum terrestre* DSM 10247<sup>T</sup>; 8, *Halorubrum saccharovororum* DSM 1137<sup>T</sup> et 9, *Halorubrum lacusprofundi* DSM 5036<sup>T</sup>. s, simple brin ; d, double brin.

BR % = (D/ S + D) × 100 et RBR % = valeur × 100/BR %.

La figure 32 (Annexe 10) montre une courbe étalon classiquement réalisée. Les concentrations d'ADN marqués ont été mesurées par la D.O. à 405 nm à l'aide d'un appareil ELISA.

D'après cette courbe,  $Y = 0,0006 x + 0,1608$  où Y représente la D.O. et x la concentration de la sonde.

Les neuf espèces d'*Halorubrum* ont montré un niveau d'homologie de l'ADN relativement faible avec la sonde. Les taux d'hybridations varient de 9,03 à 32,4 % (Tableau 31). Le taux le plus élevé correspond à l'hybridation de la sonde avec *Halorubrum sodomense* DSM 3755<sup>T</sup>. Sur la base des faibles taux d'hybridations ADN-ADN, des caractéristiques biochimiques et physiologiques ne correspondant à aucune des espèces connues du genre *Halorubrum*, cette nouvelle espèce a été nommée *Halorubrum ezzemoulense*, puisqu'elle a été isolée de la sebkha Ezzemoul. Une comparaison des principaux caractères de cette nouvelle espèce avec les douze espèces décrites de *Halorubrum* est représentée dans le tableau 32.

**Tableau 32.** Caractéristiques différenciant la souche 5.1<sup>T</sup> des autres espèces du genre *Halorubrum*.

Propriétés	5.1 <sup>T</sup>	1	2	3	4	5
Mobilité	+	+	+	-	+	+
Vacuoles à gaz	-	-	-	-	-	-
Gamme de NaCl (M)	2,5-4,3	2,0-5,2	0,5-4,3	2,5-5,2	1,5-5,2	1,5-5,2
Exigence de Mg <sup>2+</sup>	+	+	+	nd	+	+
Croissance à pH 10,5	-	-	-	-	-	-
T° de croissance (°C)	22-50	30-56	20-50	nd	30-56	4-40
Hydrolyse l'amidon	-	nd	+	-	-	-
Utilisation du:						
Glucose	+	+	+	+	+	+
Saccharose	+	+	+	+	+	nd
Acétate	+	nd	nd	nd	nd	+
Succinate	-	nd	nd	nd	nd	nd
Glycérol	+	+	+	+	+	-
Production d'acide A partir de glucose	+	nd	+	+	+	-
Core du lipide C <sub>20</sub> C <sub>20</sub> et C <sub>20</sub> C <sub>25</sub>	-	-	-	-	-	-
Présence de PGS	+	+	+	+	+	+
G+C (mol %)	61,9 <sup>a</sup>	nd	67,4 <sup>b</sup>	64,3 <sup>b</sup>	71,2 <sup>b</sup>	65,8 <sup>b</sup>

Données sont obtenues de Grant *et al.* (2001) ; Lizama *et al.* (2002) ; Ventosa *et al.* (2004) ; Fan *et al.* (2004) ; Feng *et al.* (2004) ; Feng *et al.* (2005). 1, *Halorubrum coriense* DSM 10284<sup>T</sup>; 2, *Halorubrum sodomense* DSM 3755<sup>T</sup>; 3, *Halorubrum trapanicum* NRC 34021<sup>T</sup>; 4, *Halorubrum saccharovororum* ATCC 29252<sup>T</sup>; 5, *Halorubrum lacusprofundi* JCM 8891. Contenu en G+C est mesurée par température de fusion (a) ou par densitométrie sur gradient de chlorure de césium (b).

✓ **Description de *Halorubrum ezzemoulense* sp. nov.**

*Halorubrum ezzemoulense* (ezze.mou.len'se. N. L. neut. adj. sebkhā Ezzemoul où la souche a été isolée).

Les cellules se présentent sous forme de bâtonnets réguliers et irréguliers, cocci ou des triangles, à Gram négatif et se lysent en eau distillée. Les bâtonnets mesurent  $0,6 \times 1,5$  à  $3,0 \mu\text{m}$ . Les colonies sont circulaires, convexes, entières, à diamètre variant de  $0,5$  à  $1,0 \mu\text{m}$  et sont pigmentées en rouge. La souche 5.1<sup>T</sup> croît sur une concentration de NaCl variant de 15 à 25 % (p/v) (2,5 à 4,3 M) et dont l'optimum est de 20 % (p/v) (3,4 M). Le pH optimum de croissance se situe entre 7,0 et 7,5, et la croissance est possible de pH 6,5 à 9,0. La température optimale est de 37-40°C, mais l'intervalle de croissance va de 22 à 50°C. Le magnésium est nécessaire pour la croissance. Elle possède une catalase et une oxydase.

La souche 5.1<sup>T</sup> est incapable de croître en anaérobiose sur l'arginine et le nitrate. La production de l'indole est négative. Elle ne liquéfie pas la gélatine, et l'hydrolyse de l'amidon, de l'esculine et du Tween 80 est négative. La souche 5.1<sup>T</sup> utilise le glucose, le saccharose, le maltose, l'arabinose, le mannitol, le glycérol, l'acétate, l'oxalate, le citrate et le malate comme unique source de carbone et d'énergie. Par contre, elle est incapable de croître sur le lactose, le xylose, le rhamnose, le galactose, le raffinose, le cellobiose, le mannose, le fructose, l'amidon, l'inositol, le sorbitol, le dulcitol, l'adonitol, la salicine, la cellulose, le malonate, le fumarate, le formiate et les acides aminés comme seule source de carbone, d'énergie et/ou d'azote.

La souche 5.1<sup>T</sup> est sensible à la novobiocine et à la bacitracine mais insensible à la pénicilline G, au chloramphénicol, à l'ampicilline, à la rifampicine, à la streptomycine et à la néomycine. Les lipides polaires membranaires sont des C<sub>20</sub>C<sub>20</sub> dérivés du phosphatidylglycérol, phosphatidylglycérol phosphate méthyle ester.

Elle contient aussi un phosphatidylglycérol sulfate et un diglycosyl diéther sulfaté. Le contenu en G+C de l'ADN génomique est de 61,9 mol % (T<sub>m</sub>).

La souche type est 5.1<sup>T</sup> (= CECT 7099<sup>T</sup> = DSM 17463<sup>T</sup>) isolée de la sebkha Ezzemoul en Algérie. Le nombre d'accès de l'ADNr 16S dans GenBank de la souche 5.1<sup>T</sup> est DQ118426.

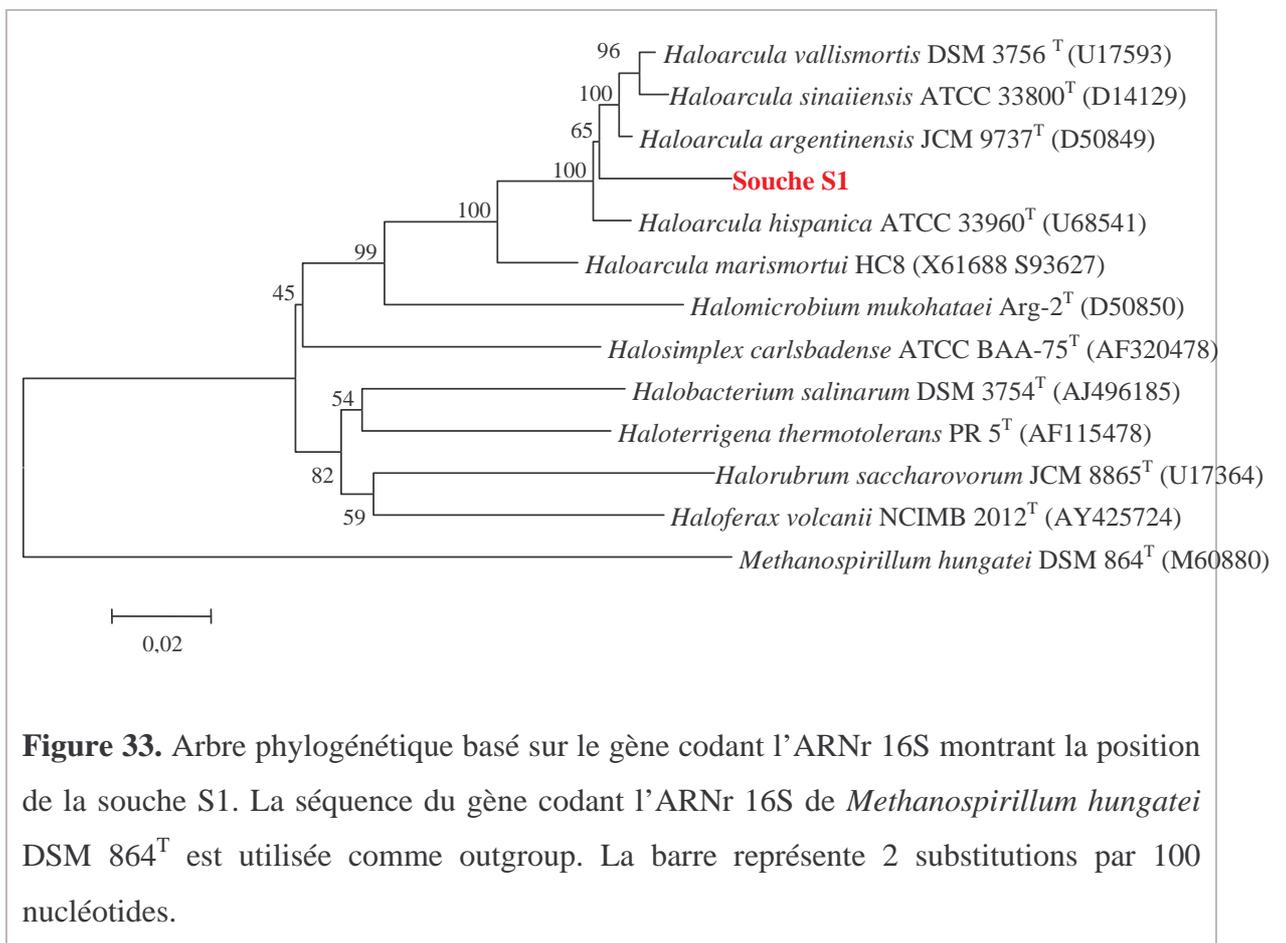
**Tableau 32.** Caractéristiques différenciant la souche 5.1<sup>T</sup> des autres espèces du genre *Halorubrum* (suite).

Propriétés	6	7	8	9	10	11	12
Mobilité	nd	-	-	+	+	+	+
Vacuoles à gaz	nd	+	-	-	-	-	-
Gamme de NaCl (M)	2,5-5,2	2,5-5,2	1,7-5,2	2,5-5,2	1,8-5,2	1,7-5,2	2,0-5,2
Exigence de Mg <sup>2+</sup>	-	-	-	nd	-	nd	-
Croissance à pH 10,5	-	+	+	-	+	-	-
T° de croissance (°C)	35-50	20-50	22-45	28-50	20-44	26-50	10-54
Hydrolyse l'amidon	-	-	-	-	-	-	-
Utilisation du:							
Glucose	+	+	+	-	+	-	+
Saccharose	nd	+	+	-	-	-	+
Acétate	+	+	+	nd	-	nd	-
Succinate	nd	+	+	nd	-	nd	-
Glycerol	+	nd	nd	-	+	+	-
Production d'acide à partir de glucose	-	nd	-	-	+	+	+
Core du lipide C <sub>20</sub> C <sub>20</sub> et C <sub>25</sub> C <sub>25</sub>	nd	+	+	-	+	-	-
Présence de PGS	-	-	-	+	-	+	+
G+G (%)	63,2 <sup>a</sup>	62,7 <sup>a</sup>	63,3 <sup>a</sup>	64,4 <sup>a</sup>	62,1 <sup>a</sup>	63,6	68,0 <sup>b</sup>

Données sont obtenues de Grant *et al.* (2001) ; Lizama *et al.* (2002) ; Ventosa *et al.* (2004) ; Fan *et al.* (2004) ; Feng *et al.* (2004) ; Feng *et al.* (2005). 6, *Halorubrum tebenquichense* CECT 5317<sup>T</sup>; 7, *Halorubrum vacuolatum* JCM 9060<sup>T</sup>; 8, *Halorubrum tibetense* AS 1.3239<sup>T</sup>; 9, *Halorubrum terrestre* VKM B-1739<sup>T</sup>; 10, *Halorubrum alkaliphilum* JCM 12358<sup>T</sup>; 11, *Halorubrum distributum* JCM 9100<sup>T</sup>; 12, *Halorubrum xinjiangense* AS 1.3527<sup>T</sup>. +, positif; -, négatif; nd, non déterminé.

### 6. 4. 2. Hybridation de la souche S1

D'après les résultats du séquençage de l'ADNr 16S, la souche S1 est liée aux membres du genre *Haloarcula* (Tableau 28). La comparaison phylogénétique par analyse de Neighbor-Joining de l'acide nucléique a produit un arbre phylogénétique (Figure 33) montrant un embranchement formé par la souche S1 et le cluster formé par les espèces *Haloarcula vallismortis* DSM 3756<sup>T</sup>, *Haloarcula sinaiensis* ATCC 33800<sup>T</sup> et *Haloarcula argentinensis* JCM 9737<sup>T</sup>.



**Tableau 33.** Taux d'hybridations ADN-ADN de la souche S1 et espèces proches d'*Haloarcula*.

Souches	Absorbance	AND (pg)	S = s × 5 D = d × 2	S + D	BR (%)	RBR (%)
S1 1s	0,274	372	1860	3864	52,86	
S1 1d	0,400	1004	2004			
S1 2s	0,224	122	610	2764	<b>77,93</b>	<b>100</b>
S1 2d	0,415	1077	2154			
1 1s	0,302	512	2560	41,25	<b>37,92</b>	<b>48,66</b>
1 1d	0,356	782	1564			
1 2s	0,290	452	2260	3474	34,94	44,83
1 2d	0,321	604	1214			
2 1s	0,242	212	1060	1814	<b>41,56</b>	<b>53,33</b>
2 1d	0,275	377	754			
2 2s	0,250	252	1260	1994	36,81	47,23
2 2d	0,273	367	734			
3 1s	0,341	707	3535	4329	18,34	23,53
3 1d	0,279	397	794			
3 2s	0,323	617	3085	3959	<b>22,07</b>	<b>28,32</b>
3 2d	0,287	437	874			
4 1s	0,255	277	1385	2209	37,3	47,86
4 1d	0,282	412	824			
4 2s	0,243	217	1085	2009	<b>45,99</b>	<b>59,0</b>
4 2d	0,292	462	924			

1, *Haloarcula marismortui* DSM 3752<sup>T</sup>; 2, *Haloarcula vallismortis* DSM 3756<sup>T</sup>; 3, *Haloarcula hispanica* ATCC 33960<sup>T</sup> et *Haloarcula argentinensis* JCM 9737<sup>T</sup>. s, simple brin ; d, double brin.

BR % = (D/ S + D) × 100 et RBR % = valeur × 100/BR %.

La sonde a été hybridée avec les ADN des souches types de *Haloarcula marismortui* DSM 3752<sup>T</sup>, *Haloarcula vallismortis* DSM 3756<sup>T</sup>, *Haloarcula hispanica* ATCC 33960<sup>T</sup> et *Haloarcula argentinensis* JCM 9737<sup>T</sup>.

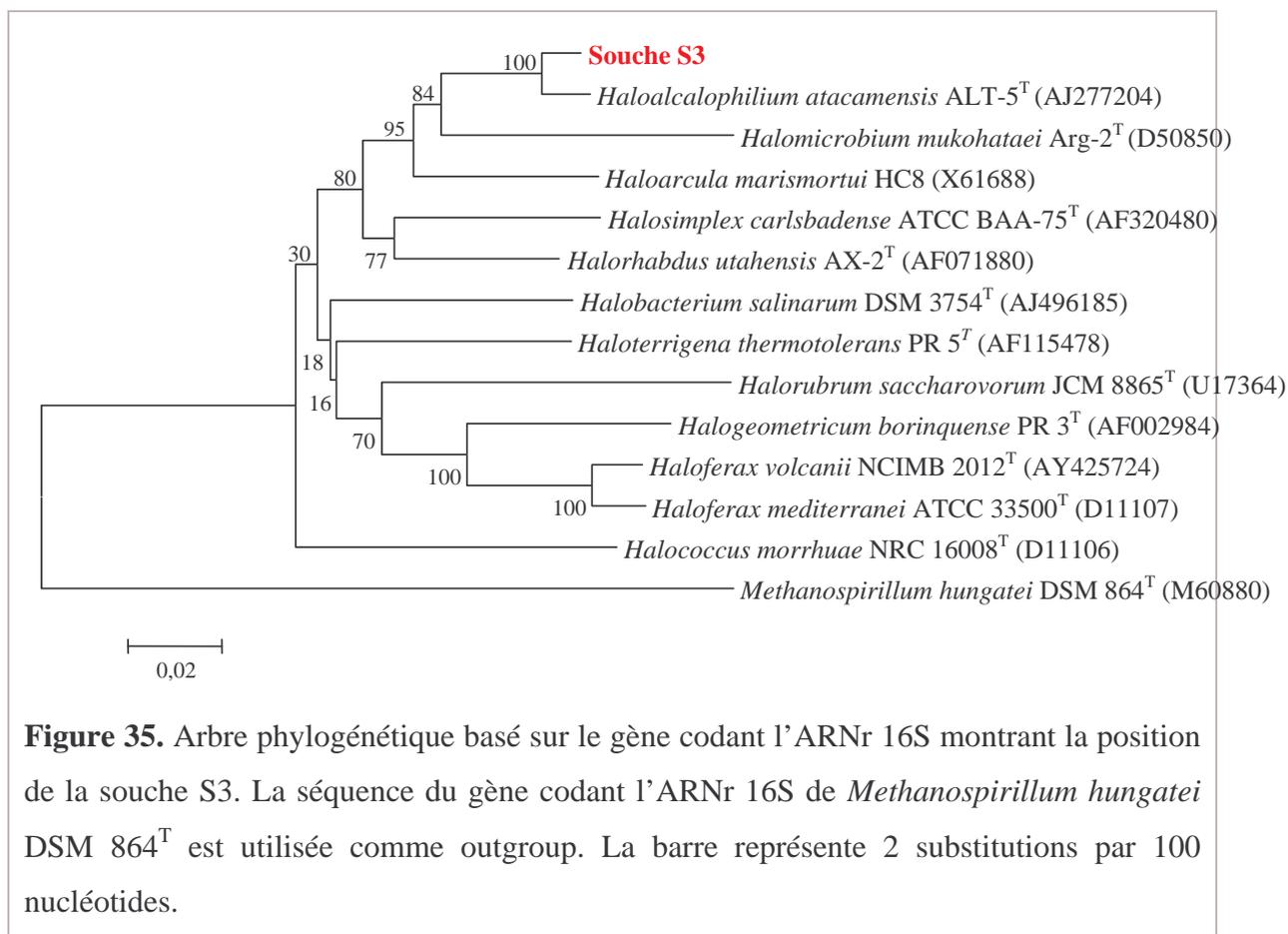
La courbe étalon est représentée par la figure 34 en Annexe 10. D'après cette représentation,

$Y = 0,0002 x + 0,1996$ . Les résultats d'homologie ADN-ADN sont rassemblés dans le tableau 33.

Les pourcentages d'homologies obtenus entre la sonde et les ADN de *Haloarcula marismortui* DSM 3752<sup>T</sup>, *Haloarcula vallismortis* DSM 3756<sup>T</sup>, *Haloarcula hispanica* ATCC 33960<sup>T</sup> et *Haloarcula argentinensis* JCM 9737<sup>T</sup> varient de 28,32 à 59,0. Le pourcentage le plus élevé a été obtenu avec la dernière espèce mais il reste inférieur à 70 %. En accord avec les recommandations du comité Ad Hoc, la souche S1 ne peut être incluse dans aucune des espèces déjà décrites de *Haloarcula*.

#### 6. 4. 3. Hybridation de la souche S3

La séquence 16S de l'ADNr de la souche S3 présente 96 % de similitude avec la séquence la plus proche celle de *Haloalcaliphilium atacamensis*, une haloarchaea non décrite et moins de 93 % d'identité avec les autres membres de la famille des *Halobacteriaceae*. Comme il a été mis en évidence que des séquences d'ADN ribosomiaux 16S ayant des similarités inférieures à 97 % ne correspondent jamais à des pourcentages de réassociations ADN-ADN supérieures à 60 % (Devereux *et al.*, 1990). Pour cette raison le test d'homologie ADN-ADN a été réalisé uniquement avec la souche *Haloalcaliphilium atacamensis* Alt-5<sup>T</sup>. La position phylogénétique de la souche S3 est indiquée par l'arbre (Figure 35) qui a montré une relation de parenté très proche entre la souche S3 et *Haloalcaliphilium atacamensis* ALT-5<sup>T</sup>.



**Tableau 34.** Taux d'hybridations ADN-ADN de la souche S3 avec *Haloalcaliphilium atacamensis*.

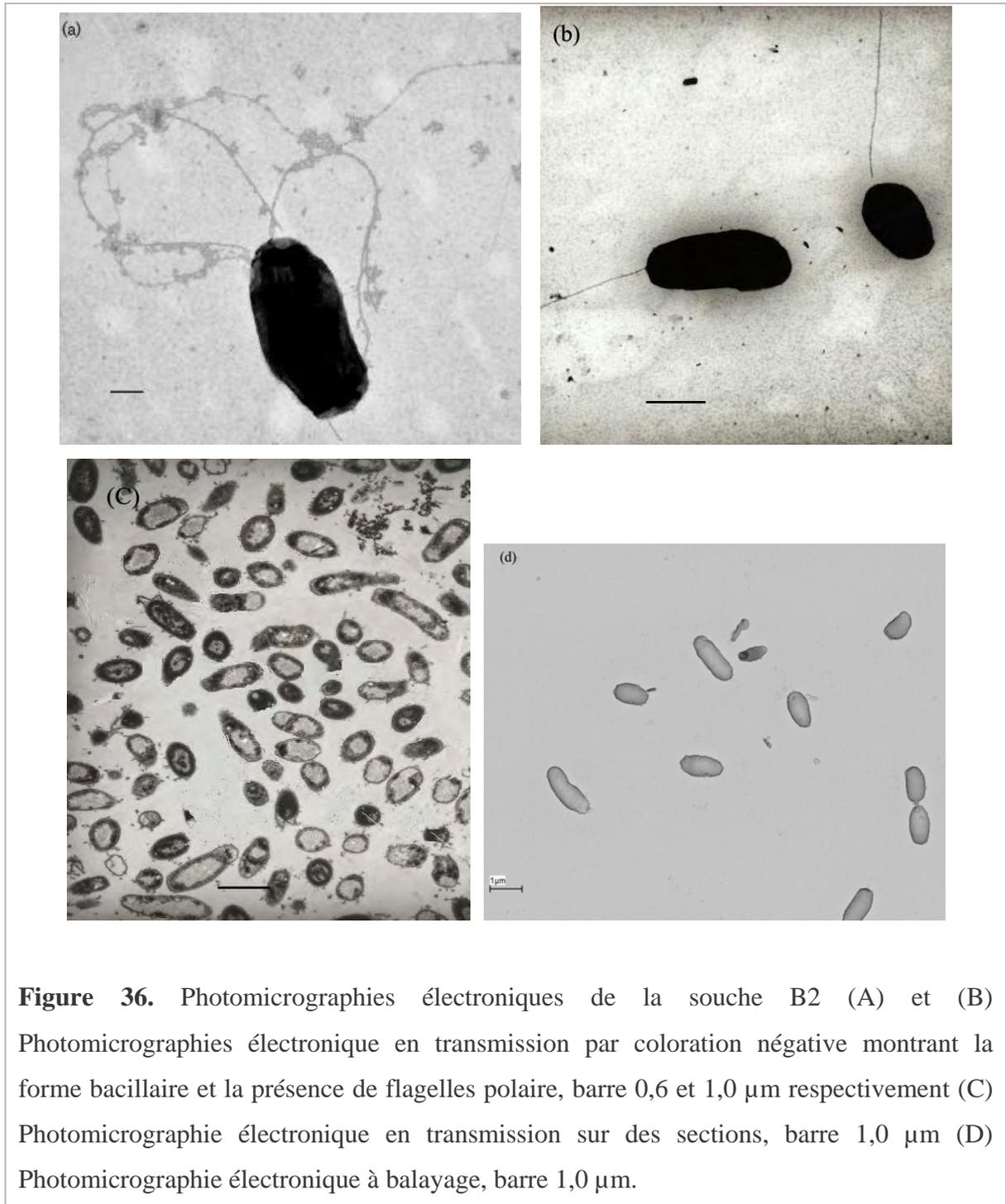
Souches	Absorbance	ADN (pg)	S = s × 5 D = d × 2	S + D	BR (%)	RBR (%)
S3 1s	0,323	2226	11130	26261	<b>57,6</b>	<b>100</b>
S3 1d	0,590	7566	15131			
S3 2s	0,308	3006	15030	29042	48,25	
S3 2d	0,562	7006	14012			
Alt-5 1s	0,350	2766	13830	25082	<b>44,86</b>	<b>77,88</b>
Alt-5 1d	0,493	5626	11252			
Alt-5 2s	0,360	2966	14830	26802	44,66	<b>77,53</b>
Alt-5 2d	0,511	5986	11972			

Alt-5<sup>T</sup>, souche type de *Haloalcaliphilum atacamensis*, s, simple brin ; d, double brin.

$BR \% = (D / S + D) \times 100$  et  $RBR \% = \text{valeur} \times 100 / BR \%$ .

L'étude d'homologie ADN-ADN a été effectuée avec la souche Alt-5<sup>T</sup> de *Haloalcaliphilum atacamensis*. D'après la courbe étalon, la fonction de la droite est :  $Y = 0,00006 x + 0,2117$ .

D'après les résultats du test d'homologie ADN-ADN (Tableau 34), le taux d'hybridation de la sonde avec l'ADN de l'haloarchaea *Haloalcaliphilum atacamensis* est relativement élevé (supérieur à 70 %). En accord avec le comité Ad Hoc, les deux souches devraient appartenir à la même espèce. Mais si on considère le pourcentage de similitude des séquences nucléiques, les deux souches ne peuvent appartenir à la même espèce. Tout ceci peut s'expliquer par un mauvais séquençage du 16S de l'ADNr de l'haloarchaea. En effet, la séquence du gène de l'ARNr de *Haloalcaliphilum atacamensis* envoyée à GenBank comprend énormément de nucléotides ambigus. Par ailleurs, les résultats de l'analyse des lipides polaires de *Haloalcaliphilum atacamensis* ont indiqués la même composition que celle de la souche S3. En outre, toutes deux présentent le même pourcentage de similitude aux séquences d'ADNr 16S d'espèces proches.



## 1. Morphologie des souches bactériennes

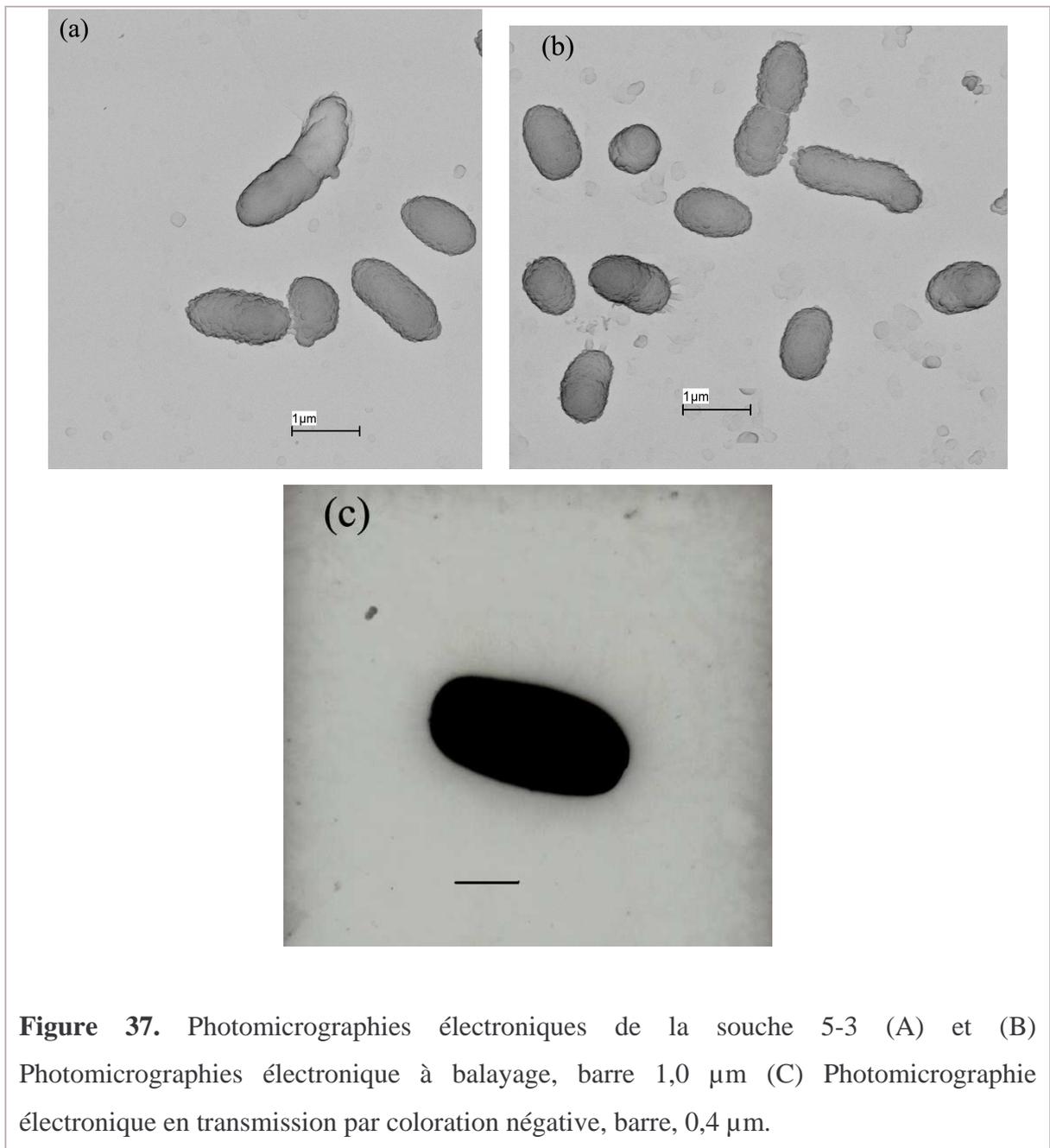
Peu de colonies obtenues sont apigmentées (crèmes ou beiges). L'absence de pigmentation est en général une caractéristique des bactéries halophiles (Ventosa *et al.*, 1998 ; Wainø *et al.*, 1999 ; Bouchotroch *et al.*, 2001 et Arahal *et al.*, 2002). A l'heure actuel, uniquement trois espèces de bactéries sont décrites comme des aérobies halophiles extrêmes, *Halovibrio denitrificans*, *Halospina denitrificans* (Sorokin *et al.*, 2006) et *Salicola marasensis* (Maturrano *et al.*, 2006b). La plupart des espèces bactériennes connues sont des halophiles modérées ou des halotolérantes.

