

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantin I University
Université Frères Mentouri Constantine I

UNIVERSITE FRERES MENTOURI
CONSTANTINE

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

N° d'ordre : 31/D3C/2020

N° de série : 04/MB/2020

Thèse

Présentée pour l'obtention

Du Diplôme de Doctorat de 3^{ème} cycle

En Biotechnologies Microbiennes, Génomes et Environnement

Par

SMATI Maria

Thème :

**Etude de la biodiversité des bactéries actinomycétales
dans les zones humides d'Ezzemoul, Djendli et Tinsilt
par des approches culturelles et moléculaires**

Soutenue le : 08 juillet 2020

Membres de jury :

Président	Mr. BENHIZIA Yacine	Professeur	UFM Constantine 1
Directeur de thèse	Mr. KITOUNI Mahmoud	Professeur	UFM Constantine 1
Examineur	Mr. BOUDEMAGH Allaoueddine	Professeur	UFM Constantine 1
Examineur	Mr. BELAHCEN Miloud	Professeur	C. U. Ain Témouchent

Année universitaire : 2019-2020

DEDICACES

Je dédie affectueusement cette thèse,

A mon défunt père Djamel

Merci car tu as été pour moi le meilleur papa au monde.

Je t'aime papa et je ne t'oublierai jamais. Que Dieu tout puissant t'accueille dans son vaste paradis.

A ma très chère mère Samia

Tu es la plus douce et la plus merveilleuse de toutes les mamans.

Tu t'es sacrifié pour moi et tu n'as jamais cessé de m'aider, de me soutenir et de m'encourager.

Je te suis très reconnaissante, et je ne te remercierai jamais assez pour ton amour et pour tout ce que tu as fait pour moi tout au long de ma vie.

Je t'aime maman. Que Dieu te protège et te procure santé, bonheur et longue vie.

A mon cher époux Oualid, pour ses encouragements, son soutien et sa patience.

A mes petites princesses Sofia et Mellina qui ont illuminé ma vie et qui m'ont bien boosté.

A toute ma famille et à tous mes amis.

Maria

REMERCIEMENTS

Ce travail n'aurait pu voir le jour sans le concours de nombreuses personnes qui ont permis de le mener à bien. Ces remerciements trop courts leur son adressées.

*Ils vont tout d'abord à mon directeur de thèse, Monsieur **KITOUNI Mahmoud**, Professeur à l'université frères Mentouri Constantine 1, qui par son intérêt, ses exigences et ses précieux conseils a su instiller les impulsions nécessaires à l'accomplissement de ce travail de recherche. Ses enseignements intellectuellement féconds et ses qualités profondément humaines ont été remarquables.*

*Bien sûr, j'adresse, encore, mes remerciements respectueux à Monsieur **BENHIZIA Yacine**, Professeur à l'université frères Mentouri Constantine 1, qui m'a fait l'insigne honneur de présider le jury de cette thèse.*

*Je remercie sincèrement Monsieur **BOUDEMAGH Allaoueddine**, Professeur à l'université frères Mentouri Constantine 1, et Monsieur **BELAHCEN Miloud**, Professeur au centre universitaire Ain Témouchent, d'avoir accepté de consacrer leur temps pour juger ce travail.*

REMERCIEMENTS

*Je tiens également à remercier Monsieur le **Pr. BOULAHROUF Abderrahmane** de m'avoir permis d'avoir accès au laboratoire de Génie Microbiologique et Applications de l'université frères Mentouri Constantine 1.*

*Un grand merci également à Madame la directrice **BINET Françoise**, qui a accepté de m'accueillir plusieurs fois dans son laboratoire de l'UMR 6553 CNRS « Ecosystèmes Biodiversité, Evolution, (ECOBIO) », de l'université de Rennes 1 en France.*

*Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Mademoiselle **MONARD Cécile**, chargée de recherche CNRS, pour sa précieuse aide lors des travaux moléculaires, surtout pour la PCR et le séquençage.*

*Ma reconnaissance va également à Monsieur **LIMA Oscar**, ingénieur d'études CNRS, de m'avoir beaucoup aidé et initié au clonage moléculaire.*

*Je souhaite aussi remercier mon collègue **DJABALLAH Chamseddine** pour toute l'aide qui m'a apportée et dès que j'en avais besoin.*

Enfin, j'exprime toute ma gratitude à toutes les personnes que je n'ai pas citées ici et qui ont permis que ce travail se réalise.

VALORISATION DES TRAVAUX DE THESE

Publication scientifique

SMATI, M. and KITOUNI, M. (2019). Diversity of actinobacteria in the marshes of Ezzemoul and Djendli in northeastern Algeria. *EJE*, 5(2): 41-53, doi:10.2478/eje-2019-0009

Conférences

SMATI Maria, KITOUNI Mahmoud, MONARD Cécile, BINET Françoise : **Biodiversité des bactéries actinomycétales isolées de sebkhet Ezzemoul**. 1^{er} colloque international de la biologie appliquée (CIBA 2015), 29 novembre-1 Décembre 2015, Oran (Algérie).

SMATI Maria, KITOUNI Mahmoud, MONARD Cécile, BINET Françoise: **Biodiversity of Actinomycetales bacteria of Chott Tinsilt**. The 1st International Conference Microbial Ecology: Towards New Challenges, 12-14 Décembre 2015, Sétif (Algérie).

SMATI Maria, KITOUNI Mahmoud: **Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des actinobactéries, isolées de la sebkha de Djendli**. VIIème congrès international de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Ressources organisé par l'AT-BVBR, 20-23 Mars 2019, Tabarka (Tunisie).

Résumé

Une combinaison de techniques culturale et indépendante de la culture (métagénomique par clonage moléculaire), a été utilisée pour étudier la biodiversité des actinobactéries halophiles et halotolérantes, vivant dans les sols de la sebkha d'Ezzemoul, du chott Tinsilt et de la sebkha de Djendli (situés dans le Nord-Est de l'Algérie). Ces écosystèmes sont principalement, extrêmement salés, alcalins, avec des taux faibles d'humidité. Selon l'analyse phylogénétique des séquences du gène de l'ADNr 16S : 40 isolats du site Ezzemoul sont assignés aux espèces des genres *Nocardiopsis* (dominant), *Streptomyces* et *Rhodococcus* ; 42 autres isolats du site Tinsilt sont attribués à *Streptomyces* (dominant), *Nocardiopsis*, *Actinopolyspora* et *Brevibacterium* ; et 22 isolats du site Djendli appartiennent aux mêmes genres *Streptomyces* (dominant) et *Nocardiopsis*. Parmi tous ces isolats, il y a une forte probabilité de la présence de nombreuses nouvelles espèces. De plus, 24 séquences de clones dérivées du site Ezzemoul, sont affiliées aux genres *Demequina* (dominant), *Plantactinospira*, *Friedmanniella* et *Mycobacterium*. Aussi, 15 séquences de clones issues du site Djendli, sont reliées aux genres *Marmoricola*, *Phytoactinopolyspora* et *Streptomyces* ; et à un clone d'actinobactéries non classifié. Certaines séquences (des deux sites) sont apparentées à des clones non cultivables et/ou n'appartenant pas à la classe *Actionbacteria* (dominants dans le site Djendli). Par ailleurs, les isolats obtenus à partir des trois sites d'étude, sont : halophiles et halotolérants modérés, mésophiles, neutrophiles ou acido-alcali-tolérants. Plusieurs d'entre eux peuvent produire en même temps, des enzymes extracellulaires hydrolytiques comme la cellulase, l'amylase, la lipase, la pectinase et les protéases ; ainsi que des molécules bioactives contre les bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*) et les champignons (*Candida albicans* et *Aspergillus niger*). Les résultats de cette recherche montrent une grande diversité taxonomique, physiologique et métabolique des actinobactéries, provenant de sebkhas et de chott. Ces bactéries peuvent donc, être d'excellentes candidates pour de futures applications biotechnologiques.