Les colonies des deux souches bactériennes isolées sont circulaires, convexes légèrement bombées d'un contour régulier et dont le diamètre varie de 2 à 4 mm en 5 jours d'incubation à 37 °C.

Les deux bactéries sont à Gram-négatif, en forme de bâtonnets à extrémités arrondies et dont les dimensions moyennes des cellules ont été déterminées à l'aide de photomicrographies électroniques en transmission et à balayage (Figures 36 et 37).

Les cellules de la souche B2 mesurent environ 0,4 à 0,6 µm de largeur par 0,9 à 2,4 µm de longueur. Elles sont mobiles grâce à des flagelles polaire à arrangement lophotriche selon la figure 36A et monotriche selon la figure 36C. L'observation microscopique en transmission sur des sections (Figure 36B) a montré des bâtonnets et des cellules légèrement arrondies. Le nucléoïde au centre est entouré par le cytoplasme et d'une fine couche correspondant à l'enveloppe.

A l'instar de la souche B2, les cellules de la souche 5-3 sont des bâtonnets immobiles mesurant de 0,6 à 0,8  $\mu\text{m}$  de largeur par 0,9 à 1,5  $\mu\text{m}$  de longueur. Des formes légèrement arrondies ont également été observées (Figure 37). La microscopie à balayage a montré des diplobacilles issus probablement d'une division cellulaire.



**Figure 37.** Photomicrographies électroniques de la souche 5-3 (A) et (B) Photomicrographies électronique à balayage, barre 1,0  $\mu\text{m}$  (C) Photomicrographie électronique en transmission par coloration négative, barre, 0,4  $\mu\text{m}$ .

**Tableau 35.** Caractéristiques phénotypiques des isolats bactériens.

Caractéristiques	Souche B2	Souche 5-3
Morphologie	Bâtonnet à flagelles polaires	Bâtonnet non flagellé
Taille des cellules ( $\mu\text{m}$ )	0,4-0,6 $\times$ 0,9-2,4	0,6-0,8 $\times$ 0,9-1,5
Catalase	+	+
Oxydase	+	+
Gamme de NaCl (M)	1,7-4,3	0,9-4,3
Optimum (M)	2,5-3,5	1,3 à 1,7
Gamme de pH	6,0-9,0	6,0-9,0
Optimum	7,0-7,5	7,5
Gamme de température ( $^{\circ}\text{C}$ )	30-45	30-50
Optimum ( $^{\circ}\text{C}$ )	37	37-40
Hydrolyse de:		
Gélatine	+	-
Amidon	+	+
Esculine	-	-
Tween 80	+	-
Réduction du nitrate	+	+
Croissance sur :		
Arabinose	-	-
Cellulose	-	-
Fructose	-	+
Galactose	-	+
Glucose	-	+
Lactose	-	+
Xylose	-	-
Maltose	-	+
Mannose	-	-
Rhamnose	-	-
Saccharose	-	+
Salicine	-	-
Adonitol	-	-

## 2. Propriétés biochimiques et caractérisation physiologique des souches bactériennes

La souche B2 est capable de croître dans un milieu dont la concentration en NaCl est comprise entre 10 et 25 % (p/v) (1,7 et 4,3 M), l'optimum de croissance est observé pour une concentration de 15 à 20 % (p/v) (2,5 à 3,5 M) qui est similaire à celui de certaines haloarchaea. C'est aussi une caractéristique des espèces bactériennes halophiles extrêmes (Sorokin *et al.*, 2006). La souche B2 peut tolérer des variations de température de 30 à 45°C et de pH de 6,0 à 9,0 mais l'optimum est à 37°C et à pH 7,0-7,5 (Tableau 35).

La croissance de l'isolat B2 peut avoir lieu en anaérobiose en présence de nitrate et d'arginine. Elle hydrolyse l'amidon et le Tween 80 et liquéfie la gélatine. Mais elle est incapable d'hydrolyser l'esculine et d'utiliser une grande variété de composés organiques comme seule source de carbone. L'acétate est le seul à être utilisé par cette souche. C'est aussi le cas de *Halovibrio denitrificans* et *Halospina denitrificans* (Sorokin *et al.*, 2006) alors que *Salicola marasensis* peut utiliser certains sucres (Maturrano *et al.*, 2006b). La production d'acide a été détectée lorsque la croissance de la bactérie a lieu sur l'arabinose, le galactose, le glucose et le lactose. La souche B2 est résistante à la kanamycine, la bacitracine, l'anisomycine, la néomycine et à l'ampicilline mais sensible au chloramphénicol et à la pénicilline G.

La souche 5-3 croît sur une concentration de NaCl variant de 5 à 25 % (p/v) (0,9 à 4,3 M) et dont l'optimum est de 7,5 à 10 % (p/v) (1,3 à 1,7 M). Elle exige des concentrations modérées en sel comme c'est le cas des bactéries halophiles modérées. Les intervalles de température et de pH permettant la croissance sont respectivement de 30 à 50°C et de pH 6,0 à 9,0 mais l'optimum est à 37-40°C et à pH 7,5.

La souche 5-3 peut réduire le nitrate en anaérobiose. Elle hydrolyse l'amidon mais pas le Tween 80 et l'esculine. Elle ne liquéfie pas la gélatine et contrairement à la souche B2, elle est capable d'utiliser le fructose, le galactose, le glucose, le lactose, le maltose, le saccharose et le glycérol comme source unique de carbone et d'énergie (Tableau 35).

**Tableau 35.** Caractéristiques phénotypiques des isolats bactériens (suite).

Caractéristiques	Souche B2	Souche 5-3
Dulcitol	-	-
Glycérol	-	+
Inositol	-	-
Mannitol	-	-
Sorbitol	-	-
Acétate	+	-
Benzoate	-	-
Citrate	-	-
Formiate	-	-
Fumarate	-	-
Lactate	-	-
Malate	-	-
Malonate	-	-
Oxalate	-	-
Propionate	-	-
Succinate	-	-
Alanine	-	-
Arginine	-	-
Asparagine	-	-
Cystéine	-	-
Glycine	-	-
Histidine	-	-
Leucine	-	-
Lysine	-	-
Méthionine	-	-
Tryptophane	-	-
Tyrosine	-	-
Production d'acides à partir de :		
Arabinose	+	-
Fructose	-	-
Galactose	+	-

**Tableau 35.** Caractéristiques phénotypiques des isolats bactériens (suite).

Caractéristiques	Souche B2	Souche 5-3
Glucose	+	+
Glycérol	-	-
Lactose	+	-
Maltose	-	-
Mannitol	-	+
Saccharose	-	-
Xylose	-	-
Résistance à :		
Ampicilline	+	+
Bacitracine	+	+
Chloramphénicol	-	-
Néomycine	+	+
Pénicilline G	-	-
Kanamycine	+	-
Anisomycine	+	+
Contenu en G+C (mol %)	56,0 (T <sub>m</sub> )	57,8 (T <sub>m</sub> )

T<sub>m</sub>, température de fusion ; +, réaction positive ; -, réaction négative

Elle est par contre incapable de croître sur les acides aminés et c'est le cas de nombreuses espèces de bactéries halophiles modérées appartenant aux genres *Halomonas* (Ventosa *et al.*, 1998 ; Duckworth *et al.*, 2000 ; Bouchotroch *et al.*, 2001), *Microbulbifer* (Yoon *et al.*, 2003) et *Antarctobacter* (Labrenz *et al.*, 1998). La production d'acide est observée lorsque la croissance de la souche a lieu sur le glucose et le mannitol. La souche 5-3 hydrolyse l'amidon et réduit les nitrates en anaérobiose.

Cet isolat est sensible au chloramphénicol, à la pénicilline G, à la kanamycine mais résistante à l'ampicilline, à la bacitracine, à l'anisomycine et à la néomycine.

Comme toutes les bactéries halophiles hétérotrophes aérobies, les souches B2 et 5-3 possèdent une catalase et une oxydase.

### 3. Lipides membranaires

L'analyse des acides gras membranaires de la souche B2 a été effectuée par l'équipe du Prof. Reiner M. Kroppenstedt du DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen). Cette analyse par chromatographie en phase gazeuse a démontré une prédominance des acides gras essentiellement à 16 et à 18 atomes de carbones (Tableau 36). La composition en acides gras de la membrane de la souche B2 a été comparée à celles de bactéries halophiles modérées et extrêmes proches.

**Tableau 36.** Composition en acides gras membranaires de la souche B2 et espèces proches.

Acides gras	Souche B2	1 <sup>a</sup>	2 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	4 <sup>b</sup>
C <sub>10:0</sub>	5,23	3,26	1,92	1,62	2,09
C <sub>12:0</sub>	2,30	1,53		1,17	0,65
C <sub>12:0</sub> 3-OH	7,73	5,77	3,35	3,36	3,61
C <sub>14:1</sub>			0,84	1,23	1,51
C <sub>14:1</sub> 3-OH				1,06	
C <sub>14:0</sub> 3-OH					
C <sub>14:0</sub>					
Sum feature2	4,51				
C <sub>16:0</sub> N alcohol	3,80				
C <sub>16:1</sub> ω9c	7,45	2,26	3,20		4,79
C <sub>16:1</sub> ω7c			5,22		
C <sub>16:1</sub> ω5c		3,14			
C <sub>16:1</sub>				1,47	0,45
C <sub>16:0</sub>	25,70	15,81	15,40	7,98	15,36
Non identifié			8,02	6,82	8,10
C <sub>18:3</sub> ω6c	1,66				
C <sub>18:1</sub> ω9c	25,79	33,41	46,56	65,52	55,23
C <sub>18:1</sub> ω7c	0,21		10,18		0,91
C <sub>18:0</sub>	3,33	8,50	3,32	5,45	3,13
C <sub>18:0</sub> Me10	7,91	21,55	2,01		3,46

<sup>a</sup>, données sont prises de Maturrano *et al.* (2006b) et <sup>b</sup>, de Sorokin *et al.* (2006).

Somme 2 contient C<sub>16:1</sub> iso I et / ou C<sub>14:0</sub> 3-OH

1, *Salicola marasensis* CECT 7107<sup>T</sup>; 2, *Halovibrio denitrificans* DSM 15503<sup>T</sup>; 3, *Halospina denitrificans* DSM 15505<sup>T</sup>; 4, *Pseudomonas halophila* DSM 3050<sup>T</sup>.

La distribution des acides gras saturés est caractérisée par la prédominance des composés à nombre pairs d'atomes de carbones avec un maximum à C<sub>16:0</sub> (acide palmitique, 25,70 %) et une très faible contribution des acides gras ramifiés iso.

Le C<sub>12:0</sub>3-OH est le β-hydroxy acide dominant retrouvé chez la souche B2. C'est aussi l'acide gras majoritaire chez d'autres bactéries halophiles modérées et extrêmes à Gram négatif appartenant aux genres *Marinobacter* (Nguyen *et al.*, 1999), *Alcanivorax* (Yakimov *et al.*, 1998), *Saccharospirillum* (Labrenz *et al.*, 2003), *Halomonas* (Yoon *et al.*, 2002), *Halovibrio*, *Halospina* et *Pseudomonas* (Sorokin *et al.*, 2006).

Parmi les acides gras identifiés dans le chromatogramme de la souche B2, on a retrouvé jusqu'à 3,80 % d'un nouvel acide gras, l'acide C<sub>16:0</sub>N alcool qui n'a jamais été identifié chez d'autres membres déjà décrits. Les acides gras insaturés présents sont caractérisés par une distribution simple avec prédominance des composés C<sub>16:1</sub>ω9c et C<sub>18:1</sub>ω9c (environ 81,4 % d'acides gras insaturés). Mentionnons que Gorskhova *et al.* (2003) et Sorokin *et al.* (2006), ont rapporté que ces deux acides gras prédominent aussi chez *Marinobacter*, *Pseudomonas halophila*, *Halovibrio* et *Halospina*. De plus, lors de l'analyse des acides gras de la souche B2, on a noté la présence de C<sub>18:3</sub>ω6c (6, 9, 12). La fraction lipidique est également caractérisée par la présence d'un acide gras ramifié en position 10, le C<sub>18:0</sub>Me10 (7,91 %), plus abondant que chez les espèces décrites par Sorokin *et al.* (2006) mais moins que celle de *Salicola marasensis* (Maturrano *et al.*, 2006b) (Tableau 36).

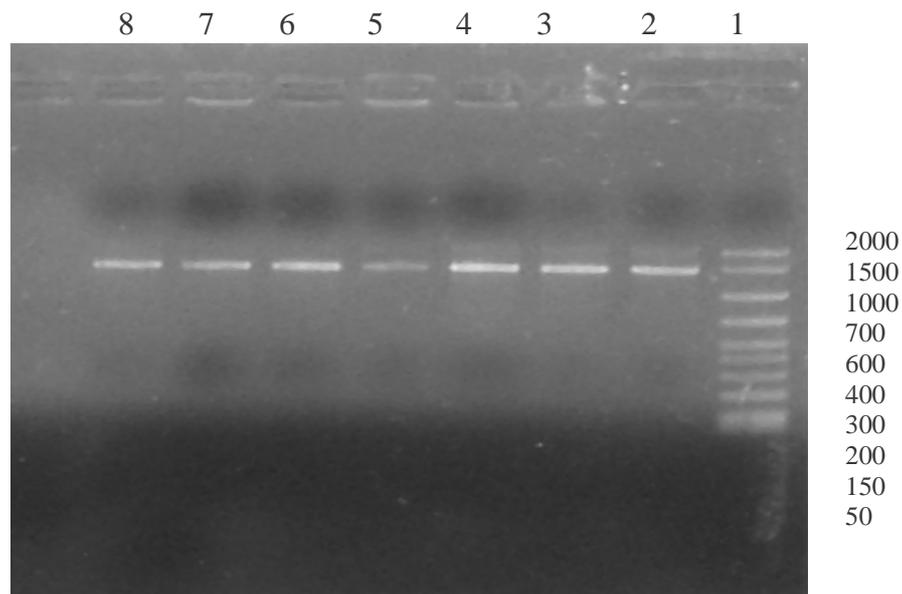
## 4. Caractérisation des acides nucléiques

### 4. 1. Détermination du contenu en guanine et cytosine de l'ADN génomique

Le contenu en GC de l'ADN de la souche B2 déterminé selon la technique de dénaturation thermique est de 56,0 mol%. Il est inférieur à ceux des espèces halophiles proches (Tableau 40). Alors que celui de la souche 5-3 est de 57,8 mol % (Tableau 35) qui se trouve à l'intérieur de la gamme trouvée pour le genre *Halomonas* (50-68 mol%) (.Franzmann *et al.*, 1988 ; Ventosa *et al.*, 1998 ; Martinez-Cánovas *et al.*, 2004c).

#### 4. 2. Amplification et séquençage du gène de l'ARN ribosomal 16S

Les gènes de l'ARNr 16S des souches B2 et 5-3 ont été amplifiés par utilisation de primers 16F27 et 1525R, décrits par (Saiki *et al.*, 1988). Une électrophorèse des produits de la PCR est effectuée sur gel d'agarose-TAE. Après migration, le gel est photographié sur table UV. Les bandes d'ADN ont migré dans la région 1 500 paires de bases (Figure 38).



**Figure 38.** Résultats de l'amplification de l'ADN ribosomal 16S des souches archéennes et bactériennes. Ladder (canal 1) ; souche B2 (canal 2) ; souche 5-3 (canal 3) ; souche S6 (canal 4) ; souche S7 (canal 5) ; souche B3 (canal 6) et souche 5-2 (canal 7). (Souches S6, S7, B3 et 5-2 sont archéennes).

Les séquences des gènes de l'ARN ribosomal 16S des souches B2 et 5-3 obtenues ont été comparées à celles d'autres organismes de la base de données GenBank. Les analyses de similitude (BLAST) effectuées ont indiqué leur affiliation aux *Gamma-Proteobacteria*.

La séquence de la petite sous unité ribosomale de la souche B2 présente jusqu'à 99 % d'identité avec celle de *Salicola marasensis* CECT 7107<sup>T</sup>. Elle présente aussi des homologies de 96 % avec celles de *Pseudomonas halophila* DSM 3050<sup>T</sup> et *Halovibrio denitrificans* DSM 15503<sup>T</sup> et 95 % avec celle de *Halospina denitrificans* DSM 15505<sup>T</sup> (Tableau 37). A l'exception de *Pseudomonas halophila*, les autres espèces sont des bactéries halophiles extrêmes isolées respectivement de lacs hypersalés du Pérou et de la Sibérie.

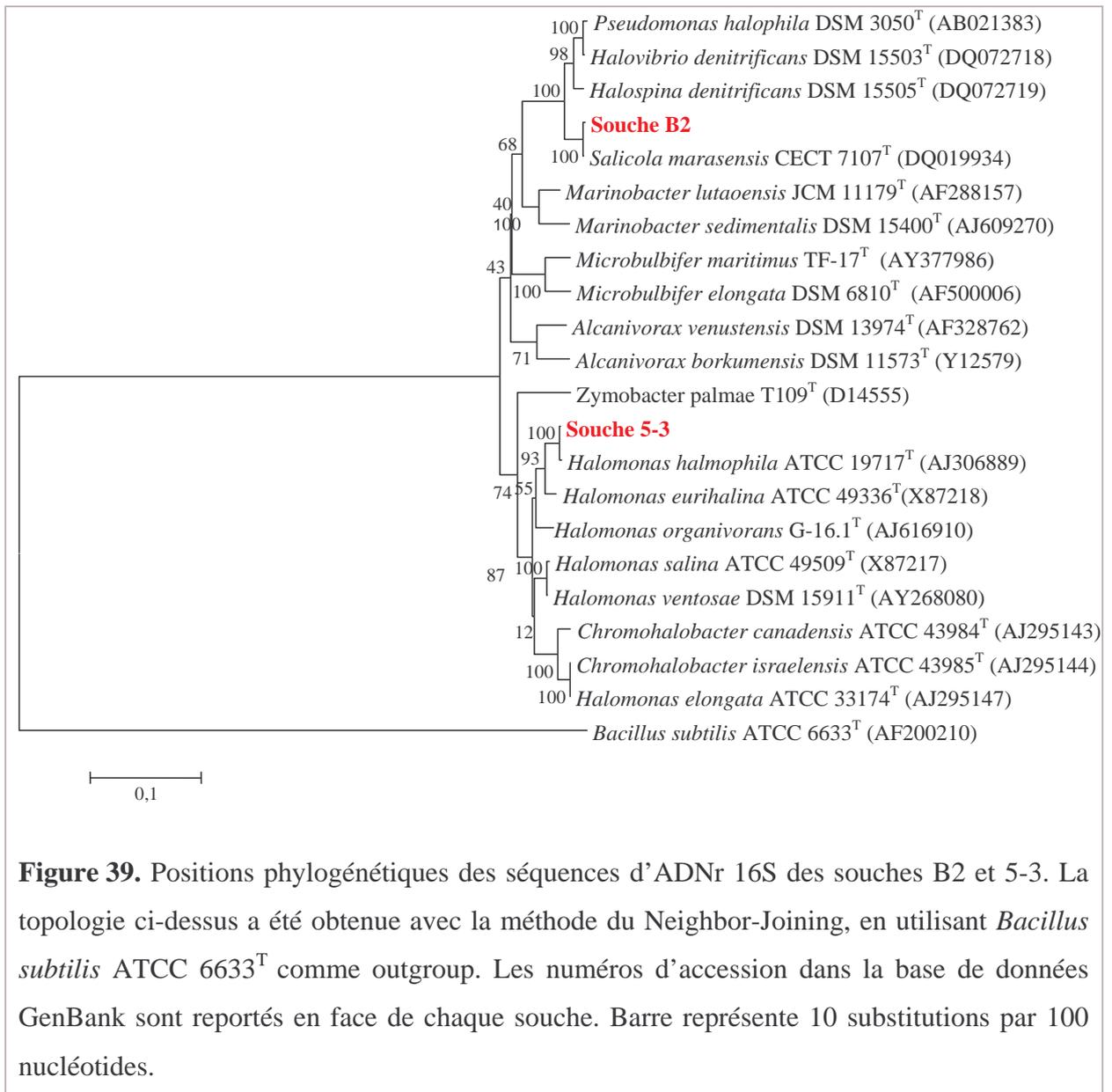
Quant à la souche 5-3, elle est étroitement liée aux membres de la famille des *Halomonadaceae*, 99 % de similitude avec le gène d'ARNr 16S de *Halomonas halmophila* ATCC 19717<sup>T</sup> et 97 % avec celui de *Halomonas eurihalina* ATCC 49336<sup>T</sup> (Tableau 37)

**Tableau 37.** Affiliation phylogénétique des souches bactériennes étudiées.

Groupe taxinomique	Souche	Identité (%) <sup>*</sup>	Espèces proches	Numéro d'accèsion
<i>γ-Proteobacteria</i>	B2	99	<i>Salicola marasensis</i>	DQ19934
		96	<i>Halovibrio denitrificans</i>	DQ072718
		95	<i>Halospina denitrificans</i>	DQ072719
<i>Pseudomonadales</i>				
<i>Pseudomonadaceae</i>				
<i>Pseudomonas</i>		96	<i>Pseudomonas halophila</i>	AB021383
<i>γ-Proteobacteria</i>	5-3			
<i>Oceanospirillales</i>				
<i>Halomonadaceae</i>		99	<i>Halomonas halmophila</i>	AJ306869
<i>Halomonas</i>		97	<i>Halomonas eurihalina</i>	X87218
		97	<i>Halomonas almeriensis</i>	AY858696
	96	<i>Halomonas elongata</i>	M93355	
	95	<i>Halomonas ventosae</i>	A4268080	

<sup>\*</sup>, Résultats de BLAST.

Les séquences du gène de l'ARNr 16S de la souche B2 et 5-3 ont été alignées avec les espèces proches des  $\gamma$ -*Proteobacteria* extraites de la base de données par le logiciel CLUSTAL W 1.8 (Thompson *et al.*, 1994). L'arbre phylogénétique a été construit comme précédemment en utilisant le programme Mega 3 (Kumar *et al.*, 2004). L'enracinement a été réalisé en utilisant la séquence ribosomale de *Bacillus subtilis* ATCC 6633<sup>T</sup> (Figure 39).



**Figure 39.** Positions phylogénétiques des séquences d'ADNr 16S des souches B2 et 5-3. La topologie ci-dessus a été obtenue avec la méthode du Neighbor-Joining, en utilisant *Bacillus subtilis* ATCC 6633<sup>T</sup> comme outgroup. Les numéros d'accèsion dans la base de données GenBank sont reportés en face de chaque souche. Barre représente 10 substitutions par 100 nucléotides.

**Tableau 38.** Matrice de distances génétiques bactériennes calculées selon Tamura-Nei du programme Mega 3.

S	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1											
2	0,0248										
3	0,0407	0,0389									
4	0,0025	0,0240	0,0434								
5	0,0398	0,0318	0,0292	0,0425							
6	0,1365	0,1324	0,1324	0,1374	0,1333						
7	0,1218	0,1227	0,1051	0,1247	0,1129	0,1295					
8	0,0887	0,0925	0,0740	0,0916	0,0802	0,1433	0,1219				
9	0,1227	0,1238	0,1002	0,1257	0,1100	0,1257	0,0451	0,1139			
10	0,1355	0,1314	0,1283	0,1364	0,1333	0,0051	0,1265	0,1443	0,1236		
11	0,1323	0,1304	0,1202	0,1332	0,1313	0,0222	0,1235	0,1433	0,1196	0,0170	
12	0,1124	0,1104	0,0946	0,1154	0,0947	0,0878	0,0904	0,1051	0,0791	0,0849	0,0848
13	0,1160	0,1090	0,1022	0,1169	0,1138	0,1098	0,1002	0,1257	0,1060	0,1079	0,1129
14	0,1179	0,1140	0,0972	0,1209	0,1011	0,0955	0,1077	0,1170	0,0963	0,0918	0,0877
15	0,1343	0,1293	0,1211	0,1352	0,1302	0,0328	0,1275	0,1483	0,1236	0,0328	0,0398
16	0,1300	0,1209	0,1101	0,1309	0,1209	0,1039	0,1041	0,1298	0,1121	0,1030	0,1059
17	0,0381	0,0371	0,0025	0,0407	0,0275	0,1334	0,1052	0,0736	0,0993	0,1293	0,1212
18	0,0579	0,0524	0,0469	0,0570	0,0597	0,1281	0,1219	0,0934	0,1208	0,1240	0,1230
19	0,0580	0,0543	0,0451	0,0571	0,0579	0,1312	0,1129	0,0839	0,1089	0,1292	0,1240
20	0,0580	0,0543	0,0451	0,0571	0,0590	0,1312	0,1129	0,0839	0,1089	0,1292	0,1240
21	0,9877	0,9798	1,0019	0,9847	0,9847	1,0194	1,0037	1,0098	1,0449	1,0141	1,0342
22	0,1333	0,1283	0,1191	0,1342	0,1292	0,0319	0,1265	0,1451	0,1227	0,0319	0,0390

S, souche; 1, Souche 5-3 ; 2, *Halomonas eurihalina* ATCC 49336<sup>T</sup> ; 3, *Halomonas salina* ATCC 49509<sup>T</sup> ; 4, *Halomonas halmophila* ATCC 19717<sup>T</sup> ; 5, *Halomonas organivorans* G-16.1<sup>T</sup> ; 6, *Pseudomonas halophila* DSM 3050<sup>T</sup> ; 7, *Microbulbifer maritimus* TF-17<sup>T</sup> ; 8, *Zymobacter palmae* T109T ; 9, *Microbulbifer elongata* DSM 6810T ; 10, *Halovibrio denitrificans* DSM 15503T ; 11, *Halospina denitrificans* DSM 155507<sup>T</sup>.

**Tableau 38.** Matrice de distances génétiques bactérienne calculée selon Tamura-Nei du programme Mega 3 (suite).

S	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
12										
13	0,1120									
14	0,0461	0,1173								
15	0,1976	0,1040	0,1033							
16	0,1059	0,0562	0,1112	0,1101						
17	0,0937	0,1013	0,0972	0,1222	0,1091					
18	0,1132	0,1110	0,1208	0,1189	0,1279	0,0442				
19	0,1104	0,1131	0,1210	0,1260	0,1199	0,0424	0,0223			
20	0,1104	0,1131	0,1210	0,1260	0,1199	0,0424	0,0223	0,0000		
21	1,0141	1,0152	1,0393	1,0216	0,9684	0,9958	1,0110	1,0334	1,0334	
22	0,1021	0,1021	0,1024	0,0025	1,0216	0,9684	0,9958	1,0110	1,0334	1,0334

12, *Marinobacter lutaoensis* JCM 11179<sup>T</sup> ; 13, *Alcanivorax venustensis* 13974<sup>T</sup> ; 14, *Marinobacter sedimentalis* DSM 15400<sup>T</sup> ; 15, souche B2 ; 16, *Alcanivorax borkumensis* DSM 11573<sup>T</sup> ; 17, *Halomonas ventosae* DSM 15911<sup>T</sup> ; 18, *Chromohalobacter canadensis* ATCC 43984<sup>T</sup> ; 19, *Chromohalobacter israelensis* ATCC 43985<sup>T</sup> ; 20, *Halomonas elongata* ATCC 33174<sup>T</sup> ; 21, *Bacillus subtilis* ATCC 6633<sup>T</sup> ; 22, *Salicola marasensis* CECT 7107<sup>T</sup>.

Les résultats de l'analyse par «bootstrap» permettent de vérifier la constance de la répartition des souches à l'intérieur d'un même groupement. Une valeur de «bootstrap» de 100 est trouvée entre la séquence de B2 et celle de *Salicola marasensis* CECT 7107<sup>T</sup>. Il en est de même de la souche 5-3 avec la souche *Halomonas halmophila* ATCC 19717<sup>T</sup>. Cette valeur indique que 100 % des répétitions ont fourni une répartition identique à l'intérieur d'un clade.

Le Tableau 38 représente les distances de Tamura-Nei, prenant en compte les transitions et les transversions, calculées à partir des séquences d'ADNr 16S. Les distances sont comprises entre 0,0025 et 1,0449. la distance minimale (0,0025) est trouvée pour la comparaison de la séquence B2 à celle de *Salicola marasensis* CECT 7107<sup>T</sup> et la séquence de la souche 5-3 à celle de *Halomonas halmophila* ATCC 19717<sup>T</sup>. C'est un résultat attendu vu le pourcentage de similitude élevé observé entre les séquences de la petite sous unité ribosomale. La séquence de *Bacillus subtilis* ATCC 6633<sup>T</sup> est celle présentant les distances les plus élevées par rapport aux autres séquences.

En outre, la même distance a été obtenue entre deux souches décrites comme des espèces différentes, *Halomonas salina* ATCC 49509<sup>T</sup> et *Halomonas ventosae* DSM 15911<sup>T</sup> (Tableau 38). Mais cette étroite parenté ne peut confirmer l'inclusion de ces souches dans les espèces déjà décrites. Il est connu que des espèces peuvent avoir des séquences des ARNr 16S très proches et être différentes par hybridation ADN-ADN (Dijkshoorn *et al.*, 2000). Il serait donc nécessaire d'effectuer une étude d'homologie ADN-ADN afin d'établir la position taxinomique exacte de ces souches.

**Tableau 39.** Taux d'hybridation ADN-ADN de la souche B2 et espèces proches.

Souches	Absorbance	ADN (pg)	S = s × 5 D = d × 2	S + D	BR (%)	RBR (%)
B2 1s	0,545	177	885	1989	55,50	
B2 1d	0,620	552	1104			
B2 2s	0,537	137	685	2029	<b>66,24</b>	<b>100</b>
B2 2d	0,644	672	1344			
1 1s	0,635	627	3135	3549	<b>11,66</b>	<b>17,60</b>
1 1d	0,551	206	414			
1 2s	0,686	882	4410	4734	6,84	10,32
1 2d	0,542	162	324			
2 1s	0,570	302	1510	2304	<b>34,52</b>	<b>52,11</b>
2 1d	0,589	397	794			
2 2s	0,558	242	1210	1614	25,03	37,78
2 2d	0,550	202	404			
3 1s	0,605	477	2385	3039	<b>25,03</b>	<b>32,48</b>
3 1d	0,575	327	654			
3 2s	0,561	257	1285	1619	20,63	31,14
3 2d	0,543	167	334			
4 1s	0,619	547	2735	3359	13,42	20,25
4 1d	0,552	212	424			
4 2s	0,637	637	3185	3739	<b>14,81</b>	<b>22,35</b>
4 2d	0,565	277	554			

1, *Pseudomonas halophila* DSM 3050<sup>T</sup>; 2, *Salicola marasensis* CECT 7107<sup>T</sup>; 3, *Halovibrio denitrificans* DSM 15503<sup>T</sup>; 4, *Halospina denitrificans* DSM 15505<sup>T</sup>. s, simple brin ; d, double brin.

BR % = (D/ S + D) × 100 et RBR % = valeur × 100/BR %.