Mots clés : Biodiversité, lacs salés, actinobactéries halophiles, actinobactéries halotolérantes, métagénomique, clonage, biotechnologie.

Abstract

A combination of cultural and culture-independent (the latter is metagenomics by molecular cloning) techniques, was used to study the biodiversity of halophilic and halotolerant *Actinobacteria*, living in Ezzemoul sebkha, Chott Tinsilt and Djendli sebkha soils (located in northeastern Algeria). These ecosystems are mainly, extremely saline, alkaline, with low moisture content. According to the phylogenetic analysis of the 16S rDNA gene sequences: 40 isolates from the Ezzemoul site are assigned to species of the genera *Nocardiopsis* (dominant), *Streptomyces* and *Rhodococcus*; Another 42 isolates from the Tinsilt site are attributed to *Streptomyces* (dominant), *Nocardiopsis*, *Actinopolyspora* and *Brevibacterium*; and 22 isolates from the Djendli site belong to the same genera *Streptomyces* (dominant) and *Nocardiopsis*. Among all these isolates, there is a high probability of the presence of many new species. In addition, 24 clone sequences derived from the Ezzemoul site are affiliated with the genera *Demequina* (dominant), *Plantactinospora*, *Friedmanniella* and *Mycobacterium*. Also, 15 clone's sequences from the Djendli site are related to the genera *Marmoricola*, *Phytoactinopolyspora* and *Streptomyces*; and to an unclassified actinobacterial clone. Some sequences (from both sites) are related to uncultured clones and/or not belonging to the class *Actinobacteria* (dominant in the site Djendli). Furthermore, the isolates obtained from the three study sites are: moderately halophilic and halotolerants, mesophilic, neutrophilic or acid-alkali-tolerant. Several of them can produce at the same time, extracellular hydrolytic enzymes such as cellulase, amylase, lipase, pectinase and proteases; as well as bioactive molecules against Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*) and fungi (*Candida albicans* and *Aspergillus niger*). The results of this research show a wide taxonomic, physiological and metabolic diversity of *Actinobacteria*, from sebkhas and chott. These bacteria can therefore be excellent candidates for future biotechnological applications.

Key words: Biodiversity, saline lakes, halophylic *Actinobacteria*, halotolerant *Actinobacteria*, metagenomics, cloning, biotechnology.

ملخص

تم استخدام مجموعة من التقنيات الزراعية والمستقلة عن الزراعة (métagenomique) لدراسة التنوع البيولوجي للأكتينوبكتيريا المحبة والمطيفة للملوحة، التي تعيش في تربة سبخة الزمول، شط تنسلت، و سبخة جندلي (الموجودين في شمال شرق الجزائر). هذه النظم الإيكولوجية هي في الأساس مالحة للغاية قلووية، وذات نسبة منخفضة من الرطوبة. وفقا لتحليل جينات الحمض النووي الريبي 16S : تم تعيين 40 عزلة من موقع الزمول تنتمي لأجناس *Nocardiopsis* (المهيمن)، *Rhodococcus* و *Streptomyces* ؛ 42 عزلة أخرى من موقع تنسلت والتي تنتمي لأجناس *Streptomyces* (المهيمن)، *Nocardiopsis* ، *Actinopolyspora* و *Brevibacterium* ؛ و 22 عزلة من موقع جندلي تنتمي إلى نفس الأجناس *Streptomyces* و *Nocardiopsis*. بين جميع هذه العزلات، هناك احتمال كبير لوجود العديد من الأنواع الجديدة. بالإضافة إلى ذلك 24 سلسلة مستنسخة مشتقة من موقع الزمول ترتبط بأجناس *Demequina* (المهيمن)، *Plantactinospora* ، *Friedmanniella* و *Mycobacterium*. أيضا، 15 سلسلة مستنسخة من موقع جندلي ترتبط بأجناس *Marmoricola* ، *Phytoactinopolyspora* و *Streptomyces*؛ ومستنسخ *Actinobacteria* غير مصنف. ترتبط بعض السلاسل (من كلا الموقعين) بالمستنسخات غير قابلة للزرع و/أو لا تنتمي إلى *Actinobacteria* (المهيمنة في موقع جندلي). بالإضافة إلى ذلك، فإن العزلات التي تم الحصول عليها من مواقع الدراسة الثلاثة هي محبة و مطيفة للملوحة بصفة معتدلة، أليفة الحرارة المعتدلة، متعادلة أو مطيفة للحموضة و القلووية. يمكن للعديد منهم إنتاج، في نفس الوقت، إنزيمات محللة خارج الخلية مثل السلولاز، الأميلاز، الليباز، البكتيناز والبروتيناز؛ و كذلك الجزيئات النشطة بيولوجيا ضدالبكتيريا الموجبة الجرام (*Staphylococcus aureus* و *Bacillus subtilis*) والفطريات (*Candida albicans* و *Aspergillus niger*). تظهر نتائج هذا البحث تنوعا تصنيفيا، فسيولوجيا، و أيضا كبيرا للـ *Actinobacteria* ، الآتية من الشط و السبخات. لذلك يمكن أن تكون هذه البكتيريا في المستقبل، مرشحة ممتازة لتطبيقات التكنولوجيا الحيوية.

الكلمات المفتاحية: التنوع البيولوجي، أكتينوبكتيريا محبة و مطيفة للملوحة ، البحيرات المالحة، ميتاجنومكس، إستنساخ، التكنولوجيا الحيوية.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique du cycle de vie des actinomycètes (Barka <i>et al.</i> , 2016).....	8
Figure 2 : Dessins schématiques des différents types de chaînes de spores produites par les actinomycètes (Barka <i>et al.</i> , 2016).....	9
Figure 3 : Organisation du gène codant pour l'ARNr (Boisset, 2008).....	25
Figure 4 : Représentation schématique du gène codant pour l'ARNr 16S. Les cercles représentent les régions conservées utilisées pour le design d'amorces nécessaires à l'amplification et au séquençage (Reller <i>et al.</i> , 2007).....	25
Figure 5 : exemples de deux d'électrophorégramme A et B.....	33
Figure 6 : Photo de la vue générale de la sebkha d'Ezzemoul.....	35
Figure 7 : Photo de la vue générale de Chott Tinsilt	36
Figure 8 : Photo de la vue générale de la sebkha de Djendli	37
Figure 9 : Situation géographique des zones humides des hauts plateaux de l'Est de l'Algérie. Les trois zones de cette étude (Ezzemoul, Tinsilt et Djendli) se trouvent en haut à gauche de la figure. C : Chott et G : Garaet (Houhamdi <i>et al.</i> , 2009).....	38
Figure 10 : Schéma du processus d'échantillonnage par site. E ₁ : Echantillon prélevé de la partie du site contenant de la végétation (rhizosphère), E ₂ : Echantillon prélevé de la partie du site où il y a moins de végétation, E ₃ : Echantillon prélevé de la partie du site où il n'y a pas de végétation. Chacun des échantillons E ₁ , E ₂ , E ₃ est prélevé trois fois (X1, X2, X3) à une distance de 5 m entre X1, X2, X3.....	39
Figure 11 : Photos des échantillons de sol. (EE ₁) Echantillon n° 1 de la sebkha d'Ezzemmoul, (EE ₂) Echantillon n°2 de la sebkha d'Ezzemmoul, (EE ₃) Echantillon n°3 de la sebkha d'Ezzemmoul, (TE ₁) Echantillon n° 1 de chott Tinsilt, (TE ₂) Echantillon n° 2 de chott Tinsilt, (TE ₃) Echantillon n° 3 de chott Tinsilt, (DE ₁) Echantillon n°1 de la sebkha de Djendli, (DE ₂) Echantillon n°2 de la sebkha de Djendli, (DE ₃) Echantillon n°3 de la sebkha de Djendli. 1 : Echantillon prélevé de la partie du site contenant de la végétation (rhizosphère), 2 : Echantillon prélevé de la partie du site où il y a moins de végétation, 3 : Echantillon prélevé de la partie du site où il n'y a pas de végétation...40	40
Figure 12 : Echelle internationale de classification des particules minérales du sol (Aubert, 1978).....	42
Figure13 : Propriétés physicochimiques des échantillons de sol.....	59
Figure 14 : Arbre phylogénétique enraciné construit par la méthode de Neighbor-Joining montrant la relation des isolats du site Ezzemoul avec les espèces les plus proches des genres <i>Nocardiopsis</i> , <i>Streptomyces</i> et <i>Rhodococcus</i> . Les valeurs de Bootstrap supérieures à 50% (après 1000 réplifications) sont représentées sur les noeuds. Les numéros d'accension de chaque séquence sont représentés entre parenthèses. <i>Archaeoglobus infectus</i> Arc51 ^T est utilisée comme outgroup. L'échelle 0,05 représente le nombre de substitution par position de nucléotide et estime la divergence des séquences. EO, (EC, ES) et ED sont les isolats des concentrations 2%, 5% et 10% d'NaCl, respectivement.....	68
Figure 14 (a) : Clade de la famille des <i>Nocardiopsaceae</i> (genre <i>Nocardiopsis</i>).....	69

Figure 15 : Arbre phylogénétique enraciné construit par la méthode de Neighbor-Joining montrant la relation de l'isolat ES42 du site Ezzemoul avec les espèces les plus proches du genre <i>Streptomyces</i> . Les valeurs de Bootstrap supérieures à 50% (après 1000 réplifications) sont représentées sur les noeuds. Les numéros d'accèsion de chaque séquence sont représentés entre parenthèses. <i>Salinactinospora qingdaonensis</i> CXB832 ^T est utilisée comme outgroup. L'échelle 0,01 représente le nombre de substitution par position de nucléotide et estime la divergence des séquences.....	70
Figure 16 : Arbre phylogénétique enraciné construit par la méthode de Neighbor-Joining montrant la relation de l'isolat ES72 du site Ezzemoul avec les espèces les plus proches du genre <i>Rhodococcus</i> . Les valeurs de Bootstrap supérieures à 50% (après 1000 réplifications) sont représentées sur les noeuds. Les numéros d'accèsion de chaque séquence sont représentés entre parenthèses. <i>Salinactinospora qingdaonensis</i> CXB832 ^T est utilisée comme outgroup. L'échelle 0,01 représente le nombre de substitution par position de nucléotide et estime la divergence des séquences.....	71
Figure 17 (a) : Clade de la famille des <i>Streptomycetaceae</i> (genre <i>Streptomyces</i>).....	76
Figure 17 (b) : Clade de la famille des <i>Nocardiopsaceae</i> (genre <i>Nocardiopsis</i>).....	77
Figure 17 (c) : Clade de la famille des <i>Brevibacteriaceae</i> (genre <i>Brevibacterium</i>).....	77
Figure 18 : Arbre phylogénétique non enraciné construit par la méthode de Neighbor-Joining, montrant la relation de l'isolat TG27 du site Tinsilt avec les espèces les plus proches du genre <i>Brevibacterium</i> . Les valeurs de Bootstrap aux noeuds représentent le pourcentage après 1000 réplifications. Les numéros d'accèsion de chaque séquence sont représentés entre parenthèses. L'échelle 0,002 représente le nombre de substitution par position de nucléotide et estime la divergence des séquences.....	78
Figure 19 : Arbre phylogénétique non enraciné construit par la méthode de Neighbor-Joining montrant la relation des isolats TG18 et TG19 du site Tinsilt avec les espèces les plus proches de genre <i>Streptomyces</i> . Les valeurs de Bootstrap supérieures à 50% (après 1000 réplifications) sont représentées sur les noeuds. Les numéros d'accèsion de chaque séquence sont représentés entre parenthèses. L'échelle 0,002 représente le nombre de substitution par position de nucléotide et estime la divergence des séquences.....	78
Figure 20 : Arbre phylogénétique enraciné construit par la méthode de Neighbor-Joining montrant la relation des isolats du site Djendli avec les espèces les plus proches des genres <i>Nocardiopsis</i> et <i>Streptomyces</i> . Les valeurs de Bootstrap supérieures à 50% (après 1000 réplifications) sont représentées sur les noeuds. Les numéros d'accèsion de chaque séquence sont représentés entre parenthèses. <i>Mzabimyces algeriensis</i> H195 ^T est utilisée comme outgroup. L'échelle 0,01 représente le nombre de substitution par position de nucléotide et estime la divergence des séquences. DK et DH sont les isolats des concentrations 2% et 5% d'NaCl, respectivement.....	81
Figure 21 : Aspect des colonies de quelques isolats sur les milieux de culture ISP2 (A, B, C et D) et ISP5 (E, F, G, et H). (A) : isolat DK14 ; (B) : isolat DH24 ; (C) : isolat : TJ4 ; (D) : TF5 ; (E) : isolat TG12 ; (F) : isolat TG3 ; (G) : isolat ES72 ; (H) : isolat EO10 et (I) : isolat ED2.....	85

Figure 22: Mise en évidence des activités hydrolytiques et action sur lait écrémé, de quelques isolats. A et B : hydrolyse de l'amidon, C et D : hydrolyse de la cellulose, E : hydrolyse de la pectine, F : hydrolyse du Tween 80, G : hydrolyse de la caséine, H : coagulation du lait écrémé, I : peptonisation du lait écrémé.....95

Figure 23 : Test d'activité antimicrobienne de quelques isolats contre : (A et B) *Staphylococcus aureus* ; (C) *Bacillus subtilis* ; (D) *Candida albicans* et (E et F) *Aspergillus niger*.....99

Figure 24 : Arbre phylogénétique enraciné construit par la méthode de Neighbor-Joining, montrant les relations phylogénétiques des séquences du gène ADNr 16S partiel des clones du site Ezzemoul (EZ) et ceux du site Djendli (DJ), avec les séquences les plus proches de la base de données EzBioCloud. Les valeurs de bootstrap supérieures à 50% (pour 1000 répliquions) sont affichées sur les nœuds. M1 et M2 représentent, respectivement la 1^{ère} et la 2^{ème} méthode de clonage. *Salinivibrio costicola* ATCC 35508^T est utilisé comme outgroup. L'échelle 0,02 représente le nombre de substitution par position de nucléotide et estime la divergence des séquences.....112