### 4. 3. Hybridation ADN-ADN de la souche B2

La souche B2 est phylogénétiquement plus liée à *Salicola marasensis* CECT 7107<sup>T</sup> (Tableau 37). Afin de connaître sa position taxinomique, l'ADN extrait a été doublement marqué par la digoxigénine et la biotine puis des études d'homologies ADN-ADN ont été effectuées avec les quatre espèces proches, *Salicola marasensis* CECT 7107<sup>T</sup>, *Pseudomonas halophila* DSM 3050<sup>T</sup>, *Halovibrio denitrificans* DSM 15503<sup>T</sup> et *Halospina denitrificans* DSM 15505<sup>T</sup>.

La figure 40 (Annexe 10) montre une courbe étalon classiquement réalisée. D'après cette courbe,  $Y = 0,0002 x + 0,5096$  où Y représente la D.O. et x la concentration d'ADN.

D'après les résultats d'homologie ADN-ADN (Tableau 39), les taux d'hybridations obtenus avec la sonde sont inférieurs à 70 % et sont compris entre 17,6 et 52,11 %. La plus grande valeur a été notée avec la souche type de *Salicola marasensis* CECT 7107<sup>T</sup>. En effet, les deux séquences sont similaires à 99 % et la distance calculée selon Tamura-Nei est également faible. Mais selon Stackebrandt et Liesak (1993), le degré de similitude des ADNr ne peut être utilisé pour détecter de légères différences entre deux espèces très voisines, car les ribosomes sont des structures cellulaires hautement conservées. Mais un environnement comme les lacs hypersalés possédant des conditions physico-chimiques très variables peut amener une évolution rapide des voies métaboliques sans toutefois modifier celle des macromolécules plus stables. Les bactéries qui s'y trouvent doivent donc posséder un métabolisme très variable dans le temps. Ces facteurs environnementaux peuvent mener à des adaptations particulières et à des changements au niveau de certains gènes spécialisés tout en conservant l'ADN ribosomal. Les principales différences entre la souche B2 et *Salicola marasensis* CECT 7107<sup>T</sup> se manifestent essentiellement par des différences dans la distribution des acides gras membranaires, la physiologie et un taux d'hybridation ADN-ADN de 52,11 % justifiant à lui seul la création d'une nouvelle espèce. Le nom de *Salicola salis* a été attribué à cette souche.

**Tableau 40.** Caractéristiques de la souche B2<sup>T</sup> et des bactéries hétérotrophes halophiles extrêmes proches.

Propriétés	Souche B2 <sup>T</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	4 <sup>b</sup>
Morphologie cellulaire	bâtonnet	bâtonnet	Spirille court	bâtonnet long	bâtonnet incurvé
Flagellation	polaire	polaire	polaire	absence	polaire
Catalase	+	+	nd	nd	nd
Oxydase	+	+	nd	nd	+
Gamme de NaCl (M)	1,7-4,3	1,7-5,2	2,0-5,0	2,0-5,0	1,5-4,5
Optimum (M)	2,5-3,5	2,5	2,0-2,5	2,5-3,0	nd
Temp optimale (°C)	37	35	nd	nd	nd
Intervalle de pH	6,0-9,0	6,0-8,0	6,7-8,5	6,7-8,5	6,7-8,5
Hydrolyse de:					
Gélatine	+	+	nd	nd	-
Amidon	+	-	nd	nd	-
Esculine	-	+	nd	nd	+
Tween 80	+	nd	nd	nd	nd
Croissance sur :					
Sucres	-	+	-	-	-
Acétate	+	+	+	+	+
Citrate	-	+	-	-	-
Pyruvate	-	+	-	+	-
Succinate	-	+	+	+	-
Réduction du nitrate	faible	-	+	+	+
Contenu G+C (mol %)	56,0 (T <sub>m</sub> )	61,6-61,9 (T <sub>m</sub> )	61,7 (T <sub>m</sub> )	60,1 (T <sub>m</sub> )	61,6 (T <sub>m</sub> )

1, *Salicola marasensis* CECT 7107<sup>T</sup> ; 2, *Halovibrio denitrificans* DSM 15503<sup>T</sup> ; 3, *Halospina denitrificans* DSM 15505<sup>T</sup> ; 4, *Pseudomonas halophila* DSM 3050<sup>T</sup>. <sup>a</sup>, données sont obtenues de Maturrano *et al.* (2006b) et <sup>b</sup>, données sont obtenues de Sorokin *et al.* (2006).

nd, non déterminé ; +, réaction positive ; -, réaction négative.

Une comparaison des principaux caractères de cette nouvelle espèce avec les espèces bactériennes halophiles extrêmes proches connues est représentée dans le tableau 40.

✓ **Description de *Salicola salis* sp. nov.**

*Salicola salis* (L. gen. n. salis (poet.), pour eau salée).

La souche B2<sup>T</sup> forme des colonies crème, circulaires, convexes et entières. Les cellules de la souche sont des bâtonnets à Gram négatif et mesurant 0,4-0,6 µm × 0,9- 2,4 µm. Elles sont mobiles grâce à la présence de plusieurs flagelles polaires. Elle possède une oxydase et une catalase. La souche B2 croît sur milieu de culture à croissance finale en NaCl variant de 10 à 25 % (p/v) (1,7-4,3 M) et dont l'optimum se situe entre 15 et 20 % (p/v) (2,5-3,5 M). Le pH optimum de croissance se situe entre pH 7,0 et 7,5, et la croissance est possible de pH 6,0 à pH 9,0. La température optimale est de 37°C et l'intervalle de croissance va de 30 à 45°C. Elle hydrolyse le Tween 80 et ne produit pas d'indole. Le nitrate est faiblement réduit en anaérobiose en nitrite sans production de gaz. Les sucres et les acides aminés ne sont pas utilisés par la souche B2 comme seule source de carbone, d'énergie et/ou d'azote. L'acétate est assimilé. Elle hydrolyse l'amidon et la gélatine mais non l'esculine.

Les cellules sont résistantes à la kanamycine, à la bacitracine, à l'anisomycine, à la néomycine et à l'ampicilline mais sensible au chloramphénicol et à la pénicilline G.

La composition des acides gras membranaires est caractérisée par la présence de C<sub>10:0</sub>, C<sub>12:0</sub>, C<sub>12:0</sub> 3-OH, C<sub>16:1</sub> iso et/ou C<sub>14:1</sub> 3-OH, C<sub>16:0</sub> N alcool, C<sub>16:1</sub>ω9c, C<sub>16:0</sub>, C<sub>18:3</sub>ω6c, C<sub>18:0</sub>, C<sub>18:0</sub>Me10 et d'autres acides gras présents en faibles proportions. Le contenu en G+C de l'ADN génomique est de 56,0 mol % (T<sub>m</sub>).

La souche type est B2<sup>T</sup> (= CECT 7106<sup>T</sup>= LMG 23122<sup>T</sup>), isolée de la sebkhah Ezzemoul en Algérie. Le nombre d'accès de la séquence du gène d'ARNr 16S dans Genbank de la souche B2<sup>T</sup> est DQ129689.

L'analyse de la diversité des communautés microbiennes d'environnements extrêmes peut présenter un intérêt économique et aussi une valeur fondamentale. De telles études contribuent d'une part à un inventaire des espèces vivantes tel que cela a été proposé par Pace (1997), et d'autre part à mieux définir quelles pourraient être les frontières géographiques et physico-chimiques du vivant. Elles permettent aussi la recherche de potentialités biotechnologiques chez ces microorganismes. On peut voir une valeur pécuniaire au travers des processus métaboliques que l'on peut détecter, cloner et exprimer à une échelle industrielle.

Les conditions extrêmes de salinité font de la sebkha Ezzemoul située à Ain M'Lila un modèle intéressant pour l'étude de la diversité microbienne. L'objectif principal de ce travail était l'analyse de la diversité microbienne des échantillons de saumures prélevés sur cette sebkha par une approche culturale et moléculaire. Pour remplir cet objectif, il convenait dans un premier temps de procéder à l'isolement de la microflore sur plusieurs milieux spécifiques pour les halophiles. Quarante souches ont été isolées et purifiées. Pour les identifier, nous avons donc dû nous baser sur le principe de la taxinomie polyphasique qui intègre des informations de nature phénotypique, génotypique et phylogénétique puisque aucune de ces souches n'aurait pu être identifiée correctement par l'utilisation d'un seul de ces outils.

Ces approches ont permis d'accéder à une diversité phylogénétique incluant des espèces archéennes et bactériennes et de mettre en évidence une nette prédominance du domaine Archaea. Ces résultats suggèrent donc une forte représentativité des archaea halophiles extrêmes dans la sebkha, qui corroborent avec tous les travaux déjà réalisés (Antón *et al.*, 1999, 2000 ; Benlloch *et al.*, 2001, 2002 ; Grant, 2004 ; Oren, 2002b). En effet, elles sont considérées comme les organismes les plus halophiles connus sur Terre. Elles représentent l'essentiel des formes vivantes de ces environnements, principalement lorsque la salinité dépasse 25 % (p/v) (Oren, 1990 ; Benlloch *et al.*, 1995 ; Ochsenreiter *et al.*, 2002 ; Caton *et al.*, 2004). La plupart d'entre elles contiennent des pigments qui donnent à l'eau une couleur rose, orangé ou pourpre caractéristique (Oren, 2002c). Cette capacité de survie requiert de la cellule entière (les membranes, les ribosomes, les protéines, etc.) une adaptation tout à fait spéciale. D'autre part cet environnement permet à l'haloarchaea un mode de vie à l'abri des pressions compétitives car peu de microorganismes supportent ces conditions.

L'étude de la physiologie et de la biochimie n'a pas permis une réelle distinction entre les

souches archéennes, vu que la plupart des substrats tests ne sont pas utilisés comme source unique de carbone, d'énergie et/ou d'azote. Par ailleurs, elles sont toutes aérobies strictes, mis à part quelques souches qui possèdent en plus la capacité de réduire les nitrates en anaérobiose et/ou de fermenter l'arginine. Cette dernière propriété est propre au genre *Halobacterium*. Nous reconnaissons que l'analyse des lipides polaires membranaire par chromatographie sur couche mince, au niveau de la classification en genres, est la méthode la plus simple, la plus rapide qui a permis de regrouper les isolats archéens dans les genres *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Halobaculum*, *Halococcus*, *Haloferax*, *Halorubrum* et *Haloterrigena*, membres de la famille des *Halobacteriaceae*. Par ailleurs, une majorité des souches isolées est retrouvée dans le genre *Halorubrum*. Quand au séquençage de l'ADNr 16S a donné un élan supplémentaire dans la taxinomie et a permis d'établir des relations de parenté entre nos séquences et celles de la base de données Genbank.

Cette étude a permis également la description de deux souches bactériennes halophiles, aérobies et affiliées aux groupes des *Gamma-Proteobacteria*. La première est apparentée aux espèces halophiles extrêmes alors que la seconde est intimement liée aux espèces halophiles modérées de la famille des *Halomonadaceae*.

Au sein de la collection de microorganismes, archées et bactéries halophiles qui a été constituée, certaines souches se sont révélées taxinomiquement intéressantes. Des études d'homologies ADN-ADN ont donc été entreprises afin de déterminer leur position exact car ce test permet de classifier les souches sans aucune ambiguïté. Sur la base des résultats obtenus, deux nouvelles espèces appartenant à l'ordre archéens des *Halobacteriales* et à l'ordre bactérien des *Oceanospirillales* ont été ainsi décrites.

- ✓ La première nommée *Halorubrum ezzemoulense* (sp. nov.), a fait l'objet d'une caractérisation (Kharroub *et al.*, 2006).
- ✓ La seconde espèce décrite appartenant aux *Gamma-Proteobacteria* appelée *Salicola salis* (sp. nov.) (Kharroub *et al.*, 2006).

Ces deux procaryotes sont des hétérotrophes halophiles extrêmes. Outre l'intérêt lié à leur position taxinomique nouvelle, *Halorubrum ezzemoulense* produit un exopolymère. Aussi, *Salicola salis* est la première bactérie halophile extrême isolée dans le continent africain.

Par ailleurs, l'ADN de la souche S1 a montré un niveau d'homologie faible avec ceux des souches de références proches du genre *Haloarcula*. Ce test a lui seul justifie la classification de cette souche dans une nouvelle espèce. D'autre part, le séquençage de la petite sous unité ribosomal a été déterminant dans la classification de la souche S3 car elle aurait pu être incluse dans le genre *Haloferax* sur la base de l'analyse des lipides polaires membranaires. De même, le résultat d'hybridation ADN-ADN permettait d'affirmer sa parenté avec l'haloarchaea non décrite *Haloalcaliplilum atacamensis*.

Suite à cette étude, il apparaît clairement que les méthodes culturales et moléculaires sont parfaitement complémentaires et nécessaires à l'étude de la diversité microbienne d'un écosystème. Cependant, les contraintes techniques et financières inhérentes font que la plupart des études phylogénétiques soient rares dans notre pays. Mais au vu des résultats acquis au cours de cette étude, il serait particulièrement intéressant de poursuivre l'identification des souches. Aussi, dans la continuation directe de ce travail, l'étude de la microflore de nouvelles sebkhas est envisageable.

La recherche d'intérêt biotechnologique de ces souches ne faisait pas partie des objectifs fixés dans cette étude. Néanmoins, des essais préliminaires de production d'exopolymères par quelques souches ont été effectués. Ces résultats nous incitent, dans le futur, à déterminer la nature chimique de ces polymères.



- Aitken, D. M. & Brown, A. D. (1969).** Citrate and glyoxylate cycles in the halophilic *Halobacterium cutirubrum*. *Biochim Biophys Acta* **177**, 351-354.
- Albers, S.-V., Szabó, Z. & Driessen, A. J. M. (2006).** Protein secretion in the Archaea: multiple paths towards a unique cell surface. *Nat Rev Microbiol* **4**, 537-547.
- Alexander, M. (1997).** Microbial communities and interactions: a prelude. In *Manual of Environmental Microbiology*. Ed. C. I. Hurst. pp. 5-13. ASM Press, Washington.
- Altekar, W. & Rangaswamy, V. (1992).** Degradation of endogenous fructose during catabolism of sucrose and mannitol in halophilic archaeobacterium. *Arch Microbiol* **158**, 356-363.
- Amann, R., Ludwig, W. & Schleifer, H.-H. (1992).** Identification and in situ detection of individual bacterial cells. *FEMS Microbiol Lett* **100**, 45-50.
- Amann, R. J., Ludwig, W. & Schleifer, H.-H. (1996).** Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**, 143-169.
- Amann, R., Glöckner, F.-O. & Neef, A. (1997).** Modern methods in subsurface microbiology: in situ identification of microorganisms with nucleic acid probes. *FEMS Microbiol Rev* **20**, 191-200.
- Amoozegar, M. A., Malekzadeh, F., Malik, K. A., Schumann, P. & Spöer, C. (2003).** *Halobacillus karajensis* sp. nov., a novel moderate halophile. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1059-1063.
- Antón, J., Garcia-Lillo, J. A., Meseguer, I. & Rodriguez-Valera, F. (1989).** Biopolymer production by *Haloferax mediterranei*. *Appl Environ Microbiol* **54**, 2381-2386.
- Antón, J., Liobet-Brossa, E., Rodriguez-Valera, F., Amann, R. (1999).** Fluorescence *in situ* hybridization analysis of the prokaryotic community inhabiting crystallizer ponds. *Microbiol* **1**, 517-523.
- Antón, J., Rosselló-Mora, R., Rodriguez-Valera, F. & Amann, R. (2000).** Extremely Halophilic Bacteria in Crystallizer Ponds from Solar Salterns. *Appl Environ Microbiol* **66**, 3052-3057.
- Antón, J., Oren, A., Benlloch, S. Rodriguez-Valera, F., Amann, R., Rosselló-Mora, R. (2002).** *Salinibacter ruber* gen. nov., sp. nov., a new species of extremely halophilic Bacteria from saltern crystallizer ponds. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 485-491.
- Arahal, D. R., Carmen, M., Márquez, C. M., Volcanii, B. E., Schleifer, K. H. & Ventosa, A. (1999).** *Bacillus marismortui* sp. nov., a new moderately halophilic species from the Dead Sea. *Int J Syst Bacteriol* **49**, 521-530.
- Arahal, D. R., Garcia, M. T., Ludwig, W., Schleifer, K. H. & Ventosa, A. (2001a).** Transfert of *Halomonas canadensis* and *Halomonas israelensis* to the genus *Chromohalobacter* as *Chromohalobacter canadensis* comb. nov. and *Chromohalobacter israelensis* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 1443-1448.
- Arahal, D. R., Garcia, M. T., Vargas, C., Cànovàs, D., Nieto, J. J. & ventosa, A. (2001b).** *Chromohalobacter salexigens* sp. nov., a moderately halophilic species that includes *Halomonas elongata* DSM 3043 and ATCC 33174. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 1457-1462.
- Arahal, D. R., Castillo, A. M., Ludwig, W., Schleifer, K. H. & Ventosa, A. (2002).** Proposal of *Cobetia marina* gen. nov. comb. nov., within the Family *Halomonadaceae*, to include the species *Halomonas marina*. *Syst Appl Microbiol* **25**, 207-211.
- Argandoña, M., Martínez-Checa, F., Llamas, I., Quesada, E. & del Moral, A. (2003).** Megaplasmids in Gram-negative, moderately halophilic bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **227**, 81-86.
- Asker; D. & Ohta, Y. (2002).** *Haloferax alexandrinus* sp. nov., an extremely halophilic canthaxanthin-producing archaeon from a solar saltern in Alexandria (Egypt). *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 729-738.

Atlas, R. M. (1997). Handbook of Microbiological Media. 2<sup>ème</sup> édition, CRC Press Boca Raton, New York-London-Tokyo.

### B

- Bailey, D. G. & Birbir, M. (1993). A study of the extremely halophilic microorganisms found on commercially brine-cured cattle hides. *J of the American Leather Chemists Association* **88**, 285-293.
- Balashov, S. P., Imasheva, E. S., Boichenko, V. A., Antón, J., Wang, J. M. & Lanyi, J. K. (2005). Xanthorhodopsin: A Proton Pump with a Light-Harvesting Carotenoid Antenna. *Science* **309** (5743), 2061-2064;
- Baliga, N. S., Bonneau, R., Facciotti, M. T., Pan, M., Glusman, G., Deutsch, E. W., Shannon, P., Chiu, Y., Weng, R. S., Gan, R. R., Hung, P., Date, S. V., Marcotte, L. H. & Ng W. V. (2004). Genome sequence of *Haloarcula marismortui*: a halophilic archaeon from the Dead Sea. *Genome Research* **14**, 2221-2234.
- Basinger, G. W. & Olivier, J. D. (1979). Inhibition of *Halobacterium cutirubrum* lipid biosynthesis by bacitracin. *J Gen Microbiol* **111**, 423-427.
- Baumann, P., Quershi, S. A. & Jackson, S. P. (1995). Transcription: new insights from studies on Archaea. *Trends Genet* **11**, 279-283.
- Baumeister, W. & Lembcke, G. (1992). Structural features of archaebacterial cell envelopes. *J Bioenerg Biomembr* **24**, 567-575.
- Bayley, S. T. & Kushner, D. J. (1964). The ribosomes of the extremely halophilic bacterium, *Halobacterium cutirubrum*. *J Mol Biol* **9**, 654-669.
- Bayley, H., Huang, K. S., Randhakrishnan, R., Ross, A. H., Takagasi, Y. & Khorana, H. G. (1981). Site of attachment of retinal in bacteriorhodopsin. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**, 2225-2229.
- Benlloch, S., Martinez-Murcia, A. J. & Rodriguez-Valera, F. (1995). Sequencing of Bacterial and Archaeal 16S rRNA Genes Directly Amplified from a Hypersaline Environment. *Syst Appl Microbiol* **18**, 574-581.
- Benlloch, S., Acina, S. G., Martinez-Murcia, A. J. & Rodriguez-Valera, F. (1996). Description of prokaryotic biodiversity along the salinity gradient of a multipond saltern by direct PCR amplification of 16S rDNA. *Hydrobiologia* **329**, 19-31.
- Benlloch, S., Acinas, S. G., Antón, J., Lopez-Lopez, A., Luz, S. P. & Rodriguez-Valera, F. (2001). Archaeal biodiversity in crystallizer ponds from a solar saltern: culture versus PCR. *Microbial Ecol* **41**, 12-19.
- Benlloch, S., Lopez-Lopez, A., Casamayor, E. O., Øvreas, L., Goddard, V., Daas, F. L., Smerdon, G., Massana, R., Joint, I., Thingstad, F., Pedro-Aliø, C. & Rodriguez-Valera, F. (2002). Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern. *Environ Microbiol* **4**, 349-360.
- Benson, D. A., Boguski, M. S., Lipman, D. J., Ostell, J., Ouellette, . F., Rapp, B. A. & Wheeler, D. L. (1999). GenBank. *Nucleic acids Res* **27**, 12-17.
- Berendes, F., Gottschalk, G., Helne-Dobbernack, E., Moore, E. R. B. & Tindall, B. J. (1996). *Halomonas desiderata* sp. nov., a new alkaliphilic halotolerant and denitrifying bacterium isolated from a municipal sewage works. *Syst Appl Microbiol* **19**, 158-167.
- Bertrand, J. C. & Larsen, H. (1989). La bactérie marine: mythe ou réalité. In *Microorganismes dans les écosystèmes océaniques*. Eds. M. Bianchi, D. Marty, J. C. Bertrand, P. Caumette et M. Gaunthier. pp. 3-26. Massons, Paris.
- Beyth, M. (1980). Recent evolution and present stage of Dead Sea brines. In *Hypersaline Brines and Evaporitic Environments*. Ed. A. Nissenbaum. pp. 155-165. Elsevier Amsterdam, The Netherlands.

- Birbir, M. & Sesal, C. (2003).** Extremely Halophilic Bacterial Communities in Şereflikoçhisar Salt Lake in Turkey. *Turk J Biol* **27**, 7-22.
- Birbir, M., Ogan, A., Calli, B. & Mertoglu, B. (2004).** Enzyme characteristics of extremely halophilic archaeal community in Turkey Salt Mine, Turkey. *World J Microbiol Biotechnol* **20**, 613-621.
- Blatt, H., Middleton, G. & Murray, R. (1980).** Evaporites and native sulphur. In *Origin of Sedimentary Rocks*. Ed. H. Blatt, G. Middleton & R. Murray. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- Blaurock, A. E. & Stoeckenius, W. (1971).** Structure of the purple membrane. *Nat New Biol* **233**, 152-155.
- Bogomolni, R. A. & Spudis, J. L. (1982).** Identification of a third rhodopsin-like pigment in phototactic *Halobacterium halobium*. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**, 6250-6254.
- Bolhuis, H., te Poele, E. M. & Rodriguez-Valera, F. (2004).** Isolation and cultivation of Walsby's square archaeon. *Environ Microbiol* **6**, 1287-1291.
- Bolhuis, H., Palm, P., Wende, A., Falb, M., Rampp, M., Rodriguez-Valera F., Pfeifer, F. & Oesterhelt, D. (2006).** The genome of the square archaeon *Haloquadratum walsbyi*: life at the limits of water activity. *BMC Genomics* **7**, 169-176.
- Bonelo, G., Ventosa, A., Megias, M. & Ruiz-Berraquero, F. (1984).** The sensitivity of halobacteria to antibiotics. *FEMS Microbiol Lett* **21**, 341-345.
- Bouchotroch, S., Quesada, J., Izquierdo, I. & Rodriguez-Valera, F. (2000).** Bacterial exopolysaccharides produced by newly discovered bacteria belonging to the genus *Halomonas*, isolated from hypersaline habitat in Morocco. *J Ind Microbiol Biotechnol* **24**, 374-378.
- Bouchotroch, S., Quesada, J., del Moral, A., Llamas, I., & Béjar, V. (2001).** *Halomonas maura* sp. nov., a novel moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 1625-1632.
- Brandt, K. K. & Ingvorsen, K. (1997).** *Desulfobacter halotolerans* sp. nov., a halotolerant acetate-oxidizing sulfate-reducing bacterium isolated from sediments of Great Salt Lake, Utah. *Syst Appl Microbiol* **20**, 366-373.
- Bräsen, C. & Schrönheit, P. (2001).** Mechanisms of acetate formation and acetate activation in halophilic archaea. *Arch Microbiol* **175**, 360-368.
- Brisou, J. (1980).** Les bactéries marines. Collection de Biologie des milieux marins. p. 209.
- Brock, T. D., Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Paker, J. (1994).** *Biology of Microorganisms*, 7<sup>ème</sup> edition. p. 986. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, USA.
- Brown, H. D. & Chao, K. J. (1970).** The walls of extremely halophilic cocci. Gram positive bacteria lacking muramic acid. *J Gen Microbiol* **62**, 267-274.
- Brown, A. D. (1976).** Microbial water stress. *Bacteriol Rev* **30**, 803-846.
- Brown-Peterson, N. J. & Salin, M. L. (1994).** Salt stress in a halophilic bacterium: alterations in oxidative metabolism and oxy-intermediate scavenging systems. *Can J Microbiol* **40**, 1057-1063.
- Brown, T. A. (2002).** Génomes. Médecine-Sciences-Falmmarion. p. 483.
- Buchalo, A. S., Nevo, E., Wasser, S. P., Oren, A. & Molitoris, H. P. (1998).** Fungal life in the extremely hypersaline water of the Dead Sea: first records. *FEMS Microbiol Ecol* **265**, 1461-1465.
- Burns, D. G., Camakaris, H. M., Janssen, P. H. & Dyal-Smith, M. L. (2004a).** Cultivation of Walsby's square haloarchaeon. *FEMS Microbiol* **238**, 469-473.
- Burns, D. G., Camakaris, H. M., Janssen, P. H. & Dyal-Smith, M. L. (2004b).** Combined Use of Cultivation-Dependent and Cultivation-Independent Methods Indicates that Members of Most Haloarchaeal Groups in an Australian Crystallizer Pond Are Cultivable. *Appl Environ Microbiol* **70**, 5258-5265.

## C

- Cann, I. K., Komori, K., Tob, H., Kanai, S. & Ishino, Y. (1998).** A heterodimeric DNA polymerase: evidence that members of Euryarchaeota possess a distinct DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* **5**, 14250-14255.
- Cánovas, D., Vragas, C., Iglesias-Guerra, I., Csonka, D., Rhodes, A., Ventosa, A. & Nieto, J. J. (1997).** Isolation and characterization of salt-sensitive mutants of the moderate halophile *Halomonas elongata* and cloning of the ectoine synthesis genes. *J Biol Chem* **272**, 25794-25801.
- Casamayor, E. O., Massana, R., Benlloch, S., Øvreàs, L., Diez, B., Goddard, V. J., Gasol, J. M., Joint, T., Rodríguez-Valera, F. & Pedrós-Alió, C. (2002).** Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by multipond solar saltern. *Environ Microbiol* **4**, 338-348.
- Castanier, S., Perthuisot, J.-P., Marat, M. & Morvan, J.-Y. (1999).** The salt ooids of Berre salt works (Bouches du Rhône, France): the role of bacteria in salt crystallisation. *Sed Geol* **125**, 343-359.
- Castillo, A. M., Gutiérrez, M. C., Kamekura, M., Ma, Y., Cowan, D. A., Jones, B. E., Grant, W. D. & Ventosa, A. (2006a).** *Halovivax asiaticus* gen. nov., sp. nov., a novel extremely halophilic archaeon isolated from Inner Mongolia, China. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 765-770.
- Castillo, A. M., Gutiérrez, M. C., Kamekura, Xue, Y., Ma, Y., Cowan, D. A., Jones, B. A., Grant, W. D. & Ventosa, A. (2006b).** *Halostagnicola larsenii* gen. nov., an extremely halophilic archaeon from a saline lake in Inner Mongolia, China. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 1519-1524.
- Caton, T. M., Witte, L. R., Ngyuen, H. D., Buchheil, J. A. Buchheim, M. A. & Chneegurt, M. A. (2004).** Halotolerant Aerobic Heterotrophic Bacteria from the Great salt Plains of Oklahoma. *Microbial Ecology* **48**, 449-462.
- Caumette, P., Matheron, R., Raymond, N. Relaxans, J. C. (1994).** Microbial mats in the hypersaline ponds of Mediterranean salterns (Salins-de-Guiraud, France). *FEMS Microbiol Ecol* **13**, 273-286.
- Caumette, P. (1998).** Les bactéries halophiles: la vie dans les conditions extrêmes de salinité. *C R Acad Agric Fr* **84**, 11-21.
- Cavicchioli, R., Curmi, P. M. G., Saunders, N. & Thomas, T. (2003).** Pathogenic archaea: do they exist. *BioEssays* **25**, 1159-1128.
- Chaddock, A. M., Mant, A., Kamauchov, L., Brink, S., Hermann, R. G., Klosgen, R. B. & Robinson, C. (1995).** A new type of signal peptide: central role of a twin-arginine motif in transfer signals for the delta pH-dependent thylakoidal protein translocase. *EMBO J* **14**, 2715-2722.
- Choquet, C. G., Patel, G. B., Choquet, C. G., Ekiel, I. & Sprott, G. D. (1999).** Formation of stable liposomes from lipid extracts of archaeobacteria. *Patent US5989587* **11**, 23-32.
- Christian, J. H. B. & Waltho, J. A. (1962).** Solute concentrations within cells of halophilic and non-halophilic bacteria. *Biochem Biophys Res Communication* **124**, 423-429.
- Cobet, A. B., Wirsén, C. J. & Jones, G. E. (1970).** The effect of nickel on a marine bacterium, *Arthobacter marinus* sp. nov. *J Gen Microbiol* **62**, 159-169.
- Coenye, T., Gevers, D., Van de Peer, Y., Vandamme, P. & Swings, J. (2005).** Towards a prokaryotic genomic taxonomy. *FEMS Microbiol* **20**, 147-167.
- Collins, M. D., Ross, H. N. M., Tindall, B. J. & Grant, W. D; (1981).** Distribution of isoprenoid quinones in halophilic bacteria. *J Appl Bacteriol* **50**, 559-565.
- Colwell, R. R. (1970).** Polyohasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. *J Bacteriol* **104**, 410-433.

- Colwell, R. R., Litchfield, C. D., Vreeland, R. H., Kiefer, L. A. & Gibbons, N. E. (1979).** Taxonomic Studies of Red Halophilic Bacteria. *Int J Syst Bacteriol* **29**, 379-399.
- Courtenay, E. S., Capp, M. W., Anderson, C. F. & Record M. T. (2000).** Vapor pressure osmometry studies of osmolyte-protein interactions: implications for the action of osmoprotectants *in vivo* and for the interpretation of osmotic stress experiment *in vitro*. *Biochemistry* **39**, 4456-4471.
- Cui, H.-L., Tohty, D., Zhou, P.-J. & Liu, S.-J. (2006).** *Halorubrum lipolyticum* sp. nov. and *Halorubrum aidingense* sp. nov., isolated from two salt lakes in Xin-Jiang, China. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 1631-1634.
- D**
- Daiyasu, H., Kuma, K.-I., Yokoi, T., Morii, H., Koga, Y. & Toh, H. (2005).** A study of archaeal enzymes involved in polar lipid synthesis linking amino acid sequence information, genomic contexts and lipid composition. *Archaea* **1**, 399-410.
- Danon, A. & Stoekenius, W. (1974).** Phosphorylation in *Halobacterium halobium*. *Proc Natl Acad Sci USA* **71**, 1234-1238.
- Danon, A. & Caplan, S. R. (1979).** CO<sub>2</sub> fixation by *Halobacterium halobium*. *FEBS Letters* **74**, 255-258.
- DasSarma, S. & Arora, P. (1997).** Genetic analysis of the gas vesicle gene cluster in haloarchaea. *FEMS Microbiol Lett* **153**, 1-10.
- DasSarma, S. (2001).** Halophiles. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-9.
- DeLong, E. F., Wickham, G. S. & Pace, N. R. (1989).** Phylogenetic Strains: Ribosomal RNA-Based Probes for the Identification of Single Cells. *Sciences* **243**, 1360-1363.
- DeLong, E. F. (1992).** Archaea in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 5685-5689.
- Demergasso, C., Casamayor, E. O., Chong, G., Galleguillos, P., Escudero, L. & Pedro-Alió, C. (2004).** Distribution of prokaryotic genetic diversity in athalassohaline lakes of the Atacama Desert, Northern Chile. *FEMS Microbiol Ecol* **48**, 57-69.
- Denner, E. B. M., McGenity, T. J., Busse, H.-J., Grant, W. D., Wanner, G. & Stan-Lotter, H. (1994).** *Halococcus salifodinae* sp. nov., an archaeal isolate from an Australian salt mine. *Int J Syst Bacteriol* **44**, 774-780.
- Dennis, P. P. & Shimmin, L. C. (1997).** Evolutionary divergence and salinity-mediated selection in halophilic Archaea. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 90-104.
- Dennis, P. P., Ziesche, S. & Mylvaganam, S. (1998).** Transcription Analysis of Two Disparate rRNA Operons in the Halophilic Archaeon *Haloarcula marismortui*. *J Bacteriol* **180**, 4804-4813.
- De Rosa, M., Gambacorta, A., Nicolaus, B. & Grant, W. D. (1983).** A C<sub>25</sub>, C<sub>25</sub> diether core lipid from archaeobacterial haloalkaliphiles. *J Gen Microbiol* **129**, 2333-2337.
- Desmarais, D., Jablonski, P. E., Fedarko, N. S. & Roberts, M. F. (1997).** 2-Sulfotrehalose, a novel osmolyte in haloalkaliphilic archaea. *J Bacteriol* **179**, 3146-3153.
- Devereux, R., He, S.-H., Doyle, C. L., Orkland, S., Stahl, D. A., LeGall, J. & Whitman, W. B. (1990).** Diversity and origin of *Desulfovibrio* species: phylogenetic definition of a family. *J Bacteriol* **172**, 3609-3619.
- Dijkshoorn, L., Ursing, B. M. & Ursing, J. B. (2000).** Strain, clone and species: comments on three basic concepts of bacteriology. *J Med Microbiol* **49**, 397-401.
- Dobson, S. J., James, S. R., Franzmann, P. D. & McMeekin, T. A. (1990).** Emended description of *Halomonas halmophila* (NCBM 1971<sup>T</sup>). *Int J Syst Bacteriol* **40**, 462-463.
- Dobson, S. J., Colwell, R. R., McMeekin, T. A. & Franzmann, P. D. (1993).** Direct sequencing of the polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA gene of *Flavobacterium*

*gondwanense* sp. nov., and *Flavobacterium salegens* sp. nov., two new species from a hypersaline Antarctic lake. *Int J Syst Bacteriol* **43**, 77-83.

**Dobson, S. J. & Franzmann, P. D. (1996).** Unification of the genera *Deleya* (Baumann *et al.*, 1993), *Halomonas* (Vreeland *et al.*, 1980), and *Halovibrio* (Fendrich, 1988) and the species *Paracoccus halodenitrificans* (Robinson & Gibbons, 1952) into a single genus *Halomonas*, and placement of the genus *Zymobacter* in the family *Halomonadaceae*. *Int J Syst Bacteriol* **46**, 550-558.

**Duckworth, A. W., Grant, W. D., Jones, B. E. & Van Steenberg, R. (1996).** Phylogenetic diversity of soda lake alkaliphiles. *FEMS Microbiol Ecol* **19**, 181-191.

**Duckworth, A. W., Grant, W. D., Jones, B. E., Meijer, D., Marquez, M. C. & Ventosa, A. (2000).** *Halomonas magadii* sp. nov., a new member of the genus *Halomonas*, isolated from a soda lake of the East Africa Rift Valley. *Extremophiles* **4**, 53-60.

**Dussault, H. P. (1955).** An improved technique for staining red halophilic bacteria. *J Bacteriol* **70**, 484-485.

## É

**Ebel, C., Faou, P., Kenel, B. & Zaccari, G. (1999).** Relative Role of Anions and Cations in the Stabilization of Halophilic Malate Dehydrogenase. *Biochemistry* **38**, 9039-9047.

**Eder, W., Jahnke, L. L., Schmidt, M & Huber, R. (2001).** Microbial Diversity of the Brine-Seawater Interface of the Kebrit Deep, Red Sea, Studied via 16S rRNA gene Sequences and Cultivation Methods. *Appl Environ Microbiol* **67**, 3077-3083.

**Edgell, D. R. & Doolittle, W. F. (1997).** Archaea and the origin(s) of DNA replication proteins. *Cell* **89**, 995-998.

**Edgerton, M. E. & Brimblecome, P. (1981).** Thermodynamics of halobacterial environments. *Can J Microbiol* **27**, 899-909.

**Elazari-Volcani, B. (1957).** Genus *Halobacterium*. Dans *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7<sup>ème</sup> édition. pp. 207-212, R. G. Breed, E. G. D. Murray, & N. R. Smith. Williams & Wilkins, Baltimore.

**Elevi, R., Assa, P., Birbir, M., Ogan, A. & Oren, A. (2004).** Characterization of extremely halophilic Archaea from the Ayvalik Saltern, Turkey. *World J Microbiol Biotechnol* **00**, 1-7.

## ف

**Falb, M., Pfeiffer, F., Palm, P., Rodewald, K., Hickmann, V., Tittor, J. & Oesterheld, D. (2005).** Living with two extremes: Conclusions from the genome sequence of *Natronomonas pharaonis*. *Genome Research* **15**, 1336-1343.

**Fan, H., Xue, Y., Ma, Y., Ventosa, A. & Grant, W. D. (2004).** *Halorubrum tibetense* sp. nov., a novel haloalkaliphilic archaeon from Lake Zabuye in Tibet, China. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 1213-1216.

**Felsenstein, J. (1981).** Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* **7**, 368-376.

**Fendrich, C. (1988).** *Halovibrio variabilis* gen. nov., sp. nov., *Pseudomonas halophila* sp. nov. and a new halophilic aerobic coccoid eubacterium from Great Salt Lake, Utah USA. *Syst Appl Microbiol* **11**, 36-43.

**Fendrihan, S., Legat, A., Pfaffenhüemer, M., Grüber, C., Weidler, G., Gerbl & Stan-Lotter, H. (2006).** Extremely halophilic archaea and the issue of long-term microbial survival. *Rev Environ Sci Biotechnol* **5**, 203-218.

**Feng, J., Zhou, P. J. & Liu, S.-J. (2004).** *Halorubrum xinjiangense* sp. nov., a novel halophile isolated from saline lakes in China. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 1789-1791.

- Feng, J., Zhou, P., Zhou, Y.-G., Liu, S.-J. & Warren-Rhodes, K. (2005).** *Halorubrum alkaliphilum* sp. nov., a novel haloalkaliphile isolated from a soda lake in Xinjiang, China. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 149-152.
- Fernandez-Castillo, R., Rodriguez-Valera, F., Gonzalez-Ramos, J. & Ruiz-Berraquero, F. (1986).** Accumulation of Poly( $\beta$ -Hydroxybutyrate) by Halobacteria. *Appl Environ Microbiol* **51**, 214-216.
- Ferragut, C. & Leclerc H. (1976).** Etude comparative des méthodes de détermination du  $T_m$  de l'ADN bactérien. *Ann Microbiol (Paris)* **127A**, 223-235.
- Fitch, W. (1971).** Towards defining the course of evolution minimum change for a specific tree topology. *Syst Zool* **20**, 406-416.
- Forterre, P. (1997).** Archaea: what can we learn from their sequences ?. *Curr Opin Genet Dev* **7**, 764-770.
- Franzmann, P. D., Burton, H. R. & McMeekin, T. A. (1987).** *Halomonas subglaciescola* sp. nov., a new species of halotolerant bacteria isolated from Antarctica. *Int J Syst Bacteriol* **37**, 27-34.
- Franzmann, P. D., Wehmeyer, U. & Stackebrandt, E. (1988).** *Halomonadaceae* fam. nov., a new family of the class *Proteobacteria* to accommodate the genera *Halomonas* and *Delaya*. *Syst Appl Microbiol* **11**, 16-19.
- Fritz, D. (1996).** *Bacillus haloalkaliphilum* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **46**, 98-101.
- Fry, N. K., Warwick, S., Saunders, N. A. & Embley, T. M. (1991).** The use of 16S rRNA analyses to investigate the phylogeny of the family *Legionellaceae*. *J Gen Microbiol* **137**, 1215-1222.
- Fuerst, J.A. (2002).** Semantides and Modern Bacterial Systematics. *Encyclopedia of Life*. Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group. pp.1-11.
- Fujiwara, T., Fukumori, Y. & Yamanaka, T. (1989).** Purification and properties of *Halobacterium halobium* cytochrome aa3 which lacks CuA and CuB. *J Biochem* **105**, 287-292.
- G**
- Gabor, E. M., de Vries, E. J. & Janssen, D. B. (2003).** Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirect extraction methods. *FEMS Microbiol Ecol* **44**, 153-163.
- Galinski, E., Pfeifer, H. P. & Trüper, H. G. (1985).** 1, 4, 5, 6-Tetra-hydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid: a novel cyclic amino acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus *Ectothiorhodospira*. *Eub J Biochem* **149**, 145-139.
- Galinski, E. A. & Lippert, K. (1991).** Novel compatible solutes and their potential application as stabilizers in enzyme technology. In *General and Applied Aspects of Halophilic Microorganisms*. Ed. F. Rodriguez-Valera. pp. 351-358. New York, Plenum Press.
- Galinski, E. A. (1993).** Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solutes interaction, stress protection. *Experientia* **49**, 487-496.
- Galinski; E. A. & Trüper, H. G. (1994).** Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* **15**, 95-108.
- Garabito, M. J., Arahall, D. R., Mellado, E., Márquez, M. C. & Ventosa, A. (1997).** *Bacillus salexigens* sp. nov., a new moderately halophilic *Bacillus* species. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 735-741.
- Garcia, M. T., Mellado, E., Ostos, J. C. & Ventosa, A. (2004).** *Halomonas organivorans* sp. nov., a moderate halophile able to degrade aromatic compounds. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 1723-1728.

- Garriga, M., Ehrmann, M. A., Amau, J., Hugas, M. & Vogel, R. F. (1998). *Carnimonas nigrificans* gen. nov., sp. nov., a bacterial causative agent for black spot formation on cured meat products. *Int J Syst Bacteriol* **48**, 677-686.
- Garrity, G. M. & Holt, J. G. (2001). The road map to the Manual of Systematic Bacteriology. Volume 1. Springer, New York.
- Garrity, G. M., Bell, J. A. & Lilburn, T. G. (2004). Taxonomic Outline of the Prokaryotes. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. p. 399. Springer, New York Berlin Heidelberg.
- Gärtner, W. & Losi, A. (2003). Crossing the borders: archaeal rhodopsins go bacterial. *Trends Microbiol* **11**, 405-407.
- Gauthier, M. J., Lafay, B., Christen, R., Fernandez, L., Acquaviva, M., Bonin, P. & Bertrand, J.-C. (1992). *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a new extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium. *Int J Syst Bacteriol* **42**, 568-576.
- Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A. & Krieg, N. R. (1994). *Methods for General and Molecular Bacteriology*. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Ghosh, M. & Sonawat, H. M. (1998). Kreb's TCA cycle in *Halobacterium salinarum* investigated by C-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Extremophiles* **2**, 427-433.
- Gochbauer, M. B., Kushawa, S. C., Kates, M. & Kushner, D. J. (1972). Nutritional control of pigment and isoprenoid compound formation in extremely halophilic bacteria. *Arch Microbiol* **84**, 339-349.
- Gonzalez, C., Gutierrez, C. & Ramirez, C. (1978). *Halobacterium vallismortis* sp. nov., an amyolytic and carbohydrate metabolizing extremely halophilic bacterium. *Can J Microbiol* **24**, 710-715.
- Gorshkova, N. M., Ivanova, E. P., Sergeev, A. F., Zhukova, N. V., Alexeeva, Y., Wright, J. P., Nicolau, D. V., Mikhailov, V. V. & Christen, R. (2003). *Marinobacter excellens* sp. nov., isolated from sediments of the Sea of Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 2073-2078.
- Grant, W. D. & Tindall, B. J. (1986). The alkaline salt environment. In *Microbes in Extreme Environments*. Eds. R. A. Herbert & G. A. Codd. pp. 25-54. Academic Press, New York, USA.
- Grant, W. D. & Larsen, H. (1989). Group III. Extremely halophilic Archaeobacteria Order Halobacteriales ord. nov. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Eds. J. T. Staley, M. P. Bryant, N. Pfennig & J. G. Holt. pp. 2216-2233. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, USA.
- Grant, S., Grant, W. D., Jones, B. E., Kato, C. & Li, L. (1999). Novel archaeal phylotype from an east African alkaline saltern. *Extremophiles* **3**, 139-145.
- Grant, W. D., Gemmell, R. T. & McGenity, T. J. (1998). Halobacteria: the evidence for longevity. *Extremophiles* **2**, 279-287.
- Grant, W. D., Kamekura, M., McGenity, T. J. & Ventosa, A. (2001). The order Halobacteriales. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2<sup>ème</sup> édition, Volume 1. D. R. Boone & R. W. Castenholz. pp. 294-334. New York: Springer.
- Grant, W. D. (2004). Life at low water activity. *Phil Trans R Soc Lond B* **359**, 1249-1267.
- Greenberg, E. P. & Canole-Parola, E. (1976). *Spirochaeta halophila* sp. nov., a fermentative anaerobic bacterium from a high-salinity pond. *Arch Microbiol* **110**, 185-194.
- Grimont, P. A. D. (1981). Use of DNA reassociation in bacterial classification. *Can J Microbiol* **34**, 541-546.
- Grüber, C., Legat, A., Ptuffenhuemer, M., Radax, C., Weidler, G., Busse, H.-J. & Stan-Lotter, H. (2004). *Halobacterium noricense* sp. nov., an archaeal isolate from a bore of an alpine Permian salt deposit, classification of *Halobacterium* sp. NRC-1 as a strain of *H. salinarum* and emended description of *H. salinarum*. *Extremophiles* (sous presse).

- Guezennec, J. (1995).** Approches des ecosystems bactériens par les lipides: force et faiblesse des marqueurs bactériens. *Oceanis* **20**, 75-93.
- Gutiérrez, C. & González, C. (1972).** Methods for Simultaneous Detection of Proteinase and Esterase Activities in Extremely Halophilic Bacteria. *Appl Microbiol* **24**, 516-517.
- Guyoneaud, R., Suling, J., Petri, R., Matheron, N., Caumette, P., Pfennig, N. & Imhoff, J. (1998).** Taxonomic rearrangements of the genera *Thiocapsa* and *Amoebobacter* on the basis of 16S rDNA sequence analyses and description of *Thiolamprovum* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol*, sous presse.

## 5

- Hacène, H., Rafa, F., Chebhouni, N., Boutaiba, S., Bhatnagar, T., Baratti, J. C. & Ollivier, B. (2004).** Biodiversity of prokaryotic microflora in El Golea salt Lake, Algerian Sahara. *J Arid Environ* **58**, 273-284.
- Hao, M. Y., Kocur, M. & Komagata, K. (1984).** *Marinococcus* gen. nov., a new genus for motile cocci with meso-diaminopimelic acid in the cell walls; and *Marinococcus albus* sp. nov., and *Marinococcus halophilus* comb. nov. *J Gen Appl Microbiol* **30**, 449-459.
- Hartmann, R., Sikinger, H.-D. & Oesterhelt, D. (1980).** Anaerobic growth of halobacteria. *Proc Natl Sci USA* **77**, 3821-3825.
- Hebert, A. M. & Vreeland, R. H. (1987).** Phenotypic comparison of halotolerant bacteria: *Halomonas halodurans* sp. nov., nom. rev., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **37**, 347-350.
- Hendler, R. W. & Dracheva, S. (2001).** Importance of Lipids for Bacteriorhodopsin Structure Photocycle, and Function. *Biochem (Moscow)* **66**, 1311-1314.
- Heyrman, J., Logan, N. A., Busse, H.-J., Balcaen, A., Lebbe, L., Rodriguez-Dias, M., Swings, J. & De Vos, P. (2003).** *Virgibacillus carmonensis* sp. nov., *Virgibacillus necropolis* sp. nov. and *Virgibacillus picturae* sp. nov., three novel species isolated from deteriorated mural paintings, transfer of the species of the genus *Salibacillus* to *Virgibacillus*, as *Virgibacillus marismortui* comb. nov. and *Virgibacillus salexigens* comb. nov., and emended description of the genus *Virgibacillus*. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 501-511.
- Hezayen, F. F., Tindall, B. J., Steinbüchel, A. & Rehm, B. H. A. (2002).** Characterization of a novel halophilic archaeon, *Halobiforma haloterrestris* gen. nov., sp. nov., and transfer of *Natronobacterium nitratireducens* to *Halobiforma nitratireducens* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 2271-2280.
- Hildebrand, E. & Schimz, A. (1983).** Photosensory behaviour of *Halobacterium halobium*. *Photochem Photobiol* **37**, 581-584.
- Hochstein, L. I. (1988).** The physiology and metabolism of the extremely halophilic bacteria. In *Halophilic bacteria*. Ed. F. Rodriguez-Valera. pp. 67-83. CRC, Boca Raton, Fla.
- Hough, D. W. & Danson, M. J. (1999).** Extremozymes. *Curr Opin Chem Biol* **3**, 39-46.
- Hrabak, O. (1992).** Industrial production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. *FEMS Microbiology Rev* **103**, 251-256.
- Hugenholtz, P. (2002).** Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biology* **3**, 1-8.

## J

- Imhoff, J. & Rodriguez-valera, F. (1984).** Betaine is the main compatible solute of halophilic eubacteria. *J. Bacteriol* **160**, 478-479.
- Imhoff, J. (1988).** Halophilic phototrophic bacteria. In *Halophilic bacteria*. Ed. F. Rodriguez-Valera. pp. 85-108. CRC Press, Boca Raton.

- Imhoff, J. & Suling, J. (1996).** The phylogenetic relationship among the *Ectothiorhodospiraceae*: a reevaluation of their taxonomy on the basis of 16S rDNA analyses. *Arch Microbiol* **165**, 106-113.
- Imhoff, J., Petri, R. & Suling, J. (1998a).** Reclassification of species of the spiral-shaped phototrophic purple non-sulfur bacteria. *Int J Syst Bacteriol* (sous presse).
- Imhoff, J., Suling, J. & Petri, R. (1998b).** Phylogenetic relationships among the *Chromatiaceae*. *Int J Syst Bacteriol* (sous presse).
- Itoh, T., Yamagushi, T., Zhou, P. & Takashina, T. (2005).** *Natronolimnobius baerhuensis* gen. nov., sp. nov., and *Natronolimnobius innermongolicus* sp. nov., novel haloalkaliphilic archaea isolated from soda lakes in inner Mongolia, China. *Extremophiles* **9**, 11-116.
- Ivanov, M. V. (1995).** Halophilic archaebacteria from the Kalambass oil field. *Microbiol* **64**, 67-71.

## J

- James, S. R., Dobson, S. J., Franzmann, P. D. & McMeekin, T. A. (1990).** *Halomonas meridiana*, a new species of extremely halotolerant bacteria isolated from Antarctic saline lakes. *Syst Appl Microbiol* **13**, 270-278.
- Javor, B.J. (1983).** Planktonic standing crop and nutrients in a saltern ecosystem. *Limnol Oceanogr* **28**, 153-159.
- Javor, B. J. (1984).** Growth Potential of Halophilic Bacteria Isolated from Solar Salt Environments: Carbon Sources and Salt Requirements. *Appl Environ Microbiol* **8**, 352-360.
- Javor, B. J. (1989).** Halophilic Archaeobacteria. In *Hypersaline Environments Microbiology and Biogeochemistry*. pp. 101-120. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Johnsen, U., Selig, M., Xavier, K. B., Santos, H. & Schönheit, P. (2001).** Different glycolytic pathways for glucose and fructose in the halophilic archaeon *Halococcus saccharolyticus*. *Arch Microbiol* **175**, 52-61.
- Johnson, K. G., Lanthier, P. H. & Gochner, M. B. (1986).** Studies of two strains of *Actinopolyspora halophila*, an extremely halophilic actinomycete. *Arch Microbiol* **143**, 370-378.
- Jones, A. G., Ewing, C. M. & Melvio, M. V. (1981).** Biotechnology of solar saltfield. *Hydrobiologia* **82**, 391-406.
- Jones, C. J. & Aizawa, S. (1991).** The bacterial flagellum and flagellar motor: structure, assembly and function. *Adv Microbiol Physiol* **32**, 109-172.
- Juez, G. (2004).** Extremely Halophilic Archaea: Insights into Their Response to Environmental Conditions. In *Halophilic Microorganisms*. Ed. A. Ventosa. pp. 243-253. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Jukes, T. & Cantor, C. (1969).** Evolution of protein molecules. In mammalian protein metabolism. Ed. H. N. Munro. pp. 21-31. Academic press, New York, NY.

## K

- Kamekura, M., Hamakawa, T. & Onishi, H. (1982).** Application of halophilic nuclease H of *Micrococcus varians* subsp. *halophilus* to commercial production of flavouring agent 5' - GMP. *Appl Environ Microbiol* **44**, 994-995.
- Kamekura, M. & Onishi, H. (1983).** Inactivation of nuclease H of the moderate halophile *Micrococcus varians* ssp. *halophilus* during cultivation in the presence of salting-in type salts. *Can J Microbiol* **29**, 46-51.
- Kamekura, M. & Kushner, D. J. (1984).** Effect of chloride and glutamate ions on in vitro protein synthesis by the moderate halophile *Vibrio costicola*. *J Bacteriol* **160**, 385-390.

- Kamekura, M., Wallace, R., Hipkiss, A. R. & Kushner, D. (1985).** Growth of *Vibrio costicola* and other moderate halophiles in a chemically defined minimal medium. *Can J Microbiol* **31**, 870-872.
- Kamekura, M. & Kates, M. (1988).** Lipids of halophilic archaeobacteria. In *Halophilic Bacteria*. Ed. F. Rodriguez-Valera. pp. 25-54. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Kamekura, M. & Dyll-Smith, M. L. (1995).** Taxonomy of the family *Halobacteriaceae* and the description of two new genera *Halorubrobacterium* and *Natrialba*. *J Gen Appl Microbiol* **41**, 333-350.
- Kamekura, M., Dyll-Smith, M. L., Ventosa, A. & Kates, M. (1997).** Diversity of alkaliphilic halobacteria: proposal for the transfert of *Natronobacterium vacuolatum*, *Natronobacterim magadii* and *Natronobacterium pharaonis* to the genus *Halorubrum*, *Natrialba* and *Natronomonas* gen. nov., respectively as *Halorubrum vacuolatum* comb. nov., *Natrialba magadii* com. nov. and *Natronomonas pharaonis* comb. nov., respectively. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 853-857.
- Kamekura, M. (1998).** Diversity of extremely halophilic bacteria. *Extremophiles* **2**, 289-295.
- Kamekura, M. (1999a).** Alkaliphilic microorganisms. In *Enigmatic Microorganisms and Life in Extreme Environments*. Ed. J. Seckbatch. pp. 479-485. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherland.
- Kamekura, M. (1999b).** Diversity of members of the family *Halobacteriaceae*. In *Microbiology and Biogeochemistry of Hypersaline Environments*. Ed. A. Oren. pp. 13-25. CRC Press, Boca Raton, London New York Washington, DC.
- Kamekura, M. & Kates, M. (1999).** Structural Diversity of Membrane Lipids in Members of *Halobacteriaceae*. *Biosci Biotechnol Biochem* **63**, 969-972.
- Kamekura, M., Mizuki, T., Usami, R., Yoshida, Y., Horikoshi, K. & Vreeland, R. H. (2004).** The Potentiel Use of Signature Bases from 16S rRNA Gene Sequences To Aid Assignment of Microbial Strains to Genera of Halobacteria. In *Halophilic Microorganisms*. Ed. A. Ventosa. pp. 77-87. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Kämpfer, P. & Rosselló-Mora, R. (2004).** The species concept for prokaryotic microorganisms-An obstacle for describing diversity. *Poiesis Prax* **3**, 62-72.
- Kanai, H., Kobayashi, T., Aono, R. & Kodo, T. (1995).** *Natronococcus amylolyticus* sp. nov., a Haloalkaliphilic Archaeon. *Int J Syst Bacteriol* **45**, 762-766.
- Kates, M. (1972).** Isolation, analysis and identification of lipids. In *Techniques of Lipidology*. pp. 269-610. New York: North-Holland/American Elsevier.
- Kates, M. & Kushwaha, S. C. (1978).** Biochemistry of the lipids of extremely halophilic bacteria. In *Energetics and Structure of Halophilic Microorganisms*. Eds. S. C. Caplan, M. Ginsburg. pp. 451-479. Elsevier/North Holland Biochemical Press, Amsterdam.
- Kates, M. (1978).** The phytanyl ether-linked polar lipids and isoprenoid neutral lipids of extremely halophilic bacteria. *Prog Chem Fats other lipids* **15**, 301-342.
- Kates, M. (1984).** Adventures in Membrane land. *JAOCS* **61**, 1826-1835.
- Kates, M. (1988a).** Structure, Physical Properties, and Function of Archaeobacterial Lipids. *Biological Membranes: Aberrations in Membranes Structure and Function*. Ed. R. Alan. pp. 357-384. Liss Inc.
- Kates, M. (1993a).** Biosynthesis, function and evolutionary significance. *Experientia* **49**, 1027-1036.
- Kates, M. (1993b).** Membrane lipids of archaea. In *The biochemistry of archaea (archaeobacteria)*. Eds. M. Kates, D. J. Kushner & A. T. Matheson. pp. 261-295. Elsevier, Amsterdam.
- Kates, M. (1996).** Survival analysis of phospholipids and glycolipids in extremely halophilic archaeobacteria. *J Microbiol Methods* **25**, 113-128.
- Kaurichev, I. S. (1980).** *Practicas de Edofologia*. Mir Publishers, Moscow.

- Kaye, J. Z., Márquez, M. C., Ventosa, A. & Baross, J. A. (2004).** *Halomonas neptunia* sp. nov., *Halomoans sulfidaeris* sp. nov., *Halomonas axialensis* sp. nov. and *Halomonas hydrothermalis* sp. nov.: halophilic bacteria isolated from deep-sea hydrothermal-vent environments. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 499-511.
- Keeling, P. J., Charlebois, R. L. & Doolittle, W. F. (1994).** Archaeobacterial genomes eubacterial form and eukaryotic content. *Curr Op Genet Dev* **4**, 826-822.
- Keith-Roach, M. J., Bryan, N. D., Bardgett, R. D. & Livens, P. R. (2002).** Seasonal changes in the microbial community of a salt marsh, measured by phospholipid fatty acid analysis. *Biogeochemistry* **60**, 77-96.
- Kenada, T. (1991).** Iso- and Anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Mirobiol Rev* **55**, 288-302.
- Ken-Dror, S., & Avi-Dror, Y. (1985).** Regulation of respiration by Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> in the halotolerant bacterium Ba1. *Arch Biochem Biophys* **234**, 238-245.
- Ken-Dror, S., Preger, R. & Avi-Dror, Y. (1986).** Role of betaine in the control of respiration and osmoregulation of a halotolerant bacterium. *FEMS Microbiol Rev* **39**, 115-120.
- Kennedy, S. P., Ng, W. V., Salzberg, S. L., Hood, L. & DasSarma, S. (2001).** Understanding the adaptation of *Halobacterium* NRC-1 to its extreme environment through computational analysis of its genome sequence. *Genome research* **11**, 1641-1650.
- Kessel, M. & Cohen, Y. (1982).** Ultrastructure of square bacteria from a brine pool in southern Sinai. *J Bacteriol* **150**, 851-860.
- Kharroub, K., Quesada, T., Ferrer, R., Fuentes, S., Aguilera, M., Boulahrouf, A. Ramos-Cormenzana, A. & Monteoliva-Sanchez, M. (2006).** *Halorubrum ezzemoulense* sp; nov., a halophilic archaeon isolated from Ezzemoul sabkha, Algeria. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 1583-1588.
- Kimura, M. (1980).** A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **16**, 111-120.
- Kimura, M., Arndt, E., Hatakeyama, T. & Kimura, J. (1989).** Ribosomal proteins in halobacteria. *Can J Microbiol* **35**, 195-199.
- Kimura, Y., Vassylyev, D. G., Miyazawa, A., Kidera, A., Matsushima, M., Mitsuoka, K., Murata, K., Hirai, T. & Fujiyoshik. (1997).** Surface of bacteriorhodopsin revealed by high-resolution electron crystallography. *Nature* **389**, 206-211.
- Kitajima, T., Hirayama, J.-I., Ihara, K., Sujiyama, Y., kamo, N. & Mukotatai (1996).** Novel Bacterial Rhodopsins from *Haloarcula vallismortis*. *Biochem Biophys Res Communications* **220**, 341-345.
- Klebahn, H. (1919).** Die Schädlinge des Klippfisches. *Mitt Ins Allg Botanik Hamburg* **4**, 11-69.
- Kocur, M., Smid, B. & Martinee, T. (1972).** The fine structure of extreme halophilic cocci. *Microbios* **5**, 101-113.
- Kocur, M. & Hodgkiss, W. (1973).** Taxonomic status of the genus *Halococcus* Schoop. *Int J Syst Bacteriol* **23**, 151-156.
- Krantz, M. J. & Ballou, C. E. (1973).** Analysis of *Halobacterium halobium* gas vesicles. *J Bacteriol* **114**, 1058-1067.
- Krekeler, D. P., Sigalevich, P., Teske, A., Cypionka, H. & Chen, Y. (1997).** A sulfate-reducing bacterium from the oxic layer of a microbial mat from Solar Lake (Sinai), *Desulfovibrio oxycliniae* sp. nov. *Arch Microbiol*, **167**, 369-375.
- Kumar, S., Tamura, K. & Nei, M. (2004).** Mega 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* **5**, 150-163.
- Kunte H. J. (2004).** Osmoregulated Solute Transport in Halophilic Bacteria. In *Halophilic Microorganisms*. Ed. A. Ventosa. pp. 154-165. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

- Kushner, D. J. (1964).** Lysis and dissolution of cells and envelopes of an extremely halophilic bacterium. *J Bacteriol* **87**, 1147-1156.
- Kushner, D. J. (1978).** Life in high salt and solute concentrations: Halophilic bacteria. In *Microbial Life in Extreme Environments*. Ed. D. J. Kushner. pp. 317-368. Academic Press, London.
- Kushner, D. J. (1986).** Molecular adaptation of enzymes, metabolic systems and transport systems in halophilic Bacteria. *FEMS Micobiol Rev* **39**, 121-127.
- Kushner, D. J. (1993).** Growth and nutrition of halophilic bacteria. In *The biology of halophilic bacteria*. Eds. R. H. Vreeland & L. I. Hochstein. pp. 87-103. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.