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Principales zones humides des hautes plaines de l'Est algérien (Houhamdi <i>et al.</i> , 2009).....	6
Tableau 2 : Types de paroi chez les actinobactéries (Prescott <i>et al.</i> , 2010).....	10
Tableau 3 : Sucres cellulaires totaux des actinobactéries (Prescott <i>et al.</i> , 2010).....	10
Tableau 4 : Liste de la plupart des espèces valides d'actinobactéries halophiles et halotolérantes (Maheshwari, 2015 ; Hamedi <i>et al.</i> , 2013).....	13
Tableau 5 : Signatures basées sur les séquences du gène codant pour l'ARNr 16S de trois familles d'actinobactéries (Goodfellow, 2015).....	23
Tableau 6 : Composition du mélange réactionnel (pour une réaction PCR).....	45
Tableau 7 : Programme de PCR.....	45
Tableau 8 : Composition du mélange réactionnel (pour une réaction PCR).....	52
Tableau 9 : Programme de PCR du couple d'amorces Act 1159R/Eub 338F.....	52
Tableau 10 : Programme de PCR du couple d'amorces S-C-Act-878-a-A-19/ S-C-Act-235-a-S-20 selon le protocole « Touchdown » (Roux, 1995).....	53
Tableau 11 : Composition du mélange réactionnel (pour une réaction PCR).....	55
Tableau 12 : Programme de PCR.....	55
Tableau 13 : Composition du mélange réactionnel (pour une réaction PCR).....	57
Tableau 14 : Programme de PCR.....	57
Tableau 15 : Propriétés physicochimiques des échantillons de sol.....	58
Tableau 16 : Echelle d'interprétation du pH.....	58
Tableau 17 : Type de sol en fonction de la salinité et de la conductivité électrique.....	59
Tableau 18: Classification des sols selon le pourcentage d'humidité et de matière organique (Lee et Hwang, 2002).....	59
Tableau 19 : Dénombrement de la flore totale sur trois milieux contenant 2 % de NaCl, à partir des sols d'Ezzemoul sans prétraitement.....	60
Tableau 20 : Dénombrement de la flore totale sur le milieu ISP5 contenant 2 % de NaCl, après prétraitements thermique et chimique des sols d'Ezzemoul.....	61
Tableau 21 : Dénombrement des actinobactéries et des autres microorganismes, isolés des trois sites, en fonction des concentrations de NaCl additionnées au milieu ISP5.....	62
Tableau 22 : Isolats d'actinobactéries purifiés et conservés, par échantillon et par concentration de NaCl additionnée à ISP5.....	63

Tableau 23 : Identification taxonomique des isolats de la sebkha d'Ezzemoul.....	66
Tableau 24 : Identification taxonomique des isolats de chott Tinsilt.....	72
Tableau 25 : Identification taxonomique des isolats de la sebkha de Djendli.....	79
Tableau 26 : Croissance des isolats d'actinobactéries de la sebkha d'Ezzemoul, à différentes concentrations de NaCl, à différentes valeurs de température et de pH.....	89
Tableau 27: Croissance des isolats d'actinobactéries du chott de Tinsilt, à différentes concentrations de NaCl, à différentes valeurs de température et de pH.....	90
Tableau 28 : Croissance des isolats d'actinobactéries isolées de la sebkha de Djendli, à différentes concentrations de NaCl, à différentes valeurs de température et de pH	92
Tableau 29 : Biodiversité métabolique des isolats d'actinobactéries de la sebkha d'Ezzemoul.....	95
Tableau 30: Biodiversité métabolique des isolats d'actinobactéries du chott de Tinsilt.....	96
Tableau 31 : Biodiversité métabolique des isolats d'actinobactéries de la sebkha de Djendli.....	97
Tableau 32 : Nombre d'actinobactéries actives provenant de divers sites.....	99
Tableau 33 : Nombre en (%) des isolats d'actinobactéries actives contre chaque microorganisme-cible, provenant des trois sites d'étude.....	100
Tableau 34 : Activité antimicrobienne des isolats d'actinobactéries de la sebkha d'Ezzemoul.....	104
Tableau 35 : Activité antimicrobienne des isolats d'actinobactéries du chott de Tinsilt.....	105
Tableau 36 : Activité antimicrobienne des isolats d'actinobactéries de la sebkha de Djendli.....	106
Tableau 37 : Identification moléculaire et affiliation des clones d'actinobactéries du site Ezzemoul.....	108
Tableau 38 : Identification moléculaire et affiliation des clones d'actinobactéries du site Djendli.....	110
Tableau 39 : Genres d'actinobactéries retrouvés dans les sebkhas d'Ezzemoul et de Djendli par la méthode culturale et non culturale.....	113

Table des matières

Résumé

Abstract

ملخص

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
1. Zones humides.....	4
1.1. Définition d'une zone humide.....	4
1.2. Lacs salés : chott et sebkha ou garaet.....	4
1.3. Mesures de conservation des zones humides (convention de Ramsar).....	4
1.4. Zones humides des hautes plaines de l'Est algérien.....	5
2. Propriétés générales des actinobactéries.....	7
3. Actinobactéries halophiles et halotolérantes.....	11
4. Diversité taxonomique des actinobactéries halophiles et halotolérantes.....	11
5. Adaptation des actinoactéries au concentration élevées de sel.....	14
6. Diversité écologique et distribution des actinobactéries halophiles et halotolérantes.....	16
7. Importance biotechnologique des actinobactéries halophlies et halotolérantes...	17
7.1. Production de composés antimicrobiens, antiviraux et thérapeutiques.....	17
7.2. Biodégradation de produits chimiques.....	18
7.3. Production d'enzymes d'importance industrielle.....	19
7.4. Autres applications potentielles.....	20
8. Méthodes d'étude de la biodiversité bactérienne dans le sol.....	20
8.1. Approche culturale.....	21
8.2. Approche moléculaire.....	22
8.2.1. ARNr 16S et phylogénie.....	22
8.2.2. Métagénomique.....	27
8.2.3. Clonage et séquençage de l'ADNr 16S.....	28
8.2.3.1. Extraction et purification de l'ADN bactérien du sol.....	28
8.2.3.2. Méthode de la PCR.....	29
8.2.3.3. Clonage moléculaire.....	29

8.2.3.4. Séquençage de Sanger.....	31
8.2.3.5. Séquençage de nouvelle génération.....	34
MATERIEL ET METHODES	
1. Sites d'étude.....	35
1.1. Sebkha d'Ezzemoul.....	35
1.2. Chott Tinsilt.....	35
1.3. Sebkha de Djendli.....	36
2. Echantillonnage.....	39
3. Etude physico-chimique des échantillons.....	41
3.1. Mesure du pH.....	41
3.2. Détermination de la conductivité électrique CE et de la salinité.....	41
3.3. Pourcentage d'humidité.....	41
3.4. Taux de la matière organique.....	41
3.5. Granulométrie.....	42
4. Prétraitement des échantillons.....	42
5. Isolement, dénombrement et conservation des isolats.....	42
5.1. Isolement.....	42
5.2. Dénombrement.....	43
5.3. Conservation.....	43
6. Identification moléculaire.....	44
6.1. Extraction de l'ADN génomique.....	44
6.1.1. Extraction de l'ADN par une lyse chimique alcaline.....	44
6.1.2. Extraction de l'ADN par choc thermique.....	44
6.3. Amplification des séquences des gènes ADNr 16S.....	45
6.4. Electrophorèse sur gel d'agarose à 1%.....	45
6.5. Séquençage capillaire.....	46
6.6. Analyse des séquences.....	46
7. Diversité macroscopique, physiologique et métabolique.....	47
7.1. Etude macroscopique et caractères cultureux.....	47
7.2. Etude physiologique.....	47
7.2.1. Tolérance au chlorure de sodium.....	47
7.2.2. Croissance à différentes températures.....	47
7.2.3. Croissance à différents pH.....	47

7.3. Etude métabolique.....	47
7.3.1. Production de pigments mélanoides.....	47
7.3.2. Mise en évidence de l'hydrolyse des polysaccharides.....	48
7.3.2.1. Hydrolyse de l'amidon.....	46
7.3.2.2. Hydrolyse de la cellulose.....	46
7.3.2.3. Hydrolyse de la pectine.....	47
7.3.3. Détermination de l'activité lipolytique : hydrolyse du Tween 80.....	47
7.3.4. Détermination de l'activité protéolytique.....	47
7.3.4. 1. Hydrolyse de la gélatine.....	48
7.3.4. 2. Hydrolyse de la caséine.....	49
7.3.4. 3. Action sur le lait écrémé.....	49
7.3.5. Dégradation des pesticides.....	49
7.4. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne.....	49
7.4.1. Microorganismes-tests.....	49
7.4.2. Activité antibactérienne.....	49
7.4.3. Activité antifongique.....	50
8. Clonage et séquençage de l'ADNr 16S (approche métagénomique).....	51
8.1. Extraction d'ADN génomique environnemental.....	51
8.1.1. Méthode de Griffiths <i>et al.</i> , (2000).....	51
8.1.2. Méthode au Kit FastDNA™ SPIN Kit for soil.....	51
8.2. Amplification des séquences des gènes ADNr 16S.....	52
8.3. Purification des amplicons des actinobactéries.....	53
8.4. Méthodes de clonage TA.....	53
8.4.1. Méthode au pGEM-T et pGEM-T Easy Vector (Promega).....	54
8.4.1.1. Ligation.....	54
8.4.1.2. Transformation d' <i>Escherichia coli</i> JM109 par choc thermique.....	54
8.4.1.3. Amplification par PCR et séquençage des inserts.....	55
8.4.2. Méthode au TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Life Technologies).....	55
8.4.2.1. Ligation.....	56
8.4.2.2. Transformation d' <i>Escherichia coli</i> DH5α par électroporation.....	56
8.4.2.3. Amplification par PCR et séquençage des inserts.....	56
RESULTATS ET DISCUSSION	
1. Analyses physicochimiques des échantillons de sol.....	58

2. Isolement et dénombrement.....	60
3. Analyse de la diversité phylogénétique des isolats d'actinobactéries.....	64
3.1. Diversité phylogénétique des isolats de la sebkha d'Ezzemoul.....	65
3.2. Diversité phylogénétique des isolats de chott Tinsilt.....	71
3.3. Diversité phylogénétique des isolats de la sebkha de Djendli.....	79
4. Diversité macroscopique physiologique et métabolique des souches.....	84
4.1. Etude macroscopique.....	85
4.2. Etude physiologique.....	86
4.3. Etude métabolique.....	88
4.4. Activité antimicrobienne des isolats d'actinobactéries.....	98
5. Approche métagénomique par clonage moléculaire.....	106
5.1. Analyse phylogénétique des clones d'actinobactéries.....	107
6. Comparaison entre la méthode culturale et la méthode non culturale (métagénomique).....	113
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	114
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	118
ANNEXES	
ARTICLE	

INTRODUCTION

Les actinobacéries, également connues sous le nom d'actinomycètes, sont des bactéries à coloration de Gram positives à forte teneur en G+C, caractérisées par un cycle de vie complexe, et constituent l'un des plus grands phylums bactériens (Ventura *et al.*, 2007). Ces bactéries sont ubiquitaires dans la nature et peuvent même être rencontrées dans les environnements extrêmes comme par exemple, les lacs salés, les banquises, les sources d'eau chaude, etc....Elles sont particulièrement abondantes dans le sol (Oskay *et al.*, 2004), où elles jouent un rôle essentiel dans la décomposition de la matière organique, comme la cellulose et la lignine. L'intérêt biotechnologique de ces microorganismes réside dans leur capacité à produire différents composés bioactifs (Naikpatil et Rathod, 2011), tels que : les enzymes, les vitamines, les antiparasitaires, les antiviraux, les immunostimulants, les immunosuppresseurs et les produits cosmétiques. Ils sont surtout réputés pour la production d'antibiotiques, car près de 80% des antibiotiques du monde proviennent d'actinomycètes, et principalement des genres *Streptomyces*, *Micromonospora* et *Nocardiopsis* (Pandey *et al.*, 2004). Plusieurs études récentes en Algérie, ont exprimé l'importance de certaines actinobactéries dans : la réduction de l'aflatoxine B1 (Lahoum *et al.*, 2017), la production d'enzymes (Gasmi et Kitouni, 2017) et la dégradation de fongicide (Hocinat et Boudemagh, 2015).

Parmi les actinobactéries, celles qui sont halophiles ou halotolérantes suscitent de plus en plus d'intérêt, aussi bien du point de vue taxonomique que du point de vue biotechnologique (Saker, 2015). Bien que les actinobactéries halophiles aient été découvertes, il y a plus de quatre décennies, la connaissance de leur biologie et de leur application industrielle potentielle n'est pas encore complètement étudiée (Hamedi *et al.*, 2015).

Les écosystèmes extrêmes non ou peu exploités, représentent un terrain de recherche très convoité, visant des espèces microbiennes rares ou nouvelles pouvant avoir un potentiel de production intéressant et bénéfique. En ce sens, les sols salés du Sahara algérien, exposés à des conditions climatiques arides, ont déjà fait l'objet d'études sur les actinobactéries halophiles, ainsi que leur production de métabolites secondaires (Harir *et al.*, 2017; Saker, 2015; Meklat *et al.*, 2011). Cependant, les actinomycètes halophiles et halotolérantes des zones humides algériennes ont rarement été mentionnés dans la littérature.

Les zones humides sont, sur le plan biologique, les plus importants et les plus productifs des écosystèmes sur terre (Bedford *et al.*, 1999). Ces hydrosystèmes sont reconnus pour leur rôle dans la migration et la reproduction des oiseaux d'eau ; et pour leurs valeurs économiques générés par l'extraction des minéraux, l'agriculture et les activités touristiques (Demnati *et al.*, 2017).

L'Algérie abrite plusieurs zones humides (chott, sebkha ou lac salé), dont 50 sont classés comme ayant une importance internationale en tant que sites Ramsar. La plus part d'entre elles sont endoréiques caractérisées par une grande diversité de paysages et d'espèces (Balla, 2012). Elles sont peu étudiées et encore peu détaillées, à l'exception de certaines études pédologiques (Aliat *et al.*, 2016; Chenchouni, 2009) et plusieurs d'autres sur la diversité de la faune (Bellagoune, 2015; Aberkane, 2014) et la flore (Neffar *et al.*, 2016; Chenchouni, 2009) ainsi que certains microorganismes halophiles (Kharroub, 2007) dont les actinomycètes (Boughachiche *et al.*, 2016; Kitouni *et al.*, 2005).