## L

- Labrenz, M., Collins, D., Lawson, P. A., Tindall, B. J., Braker, G. & Hirsch (1998).** *Antarctobacter heliothermus* gen. nov., sp. nov., a budding bacterium from hypersaline and heliothermal Ekho Lake. *Int J Syst Bacteriol* **48**, 1363-1372.
- Labrenz, M., Lawson, P. A., Tindall, B. J., Collins, M. D. & Hirsch, P. (2003).** *Saccharospirillum impatiens* gen. nov., sp. nov., a novel  $\gamma$ -Proteobacterium isolated from hypersaline Ekho Lake (East Antarctica). *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 653-660.
- Lafferty, R. M., Korsatko, B. & Korsatko, W. (1988).** Microbial production of poly-beta-hydroxybutyric acid. In *Biotechnology*. Ed. H. J. Rehm & G. Reed. Volume 6b. pp. 136-176. Weinheim, Verlag Chemie.
- Lane, D. J. (1991).** 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Ed. E. Stackebrandt & M. Goodfellow. pp. 115-175. Chichester: John Wiley.
- Langer, D., Hain, J., Thuriaux, P. & Zillig, W. (1995).** Transcription in Archaea : similarity to that in Eukarya. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 5768-5772.
- Lanyi, J. K. (1974).** Salt dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriol Rev* **38**, 272-290.
- Lanyi, J. K. (1978).** Transport of cations and amino acids in *Halobacterium halobium*. In *Energetic and Structure of Halophilic Microorganisms*. Ed. S. R. Caplan & M. Ginzburg. pp. 415-423. Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
- Lanyi, J. K. & Schobert, H. (1983).** Effects of chloride and pH on the chromophore and photochemical cycling of halorhodopsin. *Biochemistry* **22**, 2763-2769.
- Lanyi, J. K. (2000).** Bacteriorhodopsin. *Biochim Biophys Acta* **1460**, 1-3.
- Larsen, H. (1962).** Halophilism. In *The Bacteria: a treatise on structure and function*. Volume IV. Eds. I. C. Gunsalus & R. Y. Stanier. pp. 297-342. Academic Press Inc, New York.
- Larsen, H. (1980).** Ecology of hypersaline environments. In *hypersaline Brines and Avaporitics environments*. Ed. A. Nissenbaum. pp. 23-60. Elsevier Amsterdam, The Netherlands.
- Lillo, L. G. & Rodriguez-Valera, F. (1990).** Effect of Culture Conditions on Poly ( $\beta$ -Hydroxy-butyric Acid) production by *Haloferax mediterranei*. *Appl Environ Microbiol* **56**, 2517-2521.
- Lind, E. & Ursing, J. (1986).** Clinical strains of *Enterobacter agglomerans* (synonyms, *Erwinia herbicola*, *Erwinia milletiae*) identified by DNA-DNA hybridization. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand Sect B* **94**, 205-213.
- Lippert, R. & Galinski, E. A. (1992).** Enzyme stabilisation by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Appl Microbiol Biotechnol* **37**, 61-65.
- Litchfield, C. D., Irby, A. & Vreeland, R. H. (1998).** The Microbial Ecology of Solar Salt Plants. In *Microbiology and Biogeochemistry of Hypersaline Environments*. Ed. A. Oren. pp. 39-52. CRC Press, Boca Raton, London New York Washington, DC.

- Litchfield, C. D. (1998).** Survival strategies for microorganisms in hypersaline environments and their relevance to life on early Mars. *Meteoritics & Planetary Science* **33**, 813-819.
- Litchfield, C. D., Irby, A., Kis-Papo, T. & Oren, A. (2000).** Comparisons of the polar lipid and pigment profiles of two salterns located in Newark, California, U.S.A., and Eilat, Israel. *Extremophiles* **4**, 259-265.
- Litchfield, C. D. & Oren, A. (2001).** Polar lipids and pigments as biomarkers for the study of the microbial community structure of solar salterns. *Hydrobiologia* **466**, 81-89.
- Litchfield, C. D. & Gillevet, P. M. (2002).** Microbial diversity and complexity in hypersaline environments: A preliminary assessment. *J Ind Microbiol Biotechnol* **28**, 48-55.
- Litchfield, C. D., Oren, A., Irby, A., Sikaroodi, M. & Gillevet, P. M. (2006).** Temporal and salinity on the microbial diversity at the Eilat, Israel, Solar salt Plant. *Proceedings of the 1<sup>st</sup> International Conference on the Ecological Importance of Solar Saltworks (CEISSA 06) Santorini Island, Greece, 20-22 October*, 72-81.
- Liu, W. Y., Zeng, J., Dou, L. & Yang, S. S. (2005).** *Halobacillus dabanensis* and *Halobacillus aidingensis* sp. nov., isolated from salt lakes in Xinjiang, China. *Int J Syst Evol Microbiol* (sous presse).
- Liu, W. Y. & Shao, Z. (2005).** *Alcanivorax dieselolei* sp. nov., a novel alkane-degrading bacterium isolated from sea and deep-sea sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 1181-1186.
- Lizama, C., Monteoliva-Sanchez, M., Suarez-Garcia, A., Rosselló-Mora, R., Aguilera, M., Campos, V. & Ramos-Cormenzana, A. (2002).** *Halorubrum tebenquichense* sp. nov., a novel halophilic archaeon isolated from the Atacama Saltern, Chile. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 149-155.
- Lopéz-Cortés, A. & Ochoa, J. L. (1998).** The biological significance of halobacteria on nucleation and sodium chloride crystal growth. In Adsorption and its applications in industry and environmental protection. *Studies in surface science and catalysis* **120**, 903-923.
- Lopez, P., Phillipe, H., Myllykallio, H., Forterre, P. (1999).** Identification of putative chromosomal origins of replication in archaea. *Mol Microbiol* **32**, 883-886.
- Ludwig, W. & Schleifer, K.-H. (1994).** Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol Rev* **15**, 155-173.
- Lykke-Andersen, J., Aagaard, C., Semionenkov, M. & Garrett, R. A. (1997).** Archaeal introns: splicing, intracellular mobility and evolution. *Trends Biochem Sci* **22**, 326-331.

## ᄁ

- Mackay, M. A., Norton, R. S. & Borowitzka, L. J. (1984).** Organic osmoregulatory solutes in Cyanobacteria. *J Gen Microbiol* **130**, 2177-2191.
- Madern, D., Pfister, C. & Zaccai, G. (1995).** Mutation at a single acidic amino acid enhances the halophilic behaviour of malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui* in physiological salts. *Eur J Biochem* **230**, 1088-1095.
- Madern, D., Ebel, C. & Zaccai, G. (2000).** Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles* **4**, 91-98.
- Madigan, M. T., Oren, A. (1999).** Thermophilic and halophilic extremophiles. *Curr Opin Microbiol* **2**, 265-269.
- Margesin, R. & Schinner, F. (2001).** Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles* **5**, 73-83.
- Marmur, J. (1961).** A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J Mol Biol* **3**, 208-216.
- Marmur, J. & Doty, P. (1962).** Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J Mol Biol* **5**, 109-118.

- Marsh, T. L., Reich, C. I., Whitelock, R. B. & Olsen, G. J. (1994). Transcription factor IID in the Archaea sequences in the *Thermococcus celer* genome would encode a product closely related to the TATA-binding protein of eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 4180-4184.
- Martin, S., Márquez, M. C., Sánchez-Perro, C., Mellado, E., Arahál, D. R. & Ventosa, A. (2003). *Marinobacter lipolyticus* sp. nov., a novel moderate halophile with lipolytic activity. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1383-1387.
- Martinez-Cánovas, M. J., Quesada, E., Matinez-Checa, F., delMoral, M. & Bejar, V. (2004a). *Salipiger mucescens* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium isolated from hypersaline soil, belonging to the  $\alpha$ -Proteobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 1735-1740.
- Martinez-Cánovas, M. J., Quesada, E., Llamas, I. & Bejar, V. (2004b). *Halomonas ventosae* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying, exopolysaccharide-producing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 733-737.
- Martinez-Cánovas, M. J., Quesada, E., Matinez-Checa, F., & Bejar, V. (2004c). A Taxonomic Study to Establish the Relationship between Exopolysaccharide-Producing Bacterial Strains Living in Diverse Hypersaline Habitats. *Current Microbiol* **48**, 348-353.
- Martinez-Cánovas, M. J., Bejar, V., Matinez-Checa, F., & Quesada, E. (2004d). *Halomonas anticariensis* sp. Nov., from Fuente de Piedra, a saline-wetland reserve in Málaga, southern Spain. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 1329-1332.
- Martinez-Checa, F., Quesada, E., Martinez-Cánovas, M. J., Llamas, I. & Bejar, V. (2005). *Palleronia marismortui* gen. nov., a moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium belonging to the  $\alpha$ -Proteobacteria, isolated from a saline soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 2525-2530.
- Mata, J.-A., Béjar, V., Llamas, I., Arias, S., Bressollier, P., Tallon, R., Urdaci, M. C. & Quesada, E. (2006). Exopolysaccharides produced by the recently described halophilic bacteria *Halomonas ventosae* and *Halomonas anticariensis*. *Research in Microbiol* **157**, 827-835.
- Maturrano, L., Santos, F., Rosselló-Mora, R. & Antón, J. (2006a). Microbial Diversity in Maras salterns, a Hypersaline Environment in the Peruvian Andes. *Appl Environ Microbiol* **72**, 3887-3895.
- Maturrano, L., Valens-Vadell, M., Rosselló-Mora, R. & Antón, J. (2006b). *Salicola marasensis* gen. nov., sp. nov., a novel extremely halophilic member of the domain Bacteria isolated from Maras solar saltern in Perú. *Int J Syst Evol Microbiol* (sous press).
- McGenity, T. & Grant, W. D. (1995). Transfer of *Halobacterium saccharovorum*, *Halobacterium sodomense*, *Halobacterium trapanicum* NRC 34021 and *Halobacterium lacusprofundi* to *Halorubrum saccharovorum* comb. nov., *Halorubrum sodomense* comb. nov., *Halorubrum trapanicum* comb. nov. and *Halorubrum lacusprofundi* comb. nov. *Syst Appl Microbiol* **18**, 237-243.
- McGenity, T. J., Gemmell, R. T. & Grant, W. D. (1998). Proposal of a new halobacterial genus *Natrinema* gen. nov., with two species *Natrinema pellirubrum* nom. nov. and *Natrinema pallidum* nom. nov. *Int J Syst Bacteriol* **48**, 1187-1196.
- McGenity, T. J., Gemmell, T. N., Grant, W. D. & Stan-Lotter, H. (2000). Origins of halophilic microorganisms in ancient salt deposits. *Environ Microbiol* **2**, 243-250.
- McGenity, T. J. & Grant, W. D. (2001). Genre VII. *Halorubrum*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume. 1. pp. 320-324. Eds. D. R. Boone, R. W. Castenholz & G. M. Garrity. New York: Springer.
- Mellado, E., Moore, E. R. B., Nieto, J. J. & Ventosa, A. (1996). Analysis of 16S rRNA gene sequences of *Vibrio costicola* gen. nov., comb nov. *Int J Syst Bacteriol* **46**, 817-821.

- Mescher, M. F. & Strominger, J. L. (1976). Purification and characterization of a procaryotic glycoprotein from cell envelope of *Halobacterium salinarum*. *J Biol Chem* **251**, 2005-2010.
- Meseguer, I. & Rodriguez-Valera, F. (1985). Production and purification of halocin H4. *FEMS Microbiol Lett* **28**, 177-182.
- Mevarech, M., Frolov, F. & Gloss, L. M. (2000). Halophilic enzymes: proteins with a grain of salt. *Biophysical Chemistry* **86**, 155-164.
- Mohr, V. & Larsen, H. L. (1963). On the structural transformations and lysis of *Halobacterium salinarum* in hypotonic and isotonic solutions. *J Gen Microbiol* **31**, 267-280.
- Modoveanu, N. & Kates, M. (1988). Biosynthetic studies of polar lipids of *Halobacterium cutirubrum*: Formation of isoprenyl ether intermediates. *Biochim Biophys Acta* **960**, 162-182.
- Mongodin, E. F., Nelson, K. E., Daugherty, S., Dboy, R. T., Wister, J., Khouri, H., Weidman, J., Walsh, D. A., Papke, R. T., Sanchez Perez, G., Sharma, A. K., Nesbø, C. L., McLeod, D., Bapteste, E., Doolittle, W. D., Charlebois, R. L., Legaut, B. & Rodriguez-Valera, F. (2005). The genome of *Salinibacter ruber*. Convergence and gene exchange among hyperhalophilic bacteria and archaea. *PNAS* **102(50)**, 18174-18152.
- Montalvo-Rodriguez, R., Vreeland, R. H., Oren, A., Kessel, M., Betancourt, C. & López-Garriga, J. (1998). *Halogeometricum borinquense* gen. nov., sp. nov., a novel halophilic archaeon from Puerto Rico. *Int J Syst Bacteriol* **48**, 1305-1312.
- Montalvo-Rodriguez, R., Lopez-Garriga, J., Vreeland, R. H., Oren, A., Ventosa, A. & Kamekura, M. (2000). *Haloterrigena thermotolerans* sp. nov., a halophilic archaeon from Puerto Rico. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 1065-1071.
- Monteoliva-Sanchez, M., Ramos-Cormenzana, A. (1986). Effect of growth temperature on the fatty acid composition of *Flavobacterium halmophilum* CCM 2831. *FEMS Microbiol Lett* **33**, 51-54.
- Monteoliva-Sanchez, M., Ferrer, M. R., Ramos-Cormenzana, A. & Quesada, E. (1988). Cellular fatty acid composition of *Delacya halophila*: effects of growth temperature and salt concentration. *J Gen Microbiol* **134**, 199-203.
- Mormile, M. R., Romine, M. F., Garcia, M. T., Ventosa, A., Bailey, T. J. & Peyton, B. M. (1999). *Halomonas campisalis* sp. nov., a denitrifying, moderately haloalkaliphilic bacterium. *Syst Appl Microbiol* **22**, 551-558.
- Mormile, M. R., Biesen, M. A., Gutiérrez, M. C., Ventosa, A., Paviovich, J. B., Onstott, T. C. & Fredrickson, J. K. (2003). Isolation of *Halobacterium salinarum* retrieved directly from halite brine inclusions. *Environ Microbiol* **5**, 1094-1102.
- Mullakhanbhai, M. F. & Larsen, H. (1975). *Halobacterium volcanii* sp. nov., a Dead Sea halobacterium with moderate salt requirement. *Arch Microbiol* **104**, 207-214.

*N*

- Nakayama, H., Yoshida, K., Ono, H., Murooka, Y. & Shinmyo, A. (2000). Ectoine, the Compatible Solute of *Halomonas elongata*, Confers Hyperosmotic Tolerance in Cultured Tobacco Cells. *Plant Physiology* **122**, 1239-1247.
- Ng, W. V., Kennedy, S. P., Mahairas, G. G., Berquist, B., Pan, M., Shukla, H. D., Lasky, S. R., Baliga, N. S., Thorsson, V., Sbrogna, J., Swartzell, S., Weir, D., Hall, J., Dahl, T. A., Welti, R., Goo, Y. A., Leithauser, B., Keller, K., Cruz, R., Danson, M. J., Hough, D. W., Maddocks, D. G., Jablonski, P. E., Krebs, M. P., Angevine, C. M., Dale, H., Isenbarger, T. A., Peck, R. F., Pohlschroder, M., Spudis, J. L., Jung, K.-H., Alam, M., Freitas, T., Hou, S., Daniels, C. J., Dennis, P. P., Omer, A. D., Ebhardt, H., Lowe, T. M., Liang, P., Riley, M., Hood, L. & DasSarma, S. (2000). Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1. *Proc Natl Acad Sci* **97**, 12176-12181

- Nicolaus, B., Lama, I., Esposito, E., Manca, M. C., Improta, R., Bellitti, M. R., Duckworth, A. W., Grant, W. D. & Gambacorta, A. (1999). *Haloarcula* spp. Able to Biosynthesize Exo-Endopolymers. *J Microbiol Biotechnol* **23**, 489-496.
- Nicolaus, B., Moriello, V. S., Lama, I., Poli, A. & Gambacorta, A. (2004). Polysaccharides from extremophilic microorganisms. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* **34**, 159-169.
- Norton, C. F. & Grant, W. D. (1988). Survival of halobacteria within fluid inclusions in salt crystals. *J Gen Microbiol* **134**, 1365-1373.
- Norton, C. F., McGenity, T. J. & Grant, W. D. (1993). Archaeal halophiles (halobacteria) from two British salt mines. *J Gen Microbiol* **139**, 1077-1081.
- Nuttall, S. D. & Dyll-Smith, M. L. (1993). Ch2, a novel halophilic archaeon from an Australian solar saltern. *Int J Syst Bacteriol* **43**, 729-734.
- O**
- Ochsenreiter, T., Pfeifer, F. & Schleper, C. (2002). Diversity of archaea in hypersaline environments characterized by molecular phylogenetic and cultivation studies. *Extremophiles* **6**, 247-274.
- Oesterhelt, D. & Stoeckenius, W. (1971). Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nature*, **233**, 149-152.
- Oesterhelt, D. (1995). Structure and function of halorhodopsin. *Isr J Chem* **35**, 475-494.
- Okamoto, T., Taguchi, H., Nakamura, K., Ikenaga, H., Kuraishi, H. & Yamasata, K. (1993). *Zymobacter palmae* gen. nov., sp. nov., a new ethanol-fermenting peritrichous bacterium isolated from palm sap. *Arch Microbiol* **160**, 333-337.
- Ollivier, B., Caumette, P., Garcia, J. L. & Mah, R. (1994). Anaerobic bacteria from hypersaline environments. *Microbiol Rev* **58**, 27-38.
- Olsen, G. J., Woese, C. R. & Overbeek, R. (1994). The winds of (evolutionary) change: breathing a new life in the microbiology. *J Bacteriol* **176**, 1-6.
- Olsen, G. J. & Woese, C. R. (1997). Archaeal genomics: an overview. *Cell* **89**, 991-1004.
- Ono, H., Sawada, K., Khunajakr, N., Tao, T., Yamamoto, M., Hiramoto, M., Shinmyo, A., Takano, M. & Murooka, Y. (1999). Characterization of Biosynthetic Enzymes for Ectoine as a Copmpatible Solute in a Moderately Halophilic Eubacterium, *Halomonas elongata*. *J Bacteriol* **181**, 91-99.
- Oren, A. (1983a). A thermophilic amyloglucosidase from *Halobacterium sodomense*, a halophilic bacterium from the Dead Sea. *Current Microbiology* **8**, 225-230.
- Oren, A. (1983b). *Halobacterium sodomense* sp. nov., a Dead Sea *Halobacterium* with an extremely High Magnesium Requirement. *Int J Syst Bacteriol* **33**, 381-386.
- Oren A., Paster, B. J. & Woese, C; R. (1984). *Haloanaerobiaceae*: a new family of moderately halophilic obligately anaerobic bacteria. *Syst Appl Microbiol* **5**, 71-80.
- Oren, A. (1990). Estimation of the contribution of halobacteria to the bacterial biomass and activity in solar saltens by the use of bile salts. *FEMS Microbiol Ecol* **73**, 41-48.
- Oren, A. (1994). The ecology of the extremely halophilic archaea. *FEMS Microbiol rev* **13**, 415-440.
- Oren, A., Gurevich, P, Gemmell, R. T. & Teske, A. (1995). *Halobaculum gomorrense* gen. nov., sp. nov., a novel extremely halophilic archaeon from the Dead Sea. *Int J Syst Bacteriol* **45**, 747-754.
- Oren, A., Duker, S. & Ritter, S. (1996). The polar lipids composition of Walsby's square bacterium. *FEMS Microbiol Lett* **138**, 135-140.
- Oren, A., Ventosa, A. & Grant, W. D. (1997). Proposed Minimal Standards for Description of New Taxa in the Order Halobacteriales. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 233-238.
- Oren, A. (1999a). Bioenergetic aspect of halophilism. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 334-348.

- Oren, A. (1999b).** Microbiology and Biogeochemistry of Halophilic Microorganisms. In *Microbiology and Biogeochemistry of Hypersaline Environments*. Ed. A. Oren. pp. 1-9. CRC Press, Boca Raton London New York Washington, DC.
- Oren, A. & Litchfield, C. D. (1999).** A procedure for the enrichment and isolation of *Halobacterium*. *FEMS Microbiology Letters* **173**, 353-358.
- Oren, A., Ventosa, A., Gutiérrez, M. C. & Kamekura, M. (1999).** *Haloarcula quadrata* sp. nov., a square, motile archaeon isolated from a brine pool in Sinai (Egypt). *Int J Syst Evol Microbiol* **49**, 1149-1155.
- Oren, A. (2001).** The bioenergetic basis for the decrease in metabolic diversity at increasing salt concentrations: implications for the functioning of salt lake ecosystems. *Hydrobiologia* **466**, 61-72.
- Oren, A. & Rodriguez-Valera, F. (2001).** The contribution of *Salinibacter ruber* species to the red coloration of saltern crystallizer ponds. *FEMS Microbiol Ecol* **36**, 123-130.
- Oren, A. & Mana, L. (2001).** Amino acid composition of bulk protein and salt relationships of selected enzymes of *Salinibacter ruber*. *Extremophiles* **6**, 217-223.
- Oren, A., Rodriguez-Valera, F. (2001).** The contribution of halophilic Bacteria to the red coloration of saltern crystallizer ponds. *FEMS Microbiol Ecol* **1242**, 1-8.
- Oren, A., Heldel, M., Norland, S. & Galinski, E. A. (2002a).** Intracellular ion and organic solute concentrations of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *Extremophiles* **6**, 491-498.
- Oren, A., Elevi, R., Watanabe, S., Ihara, K. & Corcelli, A. (2002b).** *Halomicrobium mukohataei* gen. nov., and description of *Halomicrobium mukohataei*. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1831-1835.
- Oren, A. (2002a).** Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *J Ind Microbiol Botechnol* **28**, 56-63.
- Oren, A. (2002b).** Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria. *FEMS Microbiol* **39**, 1-7.
- Oren, A. (2002c).** Unexpected diversity of heterotrophic prokaryotes living at the highest salt concentrations. *Proceeding of the Second European Workshop on Exo/Astrobiology, Gras, Austria*, 16-19 September, 201-204.
- Oren, A. & Mana, L. (2003).** Sugar metabolism in the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *FEMS Microbiol Lett* **223**, 83-87.
- Oren, A., Rodriguez-valera, F., Antón, J., Benlloch, S., Rosselló-Mora, R., Amann, R., Goleman, J. Russell, N. (2004).** Red, Extremely halophilic, but not Archaeal: The physiology and Ecology of *Salinibacter ruber*, a Bacterium Isolated from Saltern Crystallizer Ponds. In *Halophilic Microorganisms*. Ed. A. Ventosa. pp. 63-76. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Oren, A. Pri-El, N., Shapiro, O. & Siboni, N. (2006).** Buoyancy studies in natural communities of square gas-vacuolate archaea in saltern crystallizer ponds. *Saline Systems* **2**, 1-8.
- Owen, R. J. & Hill, L. R. (1979).** The estimation of base compositions, base pairing and genome size of bacterial deoxyribonucleic acids. In *Identification Methods for Microbiologists*. Eds. F. A. Skinner & D. W. Lovelock. pp. 277-296. London: Academic Press.
- Papageorgion, G. C. & Murata, N. (1995).** Unusual strong stabilization effects of glycine betaine on the structure and function of the oxygen-evolving photosystem II complex. *Photosynth Res* **44**, 243-252.

- Pasié, L., Bartual, S. G., Ulrih, N. P., Grabnar, M. & Velikonja, B. H. (2005).** Diversity of halophilic archaea in the crystallizers of an Adriatic solar saltern. *FEMS Microbiol Ecol* **54**, 491-498.
- Pelmont, P. (1995).** Bactéries et Environnement : Adaptation physiologique. Volume II. pp. 202-203. Collection Grenoble Sciences.
- Pereira, S. L., Grayling, R. A., Lurz, R. & Reeve, J. N. (1997).** Archaeal nucleosome. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 1263-12637.
- Perry, J. J., Staley, J. T. & Lory, S. (2002).** Microbiologie. Dunod .p. 892.
- Petter, H. F. M. (1931).** On bacteria of salted fish. *Proc K Ned Akad Wet Amsterdam*, 1417-1423.
- Peters, P., Galinski, E. A. & Trüper, H. G. (1990).** The biosynthesis of ectoine. *FEMS Microbiol Lett* **71**, 157-162.
- Pfeifer, F. (1988).** Genetics of Halobacteria. In *Halophilic Bacteria*. Ed. F. Rodriguez-Valera. pp. 106-130. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Platas, G., Meseguer, I. & Amils, R. (1996).** Optimisation of the production of a bacteriocin from *Haloferax mediterranei* XIA3. *Microbiologia SEM* **12**, 75-84.
- Pohlschroder, M., Prinz, W. A., Hartmann, E. & Beckwith, J. (1997).** Protein translocation in the three domains of life: variations on a theme. *Cell* **91**, 563-566.
- Poli, A., Esposito, E., Orlando, P., Lama, L., Giordano, A., de Apollonia, F., Nicolaus, B. & Gambarcota, A. (2007).** *Halomonas alkaliantarctica* sp. nov., isolated from saline lake Cape Russel in Antarctica, an alkaliphilic moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium. *Syst Appl Microbiol* **30**, 31-38.
- Post, F. J. (1977).** Microbial Ecology of the Great Salt Lake. *Microb Ecol* **3**, 143-165.
- Prado, B., Del Moral, A., Quesada, E., Rios, R., Monteoliva-Sanchez, M., Campos, V. & Ramos-Cormenzana, A. (1991).** Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative rods isolated from the Salar de Atacama, Chile. *Syst Appl Microbiol* **14**, 275-281.
- Price, L. B. & Shand, R. F. (2000).** Halocin S8 a 36-amino-acid microhalocin from the Haloarchaeal strain S8a. *J Bacteriol* **182**, 4951-4958.
- Prinz, W. A., Hartmann, E. & Beckwith, J. (1997).** Protein translocation in the three domains of life: variations on a theme. *Cell* **91**, 563-566.

## Q

- Quesada, E., Bejar, V., Valderrama, M. J. & Ramos-Cormenzana, A. (1987).** Growth characteristics and salt requirement of *Delaya halophila* in a defined medium. *Curr Microbiol* **16**, 21-25.
- Quesada, E., Valderrama, M. J., Bejar, V., Ventosa, A., Gutierrez, M. C., Ruiz-Berraquero & Ramos-Cormenzana, A. (1990).** *Halomonas eurihalina* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic nonmotile gram-negative rod. *Int J Syst Bacteriol* **40**, 261-267.
- Quillaguamán, J., Hatti-Kaul, R., Mattiasson, B., Alvarez, M. A. & Delgado, O. (2004).** *Halomonas boliviensis* sp. nov., an alkalitolerant, moderate halophile isolated from soil around a Bolivian hypersaline lake. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 721-725.

## R

- Rawal, N., Kelkar, S. M. & Altekar, W. (1988).** Alternative routes of carbohydrate metabolism in halophilic archaeobacteria. *Indian J Biochim Biophys* **25**, 674-686.
- Reddy, G. S. N., Raghvan, P. U. M., Sarita, N. B., Prakash, J. S. S., Nagesh, N., Delille, D. & Shivaji, S. (2003).** *Halomonas glaciei* sp. nov. Isolated from fast ice of Adelie Land, Antarctica. *Extremophiles* **7**, 55-61.
- Reistad, R. (1972).** Cell wall of an extremely halophilic coccus: Investigation of ninhydrine positive compounds. *Arch Microbiol* **82**, 24-30.

- Reistad, R. (1974).** 2-Amino-2-deoxyglucuronic acid: a constituent of the cell wall of *Halococcus* sp., strain 24. *Carbohyd Res* **36**, 420-425.
- Rainey, F., Zhilina, T., Buligyna, E., Stackebrandt, E., Tourova, T. & Zavarzin, G. (1995).** The taxonomic statut of the fermentative halophilic anaerobic bacteria. *Anaerobe* **1**, 185-189.
- Rodriguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F. & Ramos-Cormenzana, A. (1980).** Isolation of Extremely Halophilic Bacteria Able to Grow in Defined Media with Single Caron Sources. *J Gen Microbiol* **119**, 535-538.
- Rodriguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F. & Ramos-Cormenzana, A. (1981).** Characteristics of the heterotrophic bacteria populations in hypersaline environments of differing salinities. *Microbiol Ecol* **7**, 335-243.
- Rodriguez-Valera, F., Juez, G. & Kushner, D. J. (1982).** Halocins: Salt-dependant bacteriocins produced by extremely halophilic rods. *Can J Microbiol* **28**, 151-154.
- Rodriguez-Valera, F., Juez, G. & Kushner, D. J. (1983).** *Halobacterium mediterranei* sp. nov., a new carbohydrate-utilizing extreme halophile. *Syst Appl Microbiol* **4**, 369-381.
- Rodriguez-Valera, F., Ventosa, A., Juez, G. & Imhoff, J. F. (1985).** Variation of environmental features and microbial populations with salt concentrations in a multi-ponds saltern. *Microb Ecol* **11**, 107-115.
- Rodriguez-Valera, F. & Lillo, J. G. (1992).** Halobacteria as producers of polyhydroxyalkanoates. *FEMS Microbiology Rev* **103**, 181-186.
- Rodriguez-Valera, F. (1993).** Introduction to Saline Environments. In *The Biology of Halophilic Bacteria*. Eds. R. H. Vreeland & L. I. Hochstein. pp.1-23. CRC Press Inc, Boca Raton.
- Rodriguez-Valera, F., Acinas, S. G. & Antøn, A. (1999).** Contribution of Molecular Techniques to the Study of Microbial Diversity in Hypersaline Environments. In *Microbiology and Biogeochemistry of Hypersaline Environments*. Ed. A. Oren. pp. 27-36. CRC Press, Boca Raton. London, New York, Washington D. C.
- Rodriguez-Valera, F. (2002).** Approaches to prokaryotic biodiversity: a population genetics perspective. *Environ Microbiol* **4**, 628-633.
- Romanenko, A. L., Schumann, P., Rohde M., Zhukova, N. V., Mikhailov, V. V. & Stackebrandt, E. (2002).** *Halomonas halocynthiae* sp. nov., isolated from the marine ascidian *Halocynthia aurantum*. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1767-1772.
- Romanenko, A. L., Schumann, P., Rohde M., Zhukova, N. V., Mikhailov, V. V. & Stackebrandt, E. (2005).** *Marinobacter bryozorum* sp. nov. and *Marinobacter sediminum* sp. nov., novel bacteria from the marine environment. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 143-148.
- Romano, I., Nicolaus, B., Lama, L., Manca, C. & Gambacorta, A. (1996).** Characterieation of haloalkalophilic strictly aerobic bacterium, isolated from Pantelleria island. *Syst Appl Microbiol* **19**, 326-333.
- Rose, R. W., Brüser, T., Kissinger, J. C. & Pohlschröder, M. (2002).** Adaptation of protein secretion to extremely high-salt conditions by extensive use of the twin-arginine translocation pathway. *Mol Microbiol* **45**, 943-950.
- Ross, H. N. M. & Grant, W. D. (1985).** Lipids in Archaeobacterial Taxonomy. In *Chemical Methods in Bacterial Systematics*. Eds. M. Goodfellow & D. E. Minnikin. pp. 289-300. Academic Press..
- Rosselló-Mora, R. & Amann, R. (2001).** The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* **25**, 39-67.
- Ruepp, A. & Soppa, J. (1996).** Fermentative Arginine Degradation in *Halobacterium salinarum* (formerly *Halobacterium halobium*): Genes, Gene products, and Transcripts of the arcRACB cluster. *J Bacteriol* **178**, 4942-4947.