De nos jours, il est connu que la majorité des microorganismes dans l'environnement ne peuvent être cultivés, en utilisant des méthodes de culture conventionnelles ; de ce faite, la grande majorité du microbiote reste non découverte (Vartoukian *et al.*, 2010). Cette limitation a récemment encouragé l'utilisation des approches moléculaires indépendantes de la culture comme la métagénomique, pour détecter les incultivables et évaluer la diversité microbienne dans les habitats naturels et même extrêmes (Hozzein, 2015). Bien que de nombreuses nouvelles méthodes moléculaires aient été appliquées pour étudier la biodiversité et le rôle des microorganismes dans l'environnement, la culture reste utile pour comprendre le métabolisme et les fonctions de ces organismes, car elle rend possible la manipulation génétique, tout en confirmant certaines fonctions précieuses (Pham et Kim, 2012).

Jusqu'à présent, à notre connaissance, il y a peu ou pas de recherches sur la taxonomie des actinobactéries dans les zones humides. Par conséquent, nous nous sommes orientés vers la réalisation d'une étude sur la biodiversité des actinobactéries dans le sol de la sebkha d'Ezzemoul, la sebkha de Djendli et le chott Tinsilt, qui font partis de la région des Hauts Plateaux, située dans le Nord-est du pays. Cette dernière est caractérisée par un climat semi-aride. Ainsi, les sols de ces sebkhas et chott accumulent de grandes quantités de sels solubles, liées à la rareté de la pluie qui empêche une infiltration importante (Rengasamy, 2006) ; alors qu'en présence d'eau, la

dissolution des sels et l'ascension capillaire sont rapides, en raison d'une forte évaporation. Cela conduit à des sols salins avec des complexes de calcium, où certains de leurs sels dissous, sont facilement ramenés à la surface et d'autres sont précipités (Florea et Al-Joumaa, 1998).

Pour réaliser ce travail nous avons procédé par des approches culturelles et non culturelles (métagénomique par clonage moléculaire), en se basant sur l'analyse phylogénétique du gène ADNr 16S et nous nous sommes fixés comme objectifs :

- L'isolement, la purification et la mise en évidence des actinobactéries halophiles et halotolérantes dans les sites choisis.
- L'évaluation de la fréquence de ces dernières dans différents prélèvements.
- L'étude de la biodiversité phylogénétique, physiologique et métabolique des isolats d'actinobactéries.
- L'étude de la diversité des actinobactéries dans les écosystèmes choisis par une approche métagénomique.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Zones humides

1.1. Définition d'une zone humide

Selon le premier article de la convention de Ramsar (Ramsar, 1994) : les zones humides sont des étendues de marais, de fagnes, de tourbières ou d'eaux naturelles ou artificielles, permanentes ou temporaires, où l'eau est courante ou stagnante, douce, saumâtre ou salée, y compris des étendues d'eau marine dont la profondeur ne dépasse pas six mètres.

Selon l'article L211-1 du code de l'environnement : on entend par zone humide, les terrains exploités ou non, habituellement inondés ou gorgés d'eau douce, salée ou saumâtre de façon permanente ou temporaire ; la végétation quand elle existe, y est dominée par des plantes hygrophiles pendant au moins une partie de l'année.

1.2. Lacs salés : chott et sebkha ou garaet

Les écosystèmes salés sont caractérisés par une faible irrégularité des précipitations associées à une importante évaporation favorisant l'accumulation des sels dans le sol. L'Algérie se situe parmi les pays touchés, presque 3,2 millions d'hectares de sa surface sont considérés comme salins (Hamdy, 1999).

Les lacs salés sont classés en zones humides (Tiner, 2003), et à ce titre, ils sont protégés par le Traité international de Ramsar pour les zones humides, depuis 1971 (Ramsar, 2006). Dans une étude de Jellison *et al.*, (2008), ils ont constaté que seulement 10% des zones humides protégées à l'échelle internationale, sont des lacs salés. Différents termes locaux ont été utilisés pour caractériser les zones humides salines (Rosen, 1994). En Afrique du Nord et plus particulièrement en Algérie, les lacs salés sont considérés comme des chotts et des sebkhas ou garaets. Les termes chotts et sebkhas se réfèrent aux dépressions fermées, qui sont l'équivalent des lacs salés (Aubert, 1976). En 2002, Dubost, (2002) a décrit les chotts comme une zone salée entourant la sebkha (zones humides au fond des dépressions). Les Sebkhas sont considérées comme des dépressions fermées qui sont régulièrement inondées et accumulent des sels.

1.3. Mesures de conservation des zones humides (convention de Ramsar)

Les zones humides offrent une large variété de services aux agriculteurs et aux gens en général, les populations humaines peuvent être considérées à l'origine des causes de perte et de dégradation de ces écosystèmes fragiles, parmi ces causes :

l'intensification agricole, les pollutions agricoles et industrielles et le prélèvement d'eau.

La conservation des zones humides est essentielle non seulement pour l'approvisionnement en eau mais aussi pour la préservation de la biodiversité et pour assurer les services indispensables pour la santé et le bien-être des populations du monde entier (Barnaud, 1998).

La convention de Ramsar est un traité international pour la conservation et l'utilisation durable des zones humides, son titre officiel est : Convention relative aux zones humides d'importance internationale particulièrement comme habitat des oiseaux d'eau. La convention a été élaborée et adoptée par les nations participantes lors d'une réunion à Ramsar ; Iran 2 Février 1971 ; elle est rentrée en vigueur le 21 Décembre 1975. La liste des zones humides d'importance internationale contient actuellement 2282 sites, représentant une surface d'environ 220 667 273 hectares (Ramsar, 2017).

L'adhésion de l'Algérie à la convention de Ramsar a été effective en 1984, par le classement de deux sites sur la liste des zones humides d'importance internationale : le lac Tonga et le lac Obéira, situés tous les deux dans le complexe des zones humides d'El kala. A ce jour, 50 sites sont classés sur la liste de Ramsar, couvrant une superficie de 2 991 013 hectares (Ramsar, 2017).

1.4. Zones humides des hautes plaines de l'Est algérien

Ces hautes plaines, connus aussi sous le nom de plateaux du Sud constantinois, constituent l'un des complexes de zones humides parmi les plus vastes et diversifiés d'Algérie. Une vingtaine de zones humides naturelles (Chotts, Sebkhets et Garaets) composent cet éco-complexe qui s'étend sur près de 300 km d'Est en Ouest, à des altitudes variant entre 800 et 1200 m. Ces zones humides encore mal connues, sont dans leurs majorités, peu profondes, très salines et difficilement accessibles. La région des Hauts plateaux est enclavée entre les wilayas d'Oum El-Bouaghi, Batna et Khenchela, et elle est principalement caractérisée par un climat semi-aride à hivers froids et à étés très chauds. La plupart de ces écosystèmes aquatiques, dont la mise en eau est très dépendante de la pluviométrie, s'assèche dès le mois de juin (Houhamdi *et al.*, 2009 ; Maazi, 2009).

Les terres entourant ces zones sont utilisées depuis longtemps par les riverains pour cultiver des céréales, surtout du blé dur et de l'orge. Les étendues non cultivées sont occupées principalement par des crucifères (*Mauricondia arvensis*, *Matthiola*

fructicolosa et *Diplotaxis muralis*) et des chénopodiacées halophiles (*Atriplex halimus*, *Suaeda fruticosa* et *Salicornia fruticosa*) (Adjal et Mouici, 2004; Zemouchi et Ounissi, 2004).

Les principales zones humides des hauts plateaux de l'Est de l'Algérie sont citées dans le tableau 1. La sebkha d'Ezzemoul, le Chott Tinsilt et la sebkha de Djendli qui ont fait l'objet de cette étude sont décrits dans la partie matériel et méthodes.