**Russel, N. J. (1989).** Adaptative modifications in membrane of halotolerant and halophilic microorganisms. *J Bioenergetics and Biomembranes* **21**, 93-113.

**Russel, N. J. (1993).** Lipids of halophilic and halotolerant microorganisms. In *The Biology of Halophilic Bacteria*. Eds. R. H. Vreeland & L. I. Hochstein. pp. 163-210. CRC Press, Boca Raton.

**Ryu, K., Kim, J. & Dordick, J. S. (1994).** Catalytic properties and potential of an extracellular protease from an extreme halophile. *Enzyme Microbiol Technol* **16**, 266-275.

## S

**Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.

**Saitou, N. & Nei, M. (1987).** The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **63**, 406-425.

**Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 5463-5467.

**Savage, K. N., Krumholz, L. R., Oren, A. & Elshahed, M. S. (2007).** *Haladaptatus paucihalophilus* gen. nov., sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a low-salt silfide-rich spring. *Int J Syst evol Microbiol* **57**, 19-24.

**Schäfer, G. (1992).** Extremophiles: fascinating organisms with surprising capabilities. *J Bioenerg Bioinform* **24**, 525-527.

**Schäfer, G., Engelhard, M & Müller, V. (1999).** Bioenergetic of the Archaea. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 570-620.

**Schatz, G. & Dobberstein, B. (1996).** Common principles of protein translocation across membranes. *Science* **271**, 1519-1526.

**Shieh, W. Y., Jean, W. D., Lin, Y.-T., Tseng, M. (2003).** *Marinobacter lutaoensis* sp. nov., a thermotolerant marine bacterium isolated from a coastal hot spring in Lutao, Taiwan. *Can J Microbiol* **49**, 244-252.

**Schimz, A. & Hildebrand, E. (1979).** Chemosensory responses of *Halobacterium halobium*. *J Bacteriol* **140**, 749-753.

**Schleper, C. (1999).** Les Archéobactéries sont parmi nous. *La Recherche* **917**, 30-33.

**Sleytr, U. B. & Glauert, A. M. (1982).** Bacterial cell walls and membranes. In *Electron Microscopy of Proteins*. Ed. J. R. Harris. Volume 3. pp. 41-47.

**Smibert, R. M. & Krieg, N. R. (1981).** General Characterization. In *Manual of Methods for General Bacteriology*. Eds. P. Gerhardt, R. G. E. Murray, R. N. Costilow, E. D. Nester, W. A. Wood, N. R. Krieg & G. B Phillips. pp. 409-443. Washington DC: American Society for Microbiology.

**Soliman, G. S. H. & Trüper, H. G. (1982).** *Halobacterium pharaonis* sp. nov., a new extremely halophilic bacterium with a low magnesium requirement. *Zbl Bakt Hyg, 1. Abt Orig C* **3**, 318-329.

**Soppa, J. (2005).** From replication to cultivation: hot news from Haloarchaea. *Curr Opinion Microbiol* **8**, 737-744.

**Sørensen, K. B., Canfield, D. E. & Oren, A. (2004).** Salinity Responses of Benthic Microbial Communities in a Solar Saltern (Eilat, Israel). *Appl Environ Microbiol* **70**, 1608-1616.

**Sorokin, D. Y. & Kuenen, J. G. (2005).** Haloalkaliphilic sulphur-oxidizing bacteria in soda lake. *FEMS Microbiol Rev* **29**, 685-702.

**Sorokin, D. Y., Tourove, T. P., Galinski, E. A. Belloch, C. & Tindall, B. J. (2006).** 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 *H. variabilis* should be associated with DSM 3050. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 379-388.
- Spring, S., Ludwig, W., Marquez, M. C., Ventosa, A. & Schleifer, K.-H. (1996).** *Halobacillus* gen. nov., with descriptions of *Halobacillus litoralis* sp. nov. and *Halobacillus trueperi* sp. nov., and transfert of *Sporosarcina halophila* to *Halobacillus halophilus* comb. nov. *Int J Syst bacterial* **46**, 492-496.
- Spudish, J. L. (1993).** Color sensing in the archaea: a eukaryotic-like receptor coupled to a prokaryotic transducer. *J Bacteriol* **175**, 7755-7761.
- Stackebrandt, E. & Lisak, W. (1993).** Nucleic acids and classification. In *Handbook of new bacterial systematics*. Ed. M Goodfellow & A. G. O'Donnel. pp. 151-194. Academic Press, Toronto.
- Stackebrandt, E., Goebel, B. M. (1994).** Taxonomic note: a palce for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* **44**, 846-949.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P. A. D., Kämpfer, P., Maiden, M. C. J., Nesme, X., Rosselló-Mora, R., Swings, J., Trüper, H. G., Vauterin, L., Ward, A. C. & Whitman, W. B. (2002).** Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1043-1047.
- Stan-Lotter, H., Sulzner, M., Egelseer, E., Norton, C. F. & Hochstein, L. I. (1993).** Comparison of membrane ATPases from extreme halophiles isolated from ancient salt deposits. *Origin of Life Evol Biosphere* **23**, 53-64.
- Stan-Lotter, H., McGenity, T. J., Legat, A., Denner, E.B. M., Glaser, K., Stetter, K. O. & Wanner, G. (1999).** Very similar strains of *Halococcus salifodinae* are found in geographically separated Permo-Triassic salt deposits. *Microbiol* **145**, 3565-3574.
- Stan-Lotter, H., Radax, C., Gruber, C., McGenity, T. J., Legat, A., Wanner, G. & Denner, E. B. M. (2000).** The distribution of viable microorganisms in Permio-Triassic rock salt. In *SALT 2000. 8<sup>th</sup> World Salt Symposium*. Ed. R. M. Geertman. Volume 2. pp. 921-926. Amsterdam: Elsevier Science.
- Stan -Lotter, H., Radax, C., Gruber, C., Legat, A., Ptaffenuemer, M. & Wieland, H. (2001).** Viable halobacteria from Permo-Triassic salt deposits and the possibility of extraterrestrial microbial life. *Exo/Astrobiology, Proceeding of the First European Workshop*, pp. 25-31. ESA Special Publication SP 496.
- Stan-Lotter, H., Ptaffenuemer, M., Legat, A., Busse, H.-J., Radax, C. & Gruber C. (2002).** *Halococcus dombrowskii* sp. nov., an archaeal isolate from a Permian alpine salt deposit. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1807-1814.
- Steber, J. & Schliefer, K. H. (1975).** *Halococcus morrhuae*: a sulphated heteropolyschcharide as the structural component of the bacterial cell wall. *Arch Microbiol* **105**, 173-180.
- Stoeckenius, W. & Rowen, R. (1967).** A morphological study of *Halobacterium halobium* and its lysis in media of low salt concentration. *The Journal of Cell Biology* **148**, 352-360.
- Stoeckenius, W. (1981).** Walsby's square bacterium: fine structure of an orthogonal prokaryote. *J Bacteriol* **148**, 352-360.
- Stoeckenius, W. & Bogomolni, R. A. (1982).** Bacteriorhodopsin and related pigments of halobacteria. *Annu Rev Biochem* **52**, 587-616.
- Suggs, S. V., Hirose, T., Miyake, E. H., Kawashima, E. H., Johnson, M. J., Itakura, K. & Wallace, R. B. (1981).** Use of synthetic oligodeoxynucleotides for the isolation of specific cloned DNA sequences. In *Developmental Biology Using Purified Genes*. Eds. D. Brown & C. F. Fox. pp. 638-693. New York, USA: Academic Press.
- Suzuki, K., Goodfellow, M. & O'Donnell, A. G. (1993).** Cell envelopes and classification. In *Handbook of New Bacterial Systematics*. Eds. M. Goodfellow & A. G. O'Donnell. pp. 195-250. Academic Press, Toronto.

## 7

- Tardy-Jacquenod C., Magot, M., Patel, B., Matherson, R. & Caumette, P. (1998).** *Desulfotomaculum halophilum* sp. nov., a halophilic sulfate-reducing bacterium isolated from oil production facilities. *Int J Syst Bacteriol* (sous presse).
- Tawara, E. & Kamo, N. (1991).** Glucose transport of *Haloferax volcanii* requires the Na<sup>+</sup> electrochemical potential gradient and inhibitors for the mammalian glucose transporteur inhibit the transport. *Biochim Biophys Acta* **1070**, 293-299.
- Tebbe, A., Klein, C., Bisle, B., Siedler, F., Scheffer, B., Garcia-Rizo, C., Volfertz, J., Hickmann, V., Pfeifer, F. & Oesterhelt, D. (2005).** Analysis of the cytosolic proteome of *Halobacterium salinarum* and its implication for genome annotation. *Proteomic* **5**, 168-179.
- Tindall, B. J., Ross, H. N. M. & Grant, W. D. (1984).** *Natronobacterium* gen. nov. and *Natronococcus* gen. nov., two new genera of haloalkaliphilic archaeobacteria. *Syst Appl Microbiol* **5**, 41-54.
- Tindall, B. J. & Trüper, H. G. (1986).** Ecophysiology of the Aero Halophilic Archaeobacteria. *Syst Appl Microbiol* **7**, 202-212.
- Tindall, B. J., Tomlinson, G. A. & Hochstein, L. I. (1987).** Polar lipid composition of a new *Halobacterium*. *Syst Appl Microbiol* **9**, 6-8.
- Tindall, B. J. (1992).** The family *Halobacteriaceae*. In *The Prokaryotes*. Eds. A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K. H. Schleifer. pp. 768-808. Springer, New York, N. Y.
- Tokuda, H. & Unemoto, T. (1983).** Growth of a marine *Vibrio alginolyticus* and moderately halophilic *V. costicola* becomes uncoupler resistant when the respiration-dependent Na<sup>+</sup> pump functions. *J Bacteriol* **156**, 636-643.
- Thomas, C. P., Duvall, M. L., Robertson, E. P., Barrett, K. B. & Bala, G. A. (1993).** Surfactant-based EOR mediated by naturally occurring microorganisms. *Soc Petrol Eng Reservoir Eng* **11**, 285-291.
- Thomas, N. A., Bardy, S. L. & Jarrel, K. F. (2001a).** The archaeal flagellum: a different kind of prokaryotic motility structure. *FEMS Microbiol Rev* **25**, 147-174.
- Thomas, N. A., Faguy, D. M. & Jarrell, K. F. (2001b).** Archaeal Chromosome. *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing, 1-9
- Tomlinson, G. A. & Hochstein, L. I. (1972).** Studies on acid production during carbohydrate metabolism by extremely halophilic bacteria. *Can J Microbiol* **18**, 1973-1976.
- Tomlinson, G. A., Koch, K. & Hochstein, L. I. (1974).** The metabolism of carbohydrates by extremely halophilic bacteria: glucose metabolism via a modified Entner-Doudoroff pathway. *Can J Microbiol* **20**, 1085-1091.
- Tomlinson, G. A. & Hochstein, L. I. (1976).** *Halobacterium saccharovororum* sp. nov., a carbohydrate – metabolising, extremely halophilic bacterium. *Can J Microbiol* **22**, 587-591.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994).** Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res* **22**, 4673-4680.
- Torreblanca, M., Rodriguez-Valera, F., Juez, G., Ventosa, A., Kamekura, M & Kates, M. (1986).** Classification of non-alkaliphilic Halobacteria based on numerical taxonomy and polar lipid composition and description of *Haloarcula* gen. nov. and *Haloferax* gen. nov. *Syst Appl Microbiol* **8**, 89-99.
- Torreblanca, M., Meseguer, I. & Rodriguez-Valera, F. (1989).** Halocin H6, a bacteriocin from *Haloferax gibbonsii*. *J Gen Microbiol*. **135**, 2655-2661.
- Torreblanca, M., Meseguer, I. & Ventosa, A. (1991).** Production of halocin is patically universal feature of archaeal halophilic rods. *Lett Appl Microbiol* **19**, 201-205.

## V

- Valderrama, M. J., Quesada, E., Bejar, V., Ventosa, A., Gutierrez, F., Ruiz-Berraquero, F. & Ramos-Cormenzana, A. (1991). *Delaya salina* sp. nov., a moderately halophilic gram-negative bacterium. *Int Syst J Bacteriol* **41**, 377-384.
- Ventosa, A. (1988). Taxonomy of moderately halophilic heterotrophic eubacteria. In *Halophilic Bacteria*. Ed. F. Rodriguez-Valera. pp. 71-84. CRC Press, Boca Raton Florida.
- Ventosa, A., Gutierrez, C., Garcia, M. T. & Ruiz-Berraquero, F. (1989). Classification of *Chromohalobacter marismortui* in a new genus, *Chromohalobacter* gen. nov., as *Chromohalobacter marismortui* comb. nov., nom. rev. *Int J Syst Bacteriol* **39**, 382-386.
- Ventosa, A., Marquez, M. C., Ruiz-Berraquero, F. & Kocur, M. (1990). *Salinicoccus reseus* gen. nov., sp. nov., a new medrately halophilic Gram-positive coccus. *Syst Appl Microbiol* **13**, 29-33.
- Ventosa, A., Marquez, M. C., Weiss, N. & Tindall, B. J. (1992). Transfer of *Marinococcus hispanicus* to the genus *Salinicoccus* as *Salinicoccus hispanicus* comb. nov. *Syst Appl Microbiol* **15**, 29-33.
- Ventosa, A. & Nieto, J. J. (1995). Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. *World J Microbiol Biotechnol* **11**, 85-94.
- Ventosa, A., Nieto, J. J. & Oren, A. (1998). Biology of aerobic moderately halophilic bacteria. *Microbial Mol Biol Rev* **62**, 504-54.
- Ventosa, A., Gutierrez, M. C., Kamekura, M. & Dyal-Smith, M/ L. (1999). Proposal to transfer *Halococcus turkmenicus*, *Halobacterium trapanicum* JCM 9743 and strain GSL-11 to *Haloterrigena turkmenica* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **49**, 131-136.
- Ventosa, A., Gutiérrez, M. C., Kamekura, M., Zvyagintseva, I., S. & Oren, A. (2004). Taxonomic study of *Halorubrum distributum* and proposal of *Halorubrum terrestre* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 389-392.
- Verhees, C. H., Kengen, S. W. M., Tuininga, J. E., Schut, G. J. & Adams M. W. W. (2003). The unique features of glycolytic pathways in Archaea. *Biochem J* **375**, 231-246.
- Visentin, L. P., Chow, C. & Matheson, A. T. (1972). Properties of the Ribosomal Proteins and Ribonucleic Acid. *J Biochem* **130**, 103-110.
- Vreeland, R. H., Litchfield, C. D., Martin, E. L. & Elliot, E. (1980). *Halomonas elongata*, a new genus and species of extremely salt-tolerant bacteria. *Int J Syst Bacteriol* **30**, 485-495.
- Vreeland, R. H., Mierau, B. D., Litchfield, C. D. & Martin, E. L. (1983). Relationship of the internal solute composition to the salt tolerance of *Halomonas elongata*. *Can J Microbiol* **29**, 407-414.
- Vreeland, R. H., Anderson, R. & Murray, R. G. E. (1984). Cell wall and phospholipid composition and their contribution to the salt tolerance of *Halomonas elongata*. *J Bacteriol* **160**, 879-883.
- Vreeland, R. H., Rosenzweig, W. D. & Powers, D. W. (2000). Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature* **407**, 897-900.
- Vreeland, R. H., Straight, S., Krammes, J., Dougherty, K., Rosenzweig, W. D. & Kamekura, M. (2002). *Halosimplex carlsbadense* gen. nov., a unique halophilic archaeon, with three 16S rRNA genes, that grows only in defined medium with glycerol and acetate or pyruvate. *Extremophiles* **6**, 445-452.

## W

- Wainø, M., Tindall, B. J., Schumann, P & Ingvorsen, K. (1998). *Gracilibacillus* gen. nov., with description of *Gracilibacillus halotolerans* gen. nov., sp. nov., transfer of *Bacillus dipososauri* comb. nov., and *Bacillus salexigens* ro the genus *Salibacillus* gen. nov.n as *Salibacillus salexigens* comb. nov. *Int I Syst Microbiol* **49**, 821-831.

- Wainø, M., Tindall, B. J. & Ingvorsen, K. (2000).** *Halorhabdus utahensis* gen. nov., an aerobic extremely halophilic member of the Archaea from Great Salt Lake, Utah. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 183-190.
- Walsby, A. E. (1980).** A square bacterium. *Nature* **283**, 69-71.
- Wanner, C. & Soppa, J. (1999).** Genetic identification of three ABC transporters as essential elements for nitrate respiration in *Haloferax volcanii*. *Genetics* **152**, 1417-1428.
- Ward, D. M. Brock, T. D. (1978).** Hydrocarbon biodegradation in hypersaline environments. *Appl Environ Microbiol* **35**, 353-359.
- Welsh, D., Lindsay, Y., Caumette, P., Herbert, R. & Hannan, J. (1996).** Identification of trehalose and glycine betaine as compatible solutes in the moderately halophilic sulphate reducing bacterium, *Desulfovibrio halophilus*. *FEMS Microbiol Lett* **140**, 203-207.
- Welsh, D. T. (2000).** Ecological significance of compatible solute accumulation by microorganisms from single cells to global climate. *FEMS Microbiol Rev* **24**, 263-290.
- Werber, M. M. (1980).** Halophilisme. *Biochimie* **62**, 411-422.
- Wieland, F. Paul, G. & Sumper, M. (1985).** Halobacterial flagellins are sulphated glycoproteins. *J Biol Chem* **260**, 15180-15185.
- Wieland, F. (1988).** The cell surfaces of halobacteria. In *Halophilic Bacteria*, Ed. F. Rodriguez-Valera. pp. 55-65. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Winkler, S. & Woese, C. R. (1991).** A definition of the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya in terms of small subunit ribosomal RNA characteristics. *Syst Appl Microbiol* **14**, 305-310.
- Whitman, W. B., Boone, D. R., Koga, Y. & Keswani, J. (2001).** Taxonomy of methanogenic archaea. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Eds. D. R. Boone, R. W. Castenholz & G. M. Garrity. Volume 1. pp. 211-213. New York: Springer.
- Woese, C. R. & Fox, G. E. (1977).** The concept of Cellular Evolution. *J Mol Evol* **10**, 1-6.
- Woese, C. R. (1987).** Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**, 221-271.
- Woese, C. R., Kandler, O. & Wheelis, M. L. (1990).** Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 4576-4579.
- Wright, A.-D. (2006).** Phylogenetic relationships within the order *Halobacteriales* inferred from 16S rRNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 1223-1227.
- Wu, L. C., Chow, K. C. & Mark, K. K. (1983).** The role of pigments in *Halobacterium cutirubrum* against UV radiation. *Microbios Letters* **24**, 85-90.

## X

- Xin, H., Itoh, T., Zhou, P., Suzuki, K.-I., Kamekura, M. & Nakase, T. (2000).** *Natrinema versiforme* sp. nov., an extremely halophilic archaeon from Aibi salt lake, Xinjiang, China. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 1297-1303.
- Xu, Y., Zhou, P. & Tian, X. (1999).** Characterization of two novel haloalkaliphilic archaea *Natronobacterium bangense* gen. nov., sp. nov. and *Natronobacterium tibetense* gen. nov., sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **49**, 261-266.
- Xu, Y., Wang, Z., Xue, Y., Zhou, P., Ma, Y., Ventosa, A. & Grant, W. D. (2001).** *Natrialba hulunbeirensis* sp. nov. and *Natrialba chahannaoensis* sp. nov., novel haloalkaliphilic archaea from soda lakes in Inner Mongolia Autonomous Region, China. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 1693-1698.
- Xu, Y., Ren, P.-G., Liu, S.-J., Wu, M. & Zhou, P.-J. (2004).** *Natrinema altunense* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a salt lake in Aitun Mountain of Xinjiang, China. *Int J Syst Evol Microbiol* (sous presse).

Xue, Y., Fan, H., Ventosa, A., Grant, W. D., Jones, B. E., Cowan, D. A. & Ma, Y. (2005). *Halalkalicoccus tibetensis* gen. nov, sp., nov., representing a novel genus of haloalkaliphilic archaea. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 2501-2505.

## Y

Yakimov, M. M., Golyshin, P. N., Lang, S., Moore, E. R. B., Abraham, W.-R., Lunsdorf, H. & Timmis, K. N. (1998). *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. *Int J Syst Bacteriol* **48**, 339-348.

Yoon, J.-H., Choi, S. H., Lee, K.-C., Kho, Y. H., Kang, K. H. & Park, Y.-H. (2001). *Halomonas marisflavae* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from the Yellow Sea in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 1171-1177.

Yoon, J.-H., Kim, I.-G., Shin, D.-Y., Kang, K. H. & Prk, Y.-H. (2003a). *Microbulbifer salipaludis* sp. nov., a moderate halophile isolated from a Korean salt marsh. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 53-58.

Yoon, J.-H., Kim, I.-G., Kang, K. H., Oh, T.-K. & Park, Y.-H. (2003a). Transfer of *Pseudomonas elongate* Humm 1946 to the genus *Microbulbifer* as *Microbulbifer elongatus* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1357-1361.

Yoon, J.-H., Kang, H. K., Oh, T.-K. & Park, Y.-H. (2004a). *Halobacillus locisalis* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a marine solar saltern of the Yellow Sea in Korea. *Extremophiles* **8**, 23-28.

Yoon, J.-H., Kim, I.-G., Oh, T.-K. & Park, Y.-H. (2004b). *Microbulbifer maritimus* sp. nov., isolated from an intertidal sediment from the Yellow Sea, Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 1111-1116.

## Z

Zhang, J. (2000). Protein-length distributions for the three domains of life. *Trends Genet* **16**, 107-109.

Zhang, R. & Zhang, C. T. (2003). Multiple replication origins of the archaeon *Halobacterium* species NRC-1. *Biochem Biophys Res Commun* **1**, 728-734;

Ziemke, F., Höfle, M. G., Lalucat, J. & Rosselló-Mora, R. (1998). Reclassification of *Shewanella putrefaciens* Owen's genomic group II as *Shewanella baltica* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **48**, 179-186.

Zimmermann, P. & Pfeifer, F. (2003). Regulation of the expression of gas vesicle genes in *Haloferax mediterranei*: interaction of the two regulatory proteins GvpD and GvpE. *Mol Microbiol*, **49**, 783-794.

Zvyagintseva, I. S. & Tarasov, A. L. (1987). Extreme halophilic bacteria from saline soils. *Mikrobiologiya* **56**, 839-844.

Zvyagintseva, I. S., Belyaev, S. S., Borzenkov, I. A., Kostrikina, N. A., Milekhina, E. I. &

<http://waynesword.palomar.edu/wwstaff.htm>

(Google earth.com)

**Annexe 1 : Tableau 2.** Classification des haloarchaea (Archaea, Euryarchaeota, Halobacteria, *Halobacteriales*, *Halobacteriaceae*).

Genre	Espèce type	Références
<i>Halobacterium</i>	<i>Halobacterium salinarum</i>	(Elazari-Volcani, 1957)
<i>Haloarcula</i>	<i>Haloarcula vallismortis</i>	(Ganzalez <i>et al.</i> , 1978 ; Torreblanca <i>et al.</i> , 1986)
<i>Halobaculum</i>	<i>Halobaculum gomorrense</i>	(Oren <i>et al.</i> , 1995)
<i>Halococcus</i>	<i>Halococcus morrhuae</i>	(Klebahn, 1919 ; Kocur & Hodgkiss, 1973)
<i>Haloferax</i>	<i>Haloferax volcanii</i>	(Mullakhanbhai & Larsen, 1975 ; Torreblanca <i>et al.</i> , 1986)
<i>Halogeometricum</i>	<i>Halogeometricum borinquense</i>	(Montalvo-Rodriguez <i>et al.</i> , 1998)
<i>Halorubrum</i>	<i>Halorubrum saccharovorum</i>	(Tomlinson & Hochstein, 1976 ; McGenity & Grant, 1995)
<i>Haloterrigena</i>	<i>Haloterrigena turkmenica</i>	(Zvyagintseva & Tarasov, 1987; Ventosa <i>et al.</i> , 1999)
<i>Natrialba</i>	<i>Natrialba asiatica</i>	(Kamekura & Dyal-Smith, 1995)
<i>Natrinema</i>	<i>Natrinema pellirubrum</i>	(McGenity <i>et al.</i> , 1998)
<i>Natronobacterium</i>	<i>Natronobacterium gregoryi</i>	(Tindall <i>et al.</i> , 1984)
<i>Natronococcus</i>	<i>Natronococcus occultus</i>	(Tindall <i>et al.</i> , 1984)
<i>Natronomonas</i>	<i>Natronomonas pharaonis</i>	(Soliman & Trüper, 1982 ; Kamekura <i>et al.</i> , 1997)
<i>Natronorubrum</i>	<i>Natronorubrum bangense</i>	(Xu <i>et al.</i> , 1999)
<i>Halomicrobium</i>	<i>Halomicrobium mukohataei</i>	(Oren <i>et al.</i> , 2002b)
<i>Halorhabdus</i>	<i>Halorhabdus uthensis</i>	(Wainø <i>et al.</i> , 2000)
<i>Halosimplex</i>	<i>Halosimplex carlsbadense</i>	(Vreeland <i>et al.</i> , 2002)
<i>Halobiforma</i>	<i>Halobiforma haloterrestis</i>	(Hezayen <i>et al.</i> , 2002)
<i>Halalkalicoccus</i>	<i>Halalkalicoccus tibetensis</i>	(Xue <i>et al.</i> , 2005)
<i>Natronolimnobius</i>	<i>Natronolimnobius baerhuensis</i>	(Itoh <i>et al.</i> , 2005)
<i>Halovivax</i>	<i>Halovivax asiaticus</i>	(Castillo <i>et al.</i> , 2006a)
<i>Halostagnicola</i>	<i>Halostagnicola larsenii</i>	(Castillo <i>et al.</i> , 2006b)
<i>Haladaptatus</i>	<i>Haladaptatus paucihalophilus</i>	(Savage <i>et al.</i> , 2007)

Annexe2 : Tableau 4. Bactéries halophiles associées aux environnements hypersalins.

Affiliation	Espèces	Références	Sources
Proteobacteria α-Proteobacteria Rhodobacterales Rhodobacteraceae	<i>Saligiper mucescens</i>	(Martinez-Cánovas <i>et al.</i> , 2004a)	Sol salé
	<i>Palleronia marismortui</i>	(Martinez-Checa <i>et al.</i> , 2005)	Sol salé
	<i>Antarctobacter heliothermus</i>	(Labrenz <i>et al.</i> , 1998)	Lac hypersalé Ekho (Antarctique)
γ-Proteobacteria	<i>Halovibrio denitrificans</i> *	(Sorokin <i>et al.</i> , 2006)	Lac salé (Sibérie)
	<i>Halospina denitrificans</i> *	(Sorokin <i>et al.</i> , 2006)	Lac salé (Sibérie)
	<i>Salicola marasensis</i> *	(Maturrano <i>et al.</i> , 2006b)	Salines (Pérou)
Oceanospirillales Alcanivoraceae	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	(Yakimov <i>et al.</i> , 1998)	Eau marines
Halomonadaceae	<i>Halomonas elongata</i>	(Vreeland <i>et al.</i> , 1980)	Salines (Espagne)
	<i>Halomonas subglaciescola</i>	(Franzmann <i>et al.</i> , 1987)	Lac hypersalé (Antarctique)
	<i>Halomonas meridiana</i>	(James <i>et al.</i> , 1990)	Lac hypersalé (Antarctique)
	<i>Halomonas halodurans</i>	(Hebert & Vreeland, 1987)	Estuaire
	<i>Halomonas halmophila</i>	(Dobson <i>et al.</i> , 1990)	Mer Morte
	<i>Halomonas eurihalina</i>	(Quesada <i>et al.</i> , 1990)	Salines (Espagne)
	<i>Halomonas salina</i>	(Valderrama <i>et al.</i> , 1991)	Salines (Espagne)
	<i>Halomonas halodenitrificans</i>	(Dobson & Franzmann, 1996)	Salines
	<i>Halomonas pantelleriensis</i>	(Romano <i>et al.</i> , 1996)	Lac natroné (Kenya)
	<i>Halomonas desiredata</i>	(Berendes <i>et al.</i> , 1996)	Lac hypersalé (Antarctique)
	<i>Halomonas campisalis</i>	(Mormile <i>et al.</i> , 1999)	Lac natroné (Washington)
	<i>Halomonas maura</i>	(Bouchotroch <i>et al.</i> , 2001)	Salines (Maroc)
	<i>Halomonas magadii</i>	(Duckworth <i>et al.</i> , 2000)	Lac natroné, Magadi (Kenya)
	<i>Halomonas marisflavae</i>	(Yoon <i>et al.</i> , 2001)	Eau marine
	<i>Halomonas glaciei</i>	(Reddy <i>et al.</i> , 2003)	Lac hypersalé (Antarctique)
	<i>Halomonas halocynthiae</i>	(Romanenko <i>et al.</i> , 2002)	Eau marines
	<i>Halomonas ventosae</i>	(Martinez-Cánovas <i>et al.</i> , 2004b)	Sol salé (Jaèn, Espagne)
	<i>Halomonas anticariensis</i>	(Martinez-Cánovas <i>et al.</i> , 2004d)	Sol salé (Málaga, Espagne)
	<i>Halomonas neptunia</i>	(Kaye <i>et al.</i> , 2004)	Sources chaudes océanique
	<i>Halomonas sulfidaeris</i>	(Kaye <i>et al.</i> , 2004)	Sol salé (Bolivie)
<i>Halomonas axialensis</i>	(Kaye <i>et al.</i> , 2004)	Mer Morte	
<i>Halomonas hydrothermalis</i>	(Kaye <i>et al.</i> , 2004)	Salines	
<i>Halomonas boliviensis</i>	(Quillaguamán <i>et al.</i> , 2004)	Mer Morte	
<i>Chromohalobacter marismortui</i>	(Ventosa <i>et al.</i> , 1989)	Eaux marines (Espagne)	
<i>Chromohalobacter canadensis</i>	(Arahal <i>et al.</i> , 2001a)	Eaux marines (USA)	
<i>Chromohalobacter israeliensis</i>	(Arahal <i>et al.</i> , 2001a)	Dead Sea	
<i>Chromohalobacter salexigens</i>	(Arahal <i>et al.</i> , 2001b)	Salines	
<i>Cobetia marina</i>	(Arahal <i>et al.</i> , 2002)	Salines	

Tableau 4. Bactéries halophiles associées aux environnements hypersalins (suite).

Affiliation	Espèces	Références	Sources
	<i>Halomonas alkaliantarctica</i>	(Poli <i>et al.</i> , 2007)	Lac hypersalé (Antarctique)
<i>Saccharospirillaceae</i>	<i>Saccharospirillum impatiens</i>	(Labrenz <i>et al.</i> , 2003)	Lac hypersalé Ekho (Antarctique)
<i>Pseudomonadales</i> <i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas halophila</i>	(Fendrich, 1988)	Grand Lac Salé, Utah (USA) Salines
<i>Vibrionales</i> <i>Vibrionaceae</i>	<i>Salinivibrio costicola</i>	(Mellado <i>et al.</i> , 1996)	Eaux marines
<i>Alteromonadales</i> <i>Alteromonadaceae</i>	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> <i>Marinobacter excellens</i> <i>Marinobacter lipolyticus</i> <i>Microbulbifer salipaludis</i>	(Gauthier <i>et al.</i> , 1992) (Gorshkova <i>et al.</i> , 2003) (Martin <i>et al.</i> , 2003) (Yoon <i>et al.</i> , 2003a)	Sédiments marins (Japan) Sol salin (Espagne) Sol salé Lac salé
<b>Spirochaetes</b> Spirochaetes Spirochaetales Spirochaetaceae	<i>Spirochaeta halophila</i>	(Greenberg & Canale-Paroca, 1976)	Salines
<b>Firmicutes</b> Bacilli Bacillales Bacillaceae	<i>Halobacillus halophilus</i> <i>Bacillus haloalkaliphilus</i>  <i>Bacillus marismortui</i> <i>Gracilibacillus dipsosauri</i>  <i>Gracilibacillus halotolerans</i> <i>Halobacillus litoralis</i>  <i>Halobacillus trueperi</i>  <i>Halobacillus karajensis</i> <i>Halobacillus dabanensis</i> <i>Halobacillus aidingensis</i> <i>Halobacillus locisalis</i> <i>Virgibacillus salexigens</i>	(Spring <i>et al.</i> , 1996) (Fritze, 1996)  (Arahal <i>et al.</i> , 1999) (Wainø <i>et al.</i> , 1998)  (Wainø <i>et al.</i> , 1998) (Spring <i>et al.</i> , 1996) (Spring <i>et al.</i> , 1996)  (Amoozegar <i>et al.</i> , 2003) (Liu <i>et al.</i> , 2005) (Liu <i>et al.</i> , 2005) (Yoon <i>et al.</i> , 2004a) (Garabito <i>et al.</i> , 1997 ; Heyrman <i>et al.</i> , 2003)	Salines Lac hypersalé natroné (Egypte) Mer Morte Grand Lac Salé, Utah (USA) Grand Lac Salé, Utah (USA) Grand Lac Salé, Utah (USA) Grand Lac Salé, Utah (USA) Grand Lac Salé, Utah (USA) Sol salin (Iran) Lac hypersalé Xinjiang Lac hypersalé Xinjiang Mer Morte Salines (Corée)

**Tableau 4.** Bactéries halophiles associées aux environnements hypersalins (suite).

Affiliation	Espèces	Références	Sources
<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Virgibacillus marismortui</i>	(Arahal <i>et al.</i> , 1999 ; Heyrman <i>et al.</i> , 2003)	Salines
	<i>Salinicoccus roseus</i>	(Ventosa <i>et al.</i> , 1990)	Salines (Espagne)
	<i>Salinicoccus hispanicus</i>	(Ventosa <i>et al.</i> , 1992)	Salines (Espagne)
	<i>Sporolactobacillaceae</i>	<i>Marinococcus halophilus</i>	(Hao <i>et al.</i> , 1984)
<i>Marinococcus albus</i>		(Hao <i>et al.</i> , 1984)	Salines
<b>Bacteroidetes</b> Flavobacteria Flavobacteriales Flavobacteriaceae	<i>Flavobacterium salegens</i>	(Dobson <i>et al.</i> , 1993)	Lac hypersalé (Antarctique)
	<i>Flavobacterium gondwanense</i>	(Dobson <i>et al.</i> , 1993)	Lac hypersalé (Antarctique)
<b>Sphingobacteria</b> Sphingobacteriales Crenotrichaceae	<i>Salinibacter ruber</i> *	(Antón <i>et al.</i> , 2002)	Salines (Espagne)

\*, bactéries halophiles extrêmes.

**Annexe 3 : Tableau 5.** Composition des milieux de culture utilisés.

Composants	Quantité (g)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
NaCl	250	250	160	125	125	175	200	195
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	20	5					20	49,83
KCl	5	5	4				1	5
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,2			0,13	0,13	0,1		0,92
NH <sub>4</sub> Cl		5						
MgCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O			20	160	100	20		34,66
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>				1	1	5		
NaHCO <sub>3</sub>								0,166
NaBr								0,58
FeCl <sub>3</sub> . 6H <sub>2</sub> O								7*
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>							0,3	
Extrait de levure	5	10				5	0,5	5
Tryptone	5			1	1			
Na-glutamate			20					
Saccharose			10					
Glucose								1
Amidon soluble				2	2		0,5	
Bactopeptone							0,5	
Casaminoacides							0,5	
Na-pyruvate							0,3	
Protéose peptone								5
Eau distillée (ml)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

1, milieu pour bactéries halophiles (Atlas, 1997); 2, milieu de Czechoslovak (Brisou, 1980); 3, milieu minimal de *Haloferox mediterranei*; 4, milieu de Oren (1983b); 5, milieu modifié de la formulation de Oren (1983b); 6, milieu de Oren & Litchfield (1999); 7, milieu de Antón *et al.* (2002); 8, milieu de Torreblanca *et al.* (1986).

\*, gouttes.

#### Annexe 4. Solutions révélatrices pour les lipides polaires membranaires (Kates, 1972).

✓ Révélation des spots de glycolipides

Dissoudre 0,5 g de  $\alpha$ -naphтол dans 100 ml de méthanol-eau (1 :1, v/v).

5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré dans 95 ml d'éthanol 96 °.

✓ Révélation des phospholipides

Solution A

Dissoudre 16 g de molybdate d'ammonium dans 120 ml avec de l'eau distillée.

Solution B

80 ml de la solution A

40 ml d'acide chlorhydrique concentré

10 ml de mercure.

Le mélange a été agité pendant 30 minutes puis filtré. Au moment de l'utilisation, la solution B est diluée dans un rapport 1 : 3 (solution B - eau distillée).

#### Annexe 5. Solutions utilisées au cours de l'extraction de l'ADN

✓ Solution SDS à 25 %

Dissoudre 250 g de sodium dodecyl sulfate dans 900 ml d'eau distillée. Chauffer à 68 °C jusqu'à complète dissolution puis ajuster le pH à 7,2 par HCl. Compléter à 1000 ml avec de l'eau distillée.

✓ Solution de NaCl 5 M

Dissoudre 292,2 g de NaCl dans 1000 ml et autoclaver à 120 °C pendant 15 minutes.

✓ Solution acétate de sodium (3 M, pH 5,2)

Dissoudre 408,1 g d'acétate-Na. 3H<sub>2</sub>O dans 800 ml d'eau distillée. Ajuster le pH à 5,2 avec de l'acide acétique glacial. Compléter à 1000 ml et autoclaver.

✓ Solution SSC 20×

NaCl	175,3 g
Na <sub>3</sub> citrate. 2H <sub>2</sub> O	88,2 g
Eau distillée	1000 ml
pH	7,0

✓ Solution de RNAase (60 µg/ml)

RNAase	60 mg
Eau bidistillée	100 ml

Dissoudre sans agitation. Chauffer 10 minutes à 90°C. Conserver en eppendorf à -20°C.

✓ Protéinase K (10 mg/ml)

Protéinase	1 g
Eau bidistillée	100 ml

Dissoudre puis conserver en eppendorf à -20°C.

Annexe 6 :Tableau 10. Origine des séquences utilisées.

Groupe	Espèces	N° d'accès	Références
Archaea halophiles extrêmes	<i>Halobacterium salinarum</i>	AJ496185	(Elazari-Volcani, 1957)
	<i>Halobacterium noricense</i>	AJ548827	(Gruber <i>et al.</i> , 2004)
	<i>Halorubrum coriense</i>	S70829	(Oren & Ventosa, 1996)
	<i>Halorubrum sodomense</i>	X82169	(Oren <i>et al.</i> , 1983)
	<i>Halorubrum trapanicum</i>	X82168	(Elazari-Volcani, 1957)
	<i>Halorubrum xinjiangense</i>	AY510707	(Feng <i>et al.</i> , 2004)
	<i>Halorubrum tebenquichense</i>	AJ276887	(Lizama <i>et al.</i> , 2002)
	<i>Halorubrum terrestre</i>	AB090169	(Ventosa <i>et al.</i> , 2004)
	<i>Halorubrum vacuolatum</i>	D87972	(Kamekura <i>et al.</i> , 1997)
	<i>Halorubrum alkaliphilum</i>	AY510708	(Feng <i>et al.</i> , 2005)
	<i>Halorubrum tibetense</i>	AY149598	(Fan <i>et al.</i> , 2004)
	<i>Halorubrum saccharovororum</i>	U17364	(Tomlinson & Hochstein, 1977)
	<i>Halorubrum lacusprofundi</i>	U17365	(Franzmann <i>et al.</i> , 1989)
	<i>Halorubrum distributum</i>	D63572	(Oren & ventosa, 1996)
	<i>Haloferax volcanii</i>	K00421	(Mullakhanbhai & Larsen, 1975)
	<i>Haloarcula vallismortis</i>	U17593 et U68451	(González <i>et al.</i> , 1978)
	<i>Haloarcula argentinensis</i>	D50849	(Ihara <i>et al.</i> , 1997)
	<i>Haloarcula marismortui</i>	X61688 et X61689	(Oren <i>et al.</i> , 1990)
	<i>Halobaculum gomorrense</i>	AF333760	(Oren <i>et al.</i> , 1995)
	<i>Halosimplex carlsbadense</i>	AF320478	(Vreeland <i>et al.</i> , 2003)
<i>Halomicrobium mukohataei</i>	D50850	(Ihara <i>et al.</i> , 1997 ; Oren <i>et al.</i> , 2002)	
<i>Haloterrigena thermotolerans</i>	AF115478	(Montalvo-Rodriguez <i>et al.</i> , 2000)	
<i>Methanospirillum hungatei</i>	M60880	(Harmsen <i>et al.</i> , 1996, 2002)	
Bactéries halophiles	<i>Halovibrio denitrificans</i>	DQ072718	(Sorokin <i>et al.</i> , 2006)
	<i>Halospina denitrificans</i>	DQ072719	(Sorokin <i>et al.</i> , 2006)
	<i>Salicola marasensis</i>	DQ019934-5	(Maturrano <i>et al.</i> , 2006b)
	<i>Pseudomonas halophila</i>	AB021383	(Fendrich, 1988)
	<i>Alcanivorax venustensis</i>	AF328762	(Liu & Shao, 2005)
	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	Y12579	(Yakimov <i>et al.</i> , 1998)
	<i>Halomonas elongata</i>	AJ295147	(Vreeland <i>et al.</i> , 1980)
	<i>Halomonas salina</i>	AJ243448	(Valderrama <i>et al.</i> , 1991)
	<i>Halomonas halmophila</i>	AJ306889	(Dobson <i>et al.</i> , 1990)
	<i>Halomonas organivorans</i>	AJ616910	(Garcia <i>et al.</i> , 2004)
	<i>Halomonas eurihalina</i>	X87218	(Quesada <i>et al.</i> , 1990)
	<i>Halomonas ventosea</i>	AY268080	(Martinez-Cánovas <i>et al.</i> , 2004b)

**Tableau 10.** Origine des séquences utilisées (suite).

Groupe	Espèces	N° d'accès	Références
	<i>Chromohalobacter canadensis</i>	AJ295143	(Arahal <i>et al.</i> , 2001a)
	<i>Chromohalobacter israelensis</i>	AJ295144	(Arahal <i>et al.</i> , 2001a)
	<i>Marinobacter lutaoensis</i>	AF288157	(Shieh <i>et al.</i> , 2003)
	<i>Marinobacter sedimentalis</i>	AJ609270	(Romanenko <i>et al.</i> , 2005)
	<i>Zymobacter palmae</i>	D14555	(Okamoto <i>et al.</i> , 1993)
	<i>Microbulbifer maritimus</i>	AY377986	(Yoon <i>et al.</i> , 2004b)
	<i>Microbulbifer elongata</i>	AF500006	(Yoon <i>et al.</i> , 2003b)
Bactérie	<i>Bacillus subtilis</i>	AF200210	

**Annexe 7. Solutions utilisées au cours de l'hybridation ADN-ADN**

Tampon phosphate (1 M):

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	142 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	120 g

Tampon 1 (0,15 M NaCl et 0,1 M acide maléique à pH 7,5) :

NaCl	4,3 g
Acide maléique	5,8 g
NaOH	4,015 g
Eau MilliQ	500 ml

✓ Solution de détection :

Tampon	1,5 ml
Albumine	0,5 %
Anti-digoxygénine-AP (Boehringer, cat 1093274)	1 µl

✓ Solution de révélation :

Tampon 2	5 ml
Eau MilliQ	5 ml
MgCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O (0,1 mg/ml)	3,5 µl
Para-nitrophénylphosphate (Sigma, cat N-9389)	10 mg

Tampon 2 (pH 9,6):

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,59 g
NaHCO <sub>3</sub>	2,93 g
MgCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,203 g
Eau MilliQ	1000 ml

## Annexe 8. Séquences des gènes d'ARNr des souches isolées

### Séquence de l'ADNr 16S de la souche 5.1 (*Halorubrum ezzemoulense* sp. nov.)

CCTATGGGACGATTTAGCCATGCTAGTTCGCACGAGTTCAGACTCGTGGCGAATAGTCCATTAACACGGAGGAAAA  
 AACTACCTTTCGGAACACAATACCTCTCCGAAACTGAGGCTAATAGTGTATACCATAACCACCTGGAATGAGT  
 GGTATGCCAAACGCTCCGGCGCCGAAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACGGCCACCGT  
 GCCAATAATCGGTATGGGTTCATGAGAGTGAGAACCAGAGACGGAATCTGAGACAAGATTCCGGGCCCTACGGGG  
 CGCAGCAGGCGGAAACCTTTACACTGCACGACAGTGCATAGGGGGATCCCAAGTGCACAGGCATAGCGCCTGT  
 GCTTTTCGGTACCTTAAGGCGGTACCAGAATAAGGGCTGGGCAAGACCAGTGCAGCCCGCGGTAAATACCGGC  
 AGCCCAAGTGTAGCCGATCTTATTTGGGCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCGCAAGTCCATCGGGAAATCCACC  
 TGCTCAACAGGTGGGCGCCCGGTAGAAACTGCGTGGCTTTGGGACCCGGAAGGCGCCGACCAGGTACGTCCCGGT  
 AGGAAAGTGAATTTCCCGTAATCCTNGACGGANCCGCGGATGGCGAAAGCACGTGCGGAGAACGGATCCGACAGTG  
 AGGGACGAAAAGCCAGGGTCTCGAACCGGATTAGATAACCCGGGTAGTCTTGGCCGTAAACAATGTCTGTAGGTG  
 TGGCTCCACTACGAGTGGGTGCTGTGCCGTAGGGAAGCCGTAAGCAGACCAGTGGGAAGTACGTCCGCAAGG  
 ATGAAACTTAAAGGAATTTGGCGGGGAGCACTACAACCGGAGGAGCCTGCGGTTTAAATTTGGACTCAACGCCGGAC  
 ATCTCACCAGCATCGACTGTAGTAATGACGATCAGGTTGATGACCTTATCCGAGCTTCAGAGAGGAGGTGCATGG  
 CCGCCGTACGCTCGTACCGTGGGCGTCTGTTAAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCGACCCCTTACTTGCCAGCA  
 GTACCGCGAGGTAGCTGGGGACAGTAGGGGACCGCCGTGGCTAACACGGAGGAAGGAACGGGCAACGGTAGGTG  
 AGTATGCCCGAATGTGCTGGGCAACACGCGGGCTACAATGGTCGAGACAAAGGGTTCCAACCTCCGAAAGGAGAC  
 GGTAATCTCAGAAACTCGATCGTAGTTTCGGATTGTGGGCTGCAACTCGCCACATGAAGCTGGATTCCGGTAGTAA  
 TCGCGTGTCAAAAGCGCGGGTGAATNCGTCCCTGCTCCTNGAACACACCGCCCGTCAAAGCACCCGATTTTCT  
 CCCGGATGAGNGAGTACCTCGTACGTCGAATCTGGGCTNCGCAAGGGGGCTAAGT

Les bases qui n'ont pas donné de lecture précise (identifié par N) lors du séquençage du produit PCR.

### Séquence de l'ADNr 16S de la souche 1'2

GGGGTCAGATTTAGCCATGCTAGTTCGCACGAGNTTCAGGACTCGTGGCATAATCCTCCTTAGTAACACGGGAAAA  
 AAAACTACCTTTCGGAAGCGACGATACCTTCCCGAAACTGGAGGGGAATAATGCATATCACCTCAGCTGGAA  
 TGAGGATTGAGTCAAAACGCTCCGGCGCCGAAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACGGCCC  
 ACCGTGCCAATAATCGGTACGGTTCATGAGAGTGAGAACCAGGAGACGGAATCTGAGACAAGATTCCGGGCCCTA  
 CGGGCGCAGCAGGCGGAAACCTTTACACTGCACGACAGTGCATAGGGGAATCCCAAGTGCAGGCATATAG  
 TATGCGCTTTTGTACACCGTAGGGAGGTGTACGAATAAGGGCTGGGCAAGACCAGTGCAGCCCGCGGTAATA  
 CCGGACCCGAGTGTATGGCCGATCTTATTTGGGCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCACAAGTCCATCGGAAAAT  
 CCACCCGCCAACGGGTGGGCGTCCGGTGGAACTGTGTGGCTTTGGGACCGGAAGGCGGACGGGTACGTCCGGG  
 GTAGGAGTGAATCCCGTAATCCTGGACGACCGCCGATGGCGAAAGCACGTCGAGAGGACGGATCCGACAGTGA  
 GGGACGAAAGCCAGGGTCTCGAACCGGATTAGATAACCCCGGATTAGATAACCCGGGTAGTCTTGGCTGTAAACAA  
 TGCTTATAGGTGTGGCTCCCCCTACGAGCGGGTGTGTGCTGTAGGGAAGCCGATAAGCAGCCCCCTGGGAAG  
 TATGTCCGCAAGGATGAAATTTAAAGGAATGGGCGGGGAGCACTACACCCGGAGGAGCCTGCGGTTTAAATGGT  
 CTAAACCGGGACATCTCACCAGCATCGACTGTAGTAATGACGCCCAGGTTGATGACTTTGTCCGAGTTTCAGAG  
 AGGAGGTGCATGCCCGCTTCAGCTCGTACCGTGGGCGTCCGTTAATTCAGGCAACGAGCGAGACCCGCATCC  
 TTAATTTCCACCAGCACTGCGAAGTGGCTGGGACAGTAGGGAGACCCCGTGGCCAACACGGAGGAAGGAACGG  
 GCAACGGTAGGTGATATGCCCGAATGTGCTGGGCAACACGCGGGCTACAATGGTCGAGACAAAGGGTTCCAAC  
 TCCGAAAGGAGACGGTAATCTCAGAAACTCGATCTTAGTTTCGGATTGTGGGCTACAACCTCGCCCCAGGAAGCTG  
 GATTTCGGTAGTAATCGTGTTCACAAGCGCCCGGTGAATACTTCTTTGTTCTTTCCACGCACCCGCTTCAAACC  
 ACCCGAGTGTAGTTCCGGATAAGGCAGGATGCCACGTGTGCAATCTGGGCTTCGCAAGGGGGCTAAGTCAACAA  
 GGAGC

### Séquence de l'ADNr 16S de la souche 4'1

ATATAGAATGCTAGCTGCACGAGTTCACACTCGTGGCGAATTTCCAGTAACACGAGAAAAAACTACCCTACAGA  
 GAACGATAACCTTCGAAACTGAGGGAAAAAGTTCATACGGGAGTCATGCTGGAATGCCGACTCCCCGAAACGCT  
 CAGGCGCTGTAGGATGTGGATGCGAAGGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACGGACCAGCGTGCAGATAATCGGTAC  
 GTATTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGACGGAATCTGAGACAAGATTCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAA  
 ACCTTTACACTGCACGCAAGTGCATAGGGGACCCCAAGTGCAGGGGCATATAGTCTCGCTTTTCTCGACTGT  
 AAGGCGGTGAGGAATAAGAGCTGGGCAAGACCAGTGCAGCCCGCGGTAATACCGGCAGCTCAAGTGTATGAC  
 CGATATTATTTGGGCTAAAGCGTCCGTAGCCGGCCACGAAGTTTATCGGGAATCCGCCAGCTCAACTGGTGGG

CGTCCGGTGAAAACACGTTGGCTTGGGACCGGAAGGATCGAGGGGTACGTCCGGGGTAGGAGTGAAATCCCGTAA  
 TCCTGGACGGACCACCGATGGCGAAAAGCACCTCGAGAAGACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAAGCTAGGGTCTC  
 GAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCTTAGCTGTAAACGATGCTCGCTAGGTGTGACACAGGCTACGAGCCTGTG  
 TTGTGCCGTAGGGAAAGCCGAGAAGCGAGCCGCTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAAACTTAAAGGAATTGGCG  
 GGGGAGCACTACAACCGGAGGAGCCTGCGGTTTAAATTGGACTCAACGCCGGACATCTCACCAGCTCCGACTATAG  
 TAATGACGGTCAGGTTGATGACCTTATCACGACGCTATAGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGT  
 GAGGCGTCTGTAAAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCGCACCTTCTAATTGCCAGCAGCAGTTTCGACTGGCTGGGT  
 ACATTAGAAGGACTGCCGCTGCTAAAAGCGAGGAAGGAACGGGCAACGGTAGGTGAGTATGCCCCGAATGAGCTG  
 GGCTACACGCCGGCTACAATGGTCGAGACAATGGGTTGGCTATCTCGAAAAGAGAACGCTAATCTCCTAACTCGAT  
 CGTAGTTCGGAGTGAGGGCTGAAACTCGCCCTCATGAAGCTGGATTCCGGTAGTAATCGCATTTTCAATAGAGTGCG  
 GTGAATACGTTTCTTCTCCCTTGCACGGGAAAAGCCCGTCAAAGCACCCGAGTGAGTTTTTTTTCTTAGTCCAAGG  
 AGATCGGTGGTTCGAATCTGGGCTTCGCAAGGGGGCTTAAAGTCAACAACGGGCCGCG

### Séquence de l'ADNr 16S de la souche S1

GTTCCGAGTCGATTTAGCCATGCTAGTTGCACGAGTTCAGACTCGTAGCATATANCTNAGTAACACGTGAGAACA  
 AACTACCTACAGACCGCAATAACCTCCCGAAAACCTGGAGGCCAATAGCGGATATAACTCTCATGCTGGAGTGCC  
 GAGAGATAGAAAATGTTCCGGCGCTGTAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGATGGTGGGGTAACGGCCCACCA  
 TGCCGATAATCGGTACAGGTTGTGAGAGCAAGAGCCTGGAGACGGTATCTGAGACAAGATACCGGGCCCTACGGG  
 GCGCAGCAGGCGGAAACCTTTACACTGCACGACAGTGCATAGGGGGACTCCGAGTGTGAGGGCATATAGCCCT  
 CGCTTTTCTGAACCGTAAGGTGGTACAGGAACAAGGACTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGGTAATACCGG  
 CAGTCCAAGTGATGGCCGATATTATTGGGCCATAAGCGTCCGTAGCTTGTGTGTAAGTCCATTGGGAAATCGAC  
 CAGCTCAACTGGTCCGGTCCGGTGGAAACTACACAGCTTGGGGCCGAGAGACTCAACGGGTACGTCCGGGGTAG  
 GAGTGAAAATCCTGTAATCCTGGACGGACCACCAATGGGGAAAACACGTTGAGAGTCCGGACCCGACAGTGAGGG  
 ACGAAAGCCAGGGTCTCGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCCTGGCTGTAAACAATGCTCGCTAGGTATGTCA  
 CGGGCCATGAGCAGCTGATGTGCCGTAGTGAAGCAGATAAGCGAGCCGCCGTTGGGAAGTACGTCGCAAGGATGAA  
 ACTTAAAGGAATTGGCGGGGAGCACCACAACCGGAGGAGCCTGCGGTTTAAATTGGACTAAACGCCGGAATCTC  
 ACCGGTCCCGACAGTAGTAATGACAGTCAAGTTGACGACTTTACTCGACGCTACTGAGAGGAGGTGCATGGCCGC  
 CGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCTGTAAAGTCAAGCAACGAGCGAGACCCACACTTCTAGTTGCCAGCAACAC  
 CCTTGAGGTAGTTGGGTACACTAGGAGGACTGCCGCTGCTAAAGCGGAGGAAGGAATGGGCAACGGTAGGTGAGT  
 ATGCCCCGAATGGACCGGGCAACACGCGGGCTACAATGGCTCTGACAGTGGGATGCGACGCCGAGAGGCCAAGCT  
 AATCTCAAACCGGAGTCTGATGTTCCGGATTGCGGGCTGAAACCCGCCCGCATGAAGCTGGATTCCGGTAGTAATCGC  
 GTGTCAAGCGCGGTTGAATACGTTTCTTCTCCCTTGCAGCGGGAAAACCCGTCAAAGCACCCGAGTGGGGT  
 TTTTTTCTCAGGCCGAGGAGGCGACGGTCAATCTGGGCTCCGCAAGGGGGCTTAAAGTCTGTAATCAACGAGCC

### Séquence de l'ADNr 16S de la souche B2 (*Salicola salis* sp. nov.)

GTTTGATCATGGCTCAGATTCTAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCAGGCCCTCCGG  
 GGTGCTGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCAATGGGAACTTACCCAGTAGTGGGGGATAGCCCGGGGAAACCC  
 GGATTAATACCGCATACGCCCTGAGGGGGAAAAGCGGGCTCCGGCTCGCGCTATTGGATGGGCCCATGTCCGATTA  
 GTTTGTTGGTGAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACCGGGA  
 CTGAGACACGGCCCGGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCGTATCCAGCC  
 ATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTTGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCAGGGAGGAAAAGCTGGTTCGCTAATACCG  
 GCCAGTGTGACGTTACCTGCAGAAGAAGCACCGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGC  
 AGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGCGCTAGGCGGTTTGATAAGCGGCTTGTGAAAGCCCCGGGCTCA  
 ACCTGGGAATTGCAATCCGAACTATCAGGCTAGAGTGCAGCAGAGGGCAGTGGAAATCCCGGTGTAGCGGTGAAA  
 TGCGTAGATATCGGGAGGAAACACAGTGGCGAAGGCGACTGCCGTTGGGCTGACACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCG  
 TGGGTAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGAGAAGTGTGAGTGGGGCTATTAGA  
 GCCTTAGTGACGACGTAACCGGATAAGTTCTCCGCCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAANACTCAAATGAATT  
 GACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGACGCAACCGGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACA  
 TCCTGCGAAACTTGCTAGAGATAGCTTGATGCCCTTCGGGAGCGCAGTGACAGGTKCTGCATGGCCGTCGTGAGCT  
 CGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCCTTGTCTCAGTTACCAGCAGCTTCGGGTGGGC  
 ACTCTGGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGGTTCATCATGGCCCTTACGGCCAG  
 GGCTACACACGCTGCTACAATGGGGCGTACAGAGGGCAGCGAGTGCAGGAGCGCAAGCGAATCCCTTAAAGCGTCT  
 CTCAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCCGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGAATGCTGCG  
 GTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACAACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGACTGCACCAGAAGCGGTTAGTCTA  
 ACCTTCGGGAGGACGATCGCCACGGTGTGGTTTACGACTGGGGTGAAGTCTGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAAC  
 TGCGGCTGGATCACCTCTTAAA

**Séquence de l'ADNr 16S de la souche 2a**

ACTACCCTGGTGGNACGGGAATACTCTCTCCGAAACTGAGGCTAAWCCCCGATAACGCTTTGCTCCTGGAAGGGG  
CAAAGCCGGAAACGCTCCGGCGCCACAGGATGCGGCTGCGGTTCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACGGCCCACCG  
TGCCATAATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGACGGAATCTGAGACAAGATTCGGGGCCCTACGGG  
GCGCAGCAGGCGGAAACCTTTACACTGTACGAAAGTGCATAAGGGGACTCCGAGTGTGAAGGCATAGAGCCTT  
CACTTTTGTACACCGTAAGGTGGTGCACGAATAAGGACTGGGCAAGACCCGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGG  
CAGTCCGAGTGATGGCCGATCTTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCTGAACAAGTCCGTGGGAAATCTGT  
CCGCTTAAACGGCAGGCGTCCAGCGGAAACTGTTTCAGCTTGGGACCGGAAGACCTGAGGGGTACGTCTGGGGTAG  
GAGTGAATCCTGTAATCCTGGACGACCCGCGGTGGCGAAAGCGCCTCAGGAGAACGGATCCGACAGTGAGGGA  
CGAAAGCTAGGGTCTCGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCCTAGCTGTAAACGATGTnCCGCTAGGTGTGGCG  
CAGGCTACGAGCCTGCGCTGTGCCGTAGGGAAAGCCGAGAAGCGGACCCGCTGGGAAGTACGTCTGCAAGGATGAA  
ACTTAAAGGAATTGGCGGGGAGCACTACAACCKGAGGAGCCTGCGGTTTAAATTGGACTCAACGCCGGACATCTC  
ACCAGCCCCGACAGTAGTAATGACGGTCAGGTTGATGACCTTACCCGAGGCTACTGAGAGGAGGTGCATGGCCGC  
CGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCTGTAAAGTCAGGCAACGAGCGWGACCCGCACCTCTAATTGCCAGCAGTAC  
CCTTTGGGTAGCTGGGTACATTAGGTGGACTGCCGCTGCCAAAGCGGAGGAAGGAACGGGCAACGGTAGGTCAGT  
ATGCCCCGAATGGGCTGGGCAACACGCGGGCTACAATGGTCGAGACAATGGGAAGCCACTCCGAGAGGAGGCGCT  
AATCTCCTAAACTCGATCGTAGTTCGGATTGAGGGCTGAAACTCGCCCTCATGAAGCTGGATTCCGGTAGTAATCG  
CGTGTACAGCAGCGCGGTTGAAT