Tableau 1. Principales zones humides des hautes plaines de l'Est algérien (Houhamdi *et al.*, 2009).

Zone humide	Coordonnées	Superficie	Statut de conservation
Garaet Tarf	35°38,420'N, 07°01,281'E	25500 ha	Site Ramsar (2004)
Garaet Ank Djemel	35°45,225'N, 06°54,442'E	6750 ha	Site Ramsar (2004)
Garaet El-Maghssel	35°49,581'N, 06°43,529'E	110 ha	Site Ramsar (2004)
Garaet Guellif	35°45,225'N, 06°54,442'E	5500 ha	Site Ramsar (2004)
Chott Tinsilt	35°53,975'N, 06°29,581'E	2154ha	Site Ramsar (2004)
Garaet Ezzemoul	35°53,137'N, 06°30,200'E	6765 ha	Site Ramsar (2009)
Lac de Timerganine	35°39,241'N, 06°57,468'E	1460 ha	Site Ramsar (2009)
Lac Boulhilet	35°44,542'N, 06°47,222'E	856 ha	Site Ramsar (2009)
Ougla Touila (Garaet Boucif)	35°47,829'N, 07°04,494'E	175 ha	Néant
Garaet Djendli	35°41,466'N, 06°31,193'E	3200 ha	Proposé site Ramsar
Garaet Gémot	35°38,303'N, 07°00,506'E	57 ha	Néant
Chott Melah	35°36,446'N, 07°05,136'E	85 ha	Néant
Chott Zehar	35°36,135'N, 07°03,314'E	76 ha	Néant
Sebkhet Ouled Amara	35°20,261'N, 07°15,429'E	340 ha	Néant
Sebkhet Ouled M'Barek	35°23,378'N, 07°20,315'E	950 ha	Néant

2. Propriétés générales des actinobactéries

Les actinobactéries ou traditionnellement les actinomycètes sont des bactéries riches en GC (dont l'ADN a une teneur en bases GC supérieure à 50 % par mole), Gram-positives, aérobies, mais elles se distinguent par la formation d'hyphes filamenteux qui se différencient pour produire des spores asexuées. Elles ressemblent fortement aux champignons par leur morphologie générale. Cette ressemblance résulte probablement en partie d'une adaptation aux mêmes habitats.

Les actinobactéries constituent un groupe de microorganismes fascinant. Ils sont la source de la plupart des antibiotiques utilisés en médecine aujourd'hui. Ils produisent aussi d'autres métabolites importants, employés dans différents domaines. Cet aspect pratique des actinomycètes est très étroitement lié à leur mode de croissance.

Le cycle biologique de nombreux actinomycètes comprend le développement de cellules filamenteuses, appelées hyphes, et de spores. Lorsqu'ils croissent sur un substrat solide comme le sol et la gélose, les actinobactéries développent un réseau ramifié d'hyphes. Ceux-ci poussent à la fois à la surface et à l'intérieur du substrat pour former un tapis dense d'hyphes, qu'on appelle mycélium végétatif (ou du substrat). Des septums divisent habituellement les hyphes en longues cellules (20 μm de long et plus) contenant plusieurs nucléoïdes. Chez beaucoup d'actinobactéries, les hyphes végétatifs se différencient en hyphes qui poussent vers le haut et forme un mycélium aérien qui s'élève au-dessus du substrat. C'est à ce moment-là que les composés médicalement utiles sont synthétisés (Prescott *et al.*, 2010). Les hyphes aériens forment par septation des spores à paroi mince (figure 1). Si les spores sont localisées dans un sporange, on peut parler de sporangiospores. Ces spores peuvent avoir des formes très variables. La sporulation actinomycétale répond habituellement à une privation en éléments nutritifs. La plupart des spores d'actinomycètes ne sont cependant pas particulièrement résistantes à la chaleur, mais elles supportent bien la dessiccation et ont, de ce fait, une importante valeur adaptative (Prescott *et al.*, 2010).

D'autre part, les membres de la famille des *Micromonosporaceae* produisent un mycélium de substrat étendu avec un mycélium aérien absent ou rudimentaire (Barka *et al.*, 2016). Les rhodocoques forment des filaments allongés sur le substrat et ne produisent pas de véritable mycélium (Locci et Schaal, 1980). Le genre *Sporichthya* sp. ne présente pas de mycélium végétatif, mais produit des hyphes aériens qui adhèrent à la surface du milieu par des crampons (Barka *et al.*, 2016). La figure 2 illustre les différents types de spores que l'on peut trouver dans les genres d'actinomycètes. Ainsi,

chez les genres *Micromonospora*, *Micropolyspora* et *Thermoactinomyces*, la formation de spores se produit directement sur le mycélium du substrat (Cross et Goodfellow, 1973), tandis que chez *Streptomyces*, les spores se développent à partir du mycélium aérien. La plupart des actinomycètes ne sont pas mobiles. Les groupes *Actinoplanes* et *Actinosynnema* sont caractérisés par des spores mobiles, tandis que *Thermoactinomyces* possède des endospores thermorésistantes uniques (Cross et Goodfellow, 1973). D'autres genres d'actinobactéries ont des sclérotés (*Chainia*), des synnémats (*Actinosynnema*), des vésicules contenant des spores (*Frankia*) ou des vésicules dépourvues de spores (*Intrasporangium*).

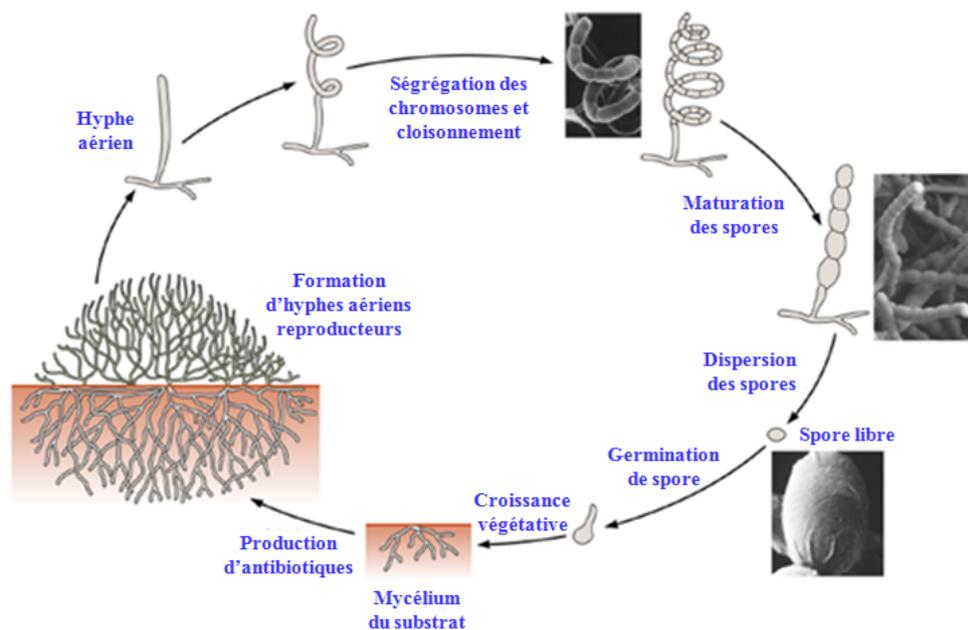


Figure 1: Représentation schématique du cycle de vie des actinomycètes (Barka *et al.*, 2016).