**Séquence de l'ADNr 16S de la souche 5-1**

AACTACCCTTCGGAAACACAATACCTTCCGAAACTGAGGCTAATAGTGTATACCATAACCACCTGGAATGAGT  
GGTATGCCAAACGCTCCGGCGCCGAAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACGGCCCACCGT  
GCCAATAATCGGTATGGGTTCATGAGAGTGAGAACCCAGAGACGGAATCTGAGACAAGATTCGGGGCCCTACGGGG  
CGCAGCAGGCGGAAACCTTTACACTGCACGACAGTGCATAGGGGGATCCCAAGTGCACAGGCATAGCGCCTGT  
GCTTTTCGGTACCGTAAGGTGGTACCAGAAATAAGGGCTGGGCAAGACCCGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGGC  
AGCCCAAGTGATGGCCGATCTTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCGCAAGTCCATCGGGAAATCCACC  
TGCTCAACAGGTGGGCGCCCGGTAGAAACTGCGTGGCTTGGGACCGGAAGGCGCGACGGGTACGTCCGGGGTAGG  
AGTGAATCCCGTAATCCTGGACGACCCCGGATGGCGAAAGCACGTGCGGAGGACGGATCCGACAGTGAGGGAC  
GAAAGCCAGGGTCTCGAACCGGAATTAGATAACCCGGGTAGTCCGTGGCCGTAACAATGTCTGCTAGGTGTGGCTC  
CCACTACGAGTGGGTGCTGTGCCGTAGGGAAGCCGCTAAGCAGACCCGCTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAAA  
CTTAAAGGAATTGGCGGGGAGCACTACAACCGAGGAGCCTGCGGTTTAAATTGGACTCAACGCCGGACATCTCA  
CCAGCATCGACTGTAATAATGACGACCAGGTTGATGACCTTGTCCGAGTTTCAGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCG  
TCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCTGTAAAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCGCACCTTACTTGCCAGCAGTACCG  
CGAGGTAGCTGGGGACAGTAGGGGGACCCCGTGGCTAACACGGAGGAAGGAACGGGCAACGGTAGGTGAGTATG  
CCCCGAATGTGCTGGGCAACACGCGGGCTACAATGGTCGAGACAAAGGGTTCCAACCTCCGAAAGGAGACGGTAAT  
CTCAGAAACTCGATCGTAGTTCGGATTGTGGGCTGCAACTCGCCACATGAAGCTGGATTCCGGTAGTAATCGCGT  
GTCACAAGCGCGGGTGAATACTTCCCCTGCTCCTTGCGAAACACCGCCCGTCAAAGCACCCGATTTT

**Séquence de l'ADNr 16S de la souche 5-2**

SCAAGGAGCAGGGAACGTATTACCGCGCGCTTGTGACACGCGATTACTACCGAATCCAGCTTCATGTGGGCGAG  
TTGCAGCCCACAATCCGAACTACGATCGAGTTTCTGAGATTACCGTCTCCTTTTCGGAGTTGGAACCCTTTGTCTC  
GACCATTGTAGCCCGCGTGTGGCCAGCACAGTCCGGGCATACTGACCTACCGTTGCCCGTTCTTCTCCTCCGTGT  
TAGCCACGGCGGTCCCCCTACTGTCCCCAACTACCTCGCGGTACTGCTGGCAAGTAAGGGTGCGGGTCTCGCTCG  
TTGCCTGACTTAACAGGACGCCCTCACGGTACGAGCTGACGGCGGCCATGCACCTCCTCTCTGAAACTCGGACAAG  
GTCATCAACCTGGTCTCATTATTACAGTCGATGCTGGTGAGATGTCCGGCGTTGAGTCCAATTAACCCGACGGC  
TCCTCCGGTTGTAGTGCTCCCCGCCAATTCCTTTAAGTTTCATCCTTGGCGACGTACTTCCCAGGCGGTCTGCT  
TAGCGGCTTCCCTACGGCACAGCACCCACTCGTAGTGGGAGCCACACCTAGCAGACATTTGTTTACGGCCAGGACT  
ACCCGGGTATCTAATCCGGTTCGAGACCCTGGCTTTTCGTCCCTCACTGTCGGATCCGTCTCGCGACGTGCTTTC  
GCCATCGGCGGTCCGTCCAGGATTACGGGATTTCACTCCTACCCCGGACGTAeCCGTGCGCCCTTCCGGTCCcAA  
GCCACGCAGTTTCTACCGGGCGCCACCTGTTGAGCAGGTGGATTTCCCGATGGACTTGCAGCGGCCAGCTACGGA  
CGCTTTAGGCCCAATAAGATCGGCCATCACTTGGGCTGCCGTAATTACCGCGGGCGGTGGCACCGGTCTTGCCCA  
GCCCTTATTCTGGTACCACCTTACGGTACCGAAAAGCACAGGCGCTATGCCCTGTGCACCTGGKATCCCCCTATCG  
CACTGTCTGTCAGTGTAAAGGTTTCGCGCCTGCTGCGCCCCGTAGGGCCCCGAATCTTGTCTCAGATTCCGTCTC  
TGGGTTCTCACTCTCATGACCATAACCGATTATTGGCACGGTGGGCGGTTACCCACCCGCTACCTAATCGGCCG  
CAGCCACATCCTTYGGCGCCGAGCGTTTGGCATAACCACTCATTCAGTGGTGGTATGGTATACACTATTACCTT  
CAGTTTCC

**Séquence de l'ADNr 16S de la souche 5-3**

CCNCTTAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGAT  
 CCCAGCTTGCTGGGAGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTGCCCGGTAGTGGGGGATAAC  
 TTGAGGAAACTCAAGCTAATACCGCATAACGCCCTACGGGGGAAAGCAGGGGCTCTTCGGACCTTGCGCTATCGGA  
 TGAGCTTATGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGA  
 TGATCAGCCACATCGGGACTGAGACACGGCCCCGAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGaCaTGGG  
 CGaAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTGAGGAAGAAG  
 GCTTGTCCGGTTAATACCCGGCAGGAAGGACATCACTACAGAAGAAGCCCCGSMTAACCTCCGTGCCAGCAGCCGC  
 GGTAAATACGGAGGGGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCCTAGGCGGCTTGGTAAGCCGGTT  
 GTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATGGCATCCGGAACCTGTCAGGCTAGAGTGCAGGAGAGGAAGGTAGAATT  
 CCCGGTGTAGCGGTGAAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAATACCAGTGGCGAAGGCGGCCCTTCTGGACTGACACTGA  
 CGCTGAGGTACGAAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTA  
 GCCGTTGGGGTCTTGGAGACCTTTGTGGCGCAGTTAACGCACATAAGTCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGG  
 TTA AAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAA  
 CCTTACCTACCTTGACATCGTGCGAACCTGGTAGAGATACCTTGGTGCCTTCGGGAGCGCACAGACAGGTGCTG  
 CATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTATTTGC  
 CAGCGATACGGTCCGGAACCTTAAGGAGACTGCCGTTGACAAACCCGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATC  
 ATGGCCCTTACGGGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCCGATACAATGGGTGCGAAAGCGGCGACGTGGCGCT  
 AATCCCATAAAGTCGGTCTCAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCG  
 TGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCCTTGTACACACCCGCCGTCACACCATGGGAGTGGACTGCA  
 CCAGAAGTGGTTAGCCTAACTTCGGAGGGCGATCACCACGGTGTGGTTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGG  
 TAGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTANMG

**Séquence de l'ADNr 16S de la souche 5'RB**

ACTCGGGTGTCTTTGACGGGCGGTGTGTGCAAGGAGCAGGGAACGTATTCACCGCGCGCTTGTGACACGCGATTAC  
 TACCGAATCCAGCTTCATGTGGGCGAGTTGCAGCCACAATCCGAACCTACGATCGAGTTTCTGAGATTACCGTCT  
 CCTTTCGGAGTTGGAACCCCTTTGTCTCGACCATTGTAGCCCGCGTGTGGCCAGCACATTCGGGGCATACTGACC  
 TACCGTTGCCCGTTCCTTCTCCGTGTTAGCCACGGCGGTCCCCCTACTGTCCCAGCTACCTCGCGGTACTGCT  
 GGCAAGTAAGGGTGCGGGTCTCGCTCGTTGCCGACTTAAACAGGACGCCCTCACGGTACGAGCTGACGGCGGCCAT  
 GCACCTCCTCTCTGAAGCTCGGATAAGGTCAACCTGATCGTCATTACTACAGTGCATGCTGGTGAGATGTCC  
 GCGTGTGAGTCCAATTAAACCGCAGGCTCCTCCGGTTGTAGTGTCCCCCGCAATTCCTTTAAGTTTCATCCTT  
 GCGGACGACTTCCAGGCGGTCTGCTTAGCGGCTTCCCTACGGCACAGCACCCACTCGTAGTGGGAGCCACACC  
 TAGCAGACATTGTTTACGGCCAGGACTACCCGGTATCTAATCCGGTTCGAGACCCCTGGCTTTCGTCCCTCACTG  
 TCGGATCCGTTCCTCGGACGTGCTTTCGCCATCGGCGGTCCGTCCAGGATTACGGGATTTCACTCCTACCCCGGA  
 CGTACCCGTCGCGCCTTCCGGTCCCAAGCCACGCAGTTTBTACCGGGCGCCACCTGTTGAGCAGGTGGATTTCC  
 CGATGGACTTGCAGCGCCAGCTACGGACGCTTTAGGCCAATAAGATCGGCCATCACTTGGGCTGCCGGTATTAC  
 CGCGGCGGCTGGCACCGGTCTTGGCCAGCCCTTATCTGGTACCGCCTTAGGGTACCGAAAAGCACAGGCGCTAT  
 GCCTGTACTTGGGATCCCCCTATCGCACTGTCGTGCAGTGTAAAGTTTCGCGCCTGCTGCGCCCCGTAGGGC  
 CCGGAATCTTGTCTCAGATTCCGTCTCTGGTTCTCACTCTCATGACCATAACCGATTATTGGCACGGTGGGCCG  
 TTACCCACCGTCTACCTAATCGGCCGAGCCACATCCTTCGGCGCCGGAGCGTTTGGCATAACCACTCATTTCCAG  
 TGGTGGTATGGTATACACTATTAGCCTCAGTTTGGAAAGAGGGTATTGTGTTACCGAAGGGTAGTTTTG

**Séquence de l'ADNr 16S de la souche B1**

CCAAGGAGCAGGGAACGTATTCACCGCGCGCTTGTGACACGCGATTACTACCGAATCCAGCTTCATGTGGGCGAG  
 TTGCAGCCACAATCCGAACCTACGATCGAGTTTCTGAGATTACCGTCTCCTTTCGGAGTTGGAACCCCTTTGTCTC  
 GACCATTGTAGCCCGGTGTTGCCAGCACATTCGGGGCATACTGACCTACCGTTGCCCGTTCCTTCTCCGTGT  
 TAGCCACGGCGGTCCCCCTACTGTCCCAGCTACCTCGCGGTACTGCTGGCAAGTAAGGGTGCGGGTCTCGCTCG  
 TTGCCTGACTTAAACAGGACGCCCTACGGTACGAGCTGACGGCGGCCATGCACCTCCTCTCTGAAGCTCGGATAAG  
 GTCATCAACCTGATCGTCATTACTACAGTCGATGCTGGTGAAGTGTCCGGCGTTGAGTCCAATTAACCCGAGGC  
 TCCTCCGGTTGTAGTGCTCCCCCGCAATTCCTTTAAGTTTCATCCTTTCGGGACGTACTTCCCAGGCgGTCGTGCT  
 TAGCGGCTTCCCTACGGCACAGCACCCACTCGTAGTGGGAGCCACACCCTAGCAGACATTTgtTTACGGCCAGGACT  
 ACCCGGGTATCTAATCCGGTTCGAGACCCCTGGCTTTCGTCCCTCACTGTCGGATCCGTTCCTCGCGACGTGCTTTC  
 GCCATCGGCGGTCCGTCCAGGATTACGGGATTTCACTCCTACCCCGGACGTACCCGTGCGCGCTTCCGGTCCcAA  
 GCCACGCAGTTTCTACCGGGCGCCACCTGTTGAGCAGGTGGATTTCCCGATGGACCTGCGCGGCCAGCTACGGA  
 CGCTTTAGGCCAATAAGATCGGCCATCACTTGGGCTGCCGGTATTACCGCGGCGGCTGGCACCGGTCTTGGCCA  
 GCCCTTATTCTGGTACCGCCTTAGGGTACCGAAAAGCACAGGCGCTATGCCCTGTGCACCTGGGATCCCCCTATCG

CACTGTTCGTGCAGTGTAAAGGTTTCGCGCCTGCTGCGCCCCGTAGGGCCCGGAATCTTGTCTCAGATTCCGTCTC  
 TGGGTTCTCACTCTCATGACCCATACCGATTATTGGCACGGTGGGCCGTTACCCCACCGTCTACCTAATCGGCCG  
 CAGCCACATCCTTCGGCGCCGGAGCGTTTGGCATACTACTCATTCCAGTGGTGGTATGGTATACACTATTAGCCT  
 CAGTTTGGCCCGAGGGTATTGTGTTCGGAAGGGTAGTTTTG

### Séquence de l'ADNr 16S de la souche S7

GCTAGTCCCACGAGTTCGGACTCGTGGAGAATCTCCCTGTAACAAGGGGAAAAACTACCCTTCGGAACACAATAC  
 CCTTCCCCAAACTGAGGAGAAAAAAGTATACCATAACCACCCTGGAATGAGTGGTATGCCAAACGCTCCGGCGCC  
 GAAGGATGTGGCTGCGGTGACCGAGGTAGACGGTGGGGTAACGGCCACCCTGCCAATAATCGGTATGGGTATG  
 AGAGTGAGAACCCAGAGACGGAATCTGAGACAAGATTCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTAC  
 ACTGCACGACAGTGCATAGGGGGATCCCAAGTGCACAGGCATAGCGCCTGTGCTTTTTCGGTACCCTAAGGCGGT  
 ACCAGAATAAGGGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCCGCGGTAATACCGGCAGCCCAAGTGTATGGCCGATCTTA  
 TTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCGCAAGTCCATCGGGAAATCCACCTGCTCAACAGGGTGGGCGCCCCG  
 GTAGAAACTGCGTGGCTTGGGACCGGAAGGCGCGACGGGTACGTCCGGGGTAGGAGTGAAATCCCCGTAATCCTG  
 GACGGACCGCCGATGGCGAAAAGCACGTGCGGAGAACGGATCCGACAGTGAGGGACGAAAGCCAGGGTCTCGAAC  
 GGATTAGATACCCGGGTAGTCTTGGCCGTAAACAATGTCTGCTAGGTGTGGCTCCCACTACGAGTGGGTGCTGTG  
 CCGCAGGGAAGCCGCTAAGCAGACCGCTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGA  
 GCACTACAACCGGAGGAGCTGCGGTTTAAATTGGACTCAACGCCGGACATCTCACCAGCATCGACTGTAGTAATG  
 ACGATCAGGTTGATGACCTTATCCGAGCTTCAGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTGAGCTCGTACCGTGAGGCGT  
 CCTGTAAAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCGCACCCTTACTTGCCAGCAGTACCGCCGAGGTAGCTGGGGACAGTAG  
 GGGGACCGCCGTGGCTAACACGGAGGAAGGAACGGCAACGGTAGGTGAGTATGCCCCGAATGTGCTGGGCAACA  
 CGCGGGCTACAATGGTTCGAGACAAAGGGTTCCAACCTCCGAAAGGAGACGGTAATCTCAGAACTCGATCGTAGTT  
 CGGATTGTGGGCTGCAACTCGCCACATGAAGCTGGATTTCGGTAGTAATCGCGTGTACAAGCGCGCGGTGAATA  
 CGTTCCCTGCTCCTTGACAGCACCGCCCGTCAAAGCACCCGAGTGAGGTTCTCCATGAGGCGTGAGATCGTACG  
 TCGAATCTGGGCTTCGCAAGGGGGCTTAAAGTCGTAACCAACGAGCCGACGCC

### Séquence de l'ADNr 16S de la souche S2

GCTTTGGGATCGATTTAGCATGCTAGTCTCACGAGTTCAGACTCGTGGCGAATCCTCCTAGTAACAAGGGAAAAA  
 AACTACCCTTCGGAACACAATACCTTTCCCCAAACTGAGGGGAAAAATGTATACCATAACCACCCTGGAATGAGT  
 GGTATGCCAAACGCTCCGGCGCCGAAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACGGCCACCCT  
 GCCAATAATCGGTATGGGTATGAGAGTGAGAACCCAGAGACGGAATCTGAGACAAGATTCCGGGCCCTACGGGG  
 CGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACACTGCACGACAGTGCATAGGGGGATCCCAAGTGCACAGGCATAGCGCCTGT  
 GCTTTTCGGTACCCTAAGGCGGTACCAGAATAAGGGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGGTAATACCGGC  
 AGCCCAAGTGATGGCCGATCTTATTGGGCCATAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCGCAAGTCCATCGGGAAATCCACC  
 TGCTCAACAGGTGGGCGCCCGGTAGAAACTGCGTGGCTTGGGACCGGAAGGCGCGACGGGTACGTCCGGGGTAGG  
 AGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCGCCGATGGCGAAAGCACGTGCGGAGAACGGATCCGACAGTGAGGGAC  
 GAAAGCCAGGGTCTCGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCTTGGCCGTAAACAATGTCTGCTAGGTGTGGCTCC  
 CACTACGAGTGGGTGCTGTGCCGTAGGGAAGCCGCTAAGCAGACCGCTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAAAC  
 TTAAAGGAATTGGCGGGGAGCACTACAACCGGAGGAGCTGCGGTTTAAATTGGACTCAACGCCGGACATCTCAC  
 CAGCATCGACTGTAGTAATGACGATCAGGTTGATGACCTTATCCGAGCTTCAGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGT  
 CAGCTCGTACCGTGAGGCGTCTGTAAAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCGCACCCTTACTTGCCAGCAGTACCGC  
 GAGGTAGCTGGGGACAGTAGGGGGACCGCCGTGGCTAACACGGAGGAAGGAACGGCAACGGTAGGTGAGTATGC  
 CCCGAATGTGCTGGGCAACACGCGGGCTACAATGGTTCGAGACAAAGGGTTCCAACCTCCGAAAGGAGACGGTAATC  
 TCAGAACTCGATCGTAGTTTCGGATTGTGGGCTGCAACTCGCCACATGAAGCTGGATTTCGGTAGTAATCGCGTG  
 TCACAAGCGCGCGGTGAATACGTTCCCTGCTCCTTGACAGACCGCCCGTCAAAGCACCCGAGTGAGGTCCGGAT  
 GAGGCGTAGGAGCGAACGTCGAATCTGGGCTTCGCAAGGGGGCTTAAAGTCGAACATCCGCGCGCGAC

### Séquence de l'ADNr 16S de la souche B3

CACAGAGAAAAAATCTCCCTATTTGGATCCGAATAATTCTCCCGAAACTGAGGCTAATTCGGAATACGGCTCA  
 CCACCTGGAGTGGTGTGAGCCCCGAAACGCTCCGGCGCCATAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGG  
 GTAACGGCCACCCTGCCATAATCGGTACGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGACGGTATCTGAGACAAGATA  
 CCGGGCCCGGACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACACTGCACGAAAGTGCATAAGGGGACTCCAAGTGC  
 AGGGCATATAGTCTCTGCTTTTTCGACCGTAAGGTGGTTCGCGGAATAAGTGTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCG  
 CCGCGGTAATACCGGCAGCACGAGTGATGACCGCTATTATTGGGCCATAAGCGTCCGTAGCTGGCCGTGCAAGTC

CATCGGGAAATCCGCGCGCTTATCTCTCGGGCGTCCGGTGGAAACTGCATGGCTTGGGACCGGAAGACCAGAGGG  
GTACGTCCCGGGTAGTAGTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCCACCGGTGGCGAAAGCGCCTCTGGAAGACGG  
ATCCGACGGTGAGGGACGAAAGCTCGGGTCACGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCGAGCTGTAAACGATGT  
CTGCTAGGTGTGGCACAGGCTACGAGCCTGTGCTGTGCCGCAGGGAAGCCGTGAAGCAGACCGCCTGGGAAGTAC  
GTCCGCAAGGATGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCACTACAACCGGAGGAGCCTGCGGTTTAAATTGGACTC  
AACGCCGACATCTCACCAGCATCGACAATGTGCAGTGAAAGTCAGGTTGATGACCTTACTGGAGCCATTGAGAG  
GAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCCTGTTAAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCGCACTCCT  
AATTGCCAGCAACACCTAGCGGTGGTTGGGTACATTAGTAGGACTGCCAGTGCCAAACTGGAGGAAGGAACGGGC  
AACGGTAGGTCAGTATGCCCCGAATGTGCTGGGCGACACGCGGGCTACAATGGCCGAGACAGTGGGATGCAACCC  
CGAAAGGGGGCGCTAATCTCCGAAACTCGGTCTGTTTCGGATTGAGGGCTGAAACTCGCCCTCATGAAGCTGGA  
TTCGGTAGTAATCGCGCCTCAGAAGGGCGCGGTGAATACGTCCTTTCTCCTTGACACGGAACCCGTCAAAGCAC  
CCGAGTGGGGTTTTTTTTTCTGCCGACAGGGACGTCGGTCTGAATCTGGGCTCCCCAAGGGGGCTTAAGTCGTAAC  
AAGTAGCCGAGC

## Annexe 9

**Tableau 27.** Caractéristiques différenciant les genres d'halobactéries (Grant *et al.*, 2001 ; Grüber *et al.*, 2004 ; Itoh *et al.*, 2005 ; Xue *et al.*, 2005 ; Castillo *et al.*, 2006a et b).

Propriétés	1	2	3	4	5	6	7
Pigmentation	Rouge	Rouge	Rouge	Rouge	Rouge-orange	Rouge-pourpre	Rouge-orange
Morphologie cellulaire	Bât.	Bât. ou pléom.	Cocci	Disque pléom.	Bât.	Bât. ou bât.pléom.	Court et long bât.
Taille cellulaire (µm)	0,5-1,2 × 1,0-6,0	0,2-2 × 0,5-5	0,8-1,5	1-3 × 2-3	0,5-1 × 5-10	0,12-1 × 0,5-7	1-3 ou 0,5 × 3-8
Gamme de NaCl (M)	3,0-5,2	1,7-5,2	2,5-5,2	1,5-5,2	1,5-2,5	0,5-4,5	2,5-4,5
Optimum de NaCl (M)	3,5-5,2	2,5-4,3	3,5-4,5	2,5	nd	1,7-4,5	3,0-3,5
Exige Mg <sup>2+</sup>	+	+	+	+	++	v	nd
Temp. optimale (°C)	35-50	35-53	30-40	35	40	31-50	40-45
pH optimum	7,0-7,5	6,5-7,5	7,0	7,0	6,0-7,0	Neutre-9,5	nd
Crois. en anaérobiose :							
- Nitrate	-	+/nd	+	v	-	-	+
- L-Arginine	+	-/nd	-	-	+	-/nd	-
Crois. sur les sucres	v	+/nd	v	+	-	v	+
Prod. d'acides à partir de sucres	-	+	v	+	-	+/nd	+
Hydrolyse de :							
- Amidon	-	v	v	v	+	v	+
- Gélatine	-	v	+	v	-	-/nd	-
- Tween 80	-	v	v	v	nd	-/nd	-
Glycolipides caractéristiques	S-TeGD, STGD1	TGD2	TGD1	SDGD1	SDGD1	SDGD3	DGD1
GC (%)	54,3-71,2	62-65	59,5-67	59,1-65,5	70,0	62,7-72,1	65

1, *Halobacterium* ; 2, *Haloarcula* ; 3, *Halococcus* ; 4, *Haloferax* ; 5, *Halobaculum* ; 6, *Halorubrum* ; 7, *Halomicrobium*.

**Tableau 27.** Caractéristiques différenciant les genres d'halobactéries (suite).

Propriétés	8	9	10	11	12	13	14
Pigmentat.	Rouge	Rose-rouge	Rouge	Rose	Rose-rouge	Rouge	Rouge
Morphologie cellulaire	Bât. pléomo.	Bât.	Bât.ou bât. pléomorphe	Bât. ou bât pléomorphe	Cocci ou bâtonnet	Cocci ou bâtonnet	Bât.
Taille cellulaire ( $\mu\text{m}$ )	0,5-1,0 $\times$ 2-10	nd	0,6-1 $\times$ 1-6	1-2 $\times$ 1-3	1,5-2,0 ou 1-4 $\times$ 2-13	0,5-1,5 $\times$ 2-8	0,5-0,7 $\times$ 10-15
Gamme de NaCl (M)	1,5-5,2	3,4-5,2	nd	2,5-5,2	> 2	3,4-5,2	2,0-5,2
Optimum de NaCl (M)	3,4-4,3	4,3	3,4-4,3	3,4-4,3	2,5-4,3	4,3	3,0
Exige Mg <sup>2+</sup>	+	+	+	+	+	+	-
Temp. optimale (°C)	50	37-40	37-40/nd	40	37-50	37-40	37
pH optimum	7-7,5	7	7,2-7,6	7,0	7, 0-7,5	nd	9,5
Crois. en anaérobiose :							
- Nitrate	+	nd	nd	+	nd	+	-
- L-Arginine	-	-	nd	-	-	-	nd
Crois. sur les sucres	+	+	nd	+	v	+	-
Prod. d'acides à partir de sucres	+	+	-	nd	+	+	-
Hydrolyse de :							
- Amidon	-	-	-	-	-	-	-
- Gélatine	-	-	+	+	v	+	+
- Tween 80	nd	nd	nd	nd	v	+	nd
Glycolipides caractéristique	STGD1, TGD1	S <sub>2</sub> DGD, STeGD	non identifié	GL	S <sub>2</sub> DGD	STGD1, TGD1	non identifié
GC (%)	64,0	64,4	69,9	59,1	59,2-60,1	66,9	65,0

8, *Halorhabdus* ; 9, *Halosimplex* ; 10, *Natrinema* ; 11, *Halogeometricum* ; 12, *Haloterrigena* ; 13, *Halobiforma* ; 14, *Natronobacterium*.

**Tableau 27.** Caractéristiques différenciant les genres d'halobactéries (suite).

Propriétés	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Pigment.	Rouge	Rouge	claire	Rouge	Rouge	Rose clair	Rouge	Rose	Rose
Morphologie cellulaire	Cocci	Pléom	Bât.	Bât. ou bât. pléom.	Cocci	Bât. ou bât. pléom.	Bât., disques	Bât. ou bât. pléom.	Cocci
Taille cellulaire (µm)	1-2	nd	0,5-1 × 1-5	0,8 × 1-3	1-3	0,4-0,5 × 4-5	0,5 × 1,5-6	0,5-1 × 1-3	1,0-1,5
Gamme de NaCl (M)	1,4-5,2	1,7-5,2	2,0-5,2	2,0-5,2	2,0-5,2	2,5-4,3	1,7-5,2	2,5-5,0	0,8-5,1
Optimum de NaCl (M)	2,3-3,8	3,5	2,5-3,8	3,5	3,4	3,4	2,5	3,4	3,1
Exige Mg <sup>2+</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Temp. optimale (°C)	35-45	45	35-45	45	40	37	37-43	37	25-30
pH optimum	9,0-9,5	9,0-9,5	9,0-9,5	8,5-9,5	8,5-10,5	7,0-7,5	9,0	7,0-8,0	6,0-6,5
Crois. en anaérobiose :									
- Nitrate	nd	-	-/nd	+	nd	-	v	-	-
- L-Arginine	nd	-	nd	-	-	-	-	-	-
Crois. sur les sucres	nd	+	-/nd	nd	+	-	+		+
Prod. d'acides à à partir de sucre	nd	-	nd	nd	nd	v	nd	V	+
Hydrolyse de :									
- Amidon	v	-	v	-	-	-	-	+	+
- Gélatine	nd	v	+/nd	+	-	+	-	-	+
- Tween 80	nd	-	nd	nd	-	+	+	-	+
Glycolipides caractér.	-	-	S <sub>2</sub> DGD 1	-	-	Nouv. GL	-	Nouv. GL	Nouv. GL
GC (%)	63,5-64,0	59,9-60,1	60,0-63,1	61,2-64,3	65,0	60,3	59,0-63,0	61,0	60,5

nd, non déterminé ; v, variable ; GL, glycolipide ; bât, bâtonnet ; +, positif ; -, négatif.

15, *Natronococcus* ; 16, *Natronobacterium* ; 17, *Natrialba* ; 18, *Natronomons* ; 19, *Halalkalicoccus* ; 20, *Halovivax* ; 21, *Natronolimnobi* ; 22, *Halostagnicola*, 23, *Haladaptatus*.

## Annexe 10. Courbes de quantification des sondes

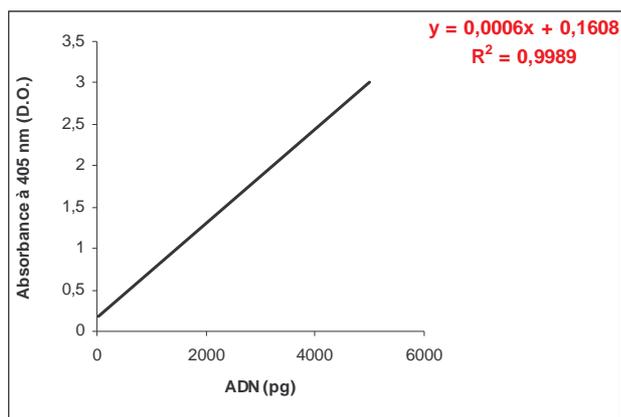


Figure 32. Courbe étalon de quantification de l'ADN marqué de la souche 5.1.

Y : l'absorbance à 405 nm

X : la concentration d'ADN

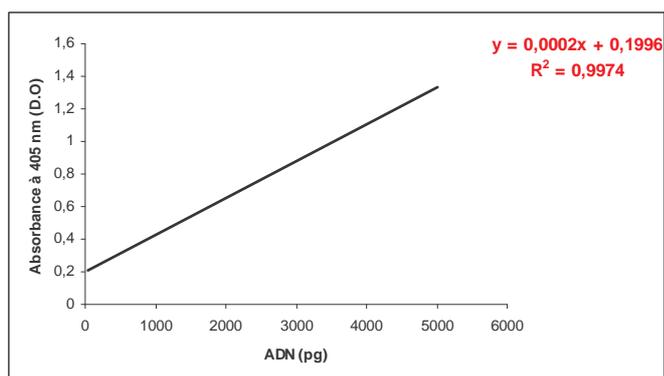


Figure 34. Courbe étalon de quantification de l'ADN marqué de la souche S1.

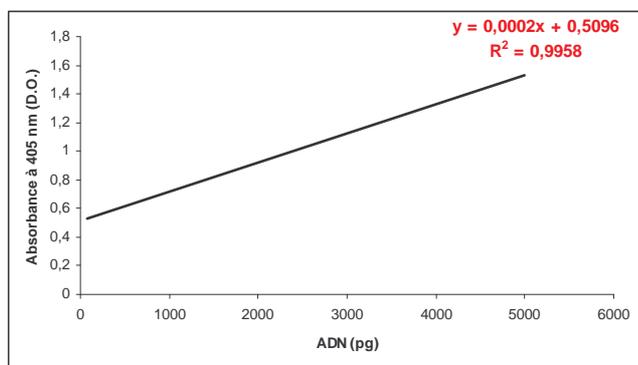


Figure 40. Courbe étalon de quantification de l'ADN marqué de la souche B2.