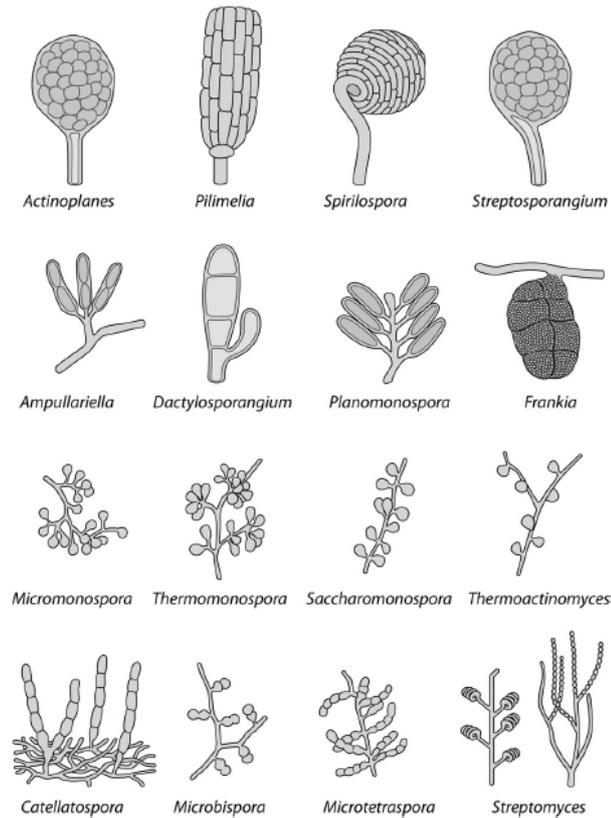


Figure 2 : Dessins schématiques des différents types de chaînes de spores produites par les actinomycètes (Barka *et al.*, 2016).

En outre, les actinobactéries peuvent être hétérotrophes ou chimioautotrophes, mais la plupart sont chimiohétérotrophes et peuvent utiliser une grande variété de sources nutritionnelles, y compris divers polysaccharides complexes (Zimmerman, 1980; Lechevalier et Lechevalier, 1965).

La composition de la paroi cellulaire des actinobactéries varie fortement d'un groupe à l'autre et prend une importance taxinomique considérable. On peut distinguer quatre types principaux de paroi sur la base de trois caractéristiques de la composition et la structure du peptidoglycane : l'acide aminé en position 3 du tétrapeptide, la présence de glycine dans les ponts interpeptidiques et le contenu en sucres du peptidoglycane (tableau 2). Les extraits cellulaires totaux des actinomycètes dotés d'une paroi des types II, III et IV contiennent également des sucres caractéristiques, utiles pour l'identification (tableau 3).

Tableau 2 : Types de paroi chez les actinobactéries (Prescott *et al.*, 2010).

Types de paroi	Isomère de l'acide diaminopimélique	Glycine dans le pont interpeptidique	Sucres caractéristiques	Genres représentatifs
I	L, L	+	NA ^a	<i>Nocardioïdes</i> , <i>Streptomyces</i>
II	<i>méso</i>	+	NA	<i>Micromonospora</i> , <i>Actinoplanes</i> , <i>Pilimelia</i>
III	<i>méso</i>	-	NA	<i>Actinomadura</i> , <i>Frankia</i>
IV	<i>méso</i>	-	Arabinose, galactose	<i>Saccharomonospora</i> , <i>Nocardia</i>

NA^a, non applicable ou non déterminé.

Tableau 3 : Sucres cellulaires totaux des actinobactéries (Prescott *et al.*, 2010).

Type en composition en sucres ^a	Sucres caractéristiques	Genres représentatifs
A	Arabinose, galactose	<i>Nocardia</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Saccharomonospora</i>
B	Madurose ^b	<i>Actinomadura</i> , <i>Streptosporangium</i> , <i>Dermatophilus</i>
C	Aucun	<i>Thermomonospora</i> , <i>Actinosynnema</i> , <i>Geodermatophilus</i>
D	Arabinose, xylose	<i>Micromonospora</i> , <i>Actinoplanes</i>

^a On ne trouve de sucres caractéristiques que dans les types de paroi II à IV, les actinomycètes à acide *méso*-diaminopimélique. ^b Le madurose est le 3-O-méthyl-D-galactose.

Certaines autres propriétés sont précieuses en taxinomie : la morphologie et la couleur du mycélium et des sporanges, les caractères de surface et la disposition des spores, le pourcentage en GC de l'ADN, la composition phospholipidique des membranes cellulaires et la résistance des spores à la chaleur. Les séquences de l'ARN_r 16S s'est évidemment révélée précieuse. Plusieurs génomes d'actinomycètes ont été séquencés, notamment ceux de *Mycobacterium tuberculosis* (Wada *et al.*, 2017), *Mycobacterium leprae* (Rambukkana, 2001), *Streptomyces coelicolor* (Bentley *et al.*, 2002), et *Tsukamurella* sp.1534 (Oulmi *et al.*, 2012).

Les actinobactéries ont aussi une grande importance économique. Ce sont essentiellement des habitants du sol et ils sont très largement distribués dans les écosystèmes terrestres et aquatiques, y compris les habitats extrêmes. Elles se développent bien à pH neutre, mais certains sont acidophiles ou alcalophiles. D'autres

sont des halophiles et certains sont thermophiles (Barka *et al.*, 2016). Elles peuvent dégrader un nombre et une variété énormes de composés organiques et ils sont extrêmement importants pour la minéralisation de la matière organique. Bien que beaucoup d'actinomycètes soient des microorganismes vivant librement, quelques-uns sont pathogènes chez l'homme, chez d'autres animaux et chez certains végétaux (Prescott *et al.*, 2010).

3. Actinobactéries halophiles et halotolérantes

La classification des microorganismes halophiles et halotolérants, la plus largement utilisée par la plupart des scientifiques, a été proposée par (Kushner et Kamekura, 1988). Cette classification est basée sur la croissance optimale de ces microorganismes (et notamment des actinobactéries) par rapport à la concentration de NaCl. Sur la base de cette classification, les microorganismes halophiles peuvent être divisés en trois catégories :

1. **Les halophiles extrêmes** (*Actinopolyspora halophila* et *Saccharomonospora halophila*), capables de croître de manière optimale dans les milieux avec 15 à 30 % (2,5-5,2 M) de NaCl.
2. **Les halophiles modérés** (*Actinopolyspora alba* et *Actinopolyspora erythraea*), ont une croissance optimale dans les milieux avec 3 à 15 % (0,5-2,5 M) de NaCl.
3. **Les halophiles faibles** (*Saccharomonospora marina*), capables de croître de façon optimale entre 1 et 3 % (0,2-0,5 M) de NaCl.

En revanche, les microorganismes **non-halophiles** (la plupart des eubactéries) sont des organismes qui poussent de façon optimale, dans des milieux contenant moins de 1 % (0,2 M) de NaCl. Cependant, les bactéries capables de croître en l'absence ainsi qu'en présence de sel, et qui peuvent tolérer des concentrations relativement élevées de NaCl, sont désignées comme **halotolérantes** (*Nocardiopsis halotolerans*). Elles sont considérées comme étant **extrêmement halotolérantes**, si la tolérance dépasse 15 % (2,5 M) de NaCl.

4. Diversité taxonomique des actinobactéries halophiles et halotolérantes

Dans l'ancien « Bergye's Manual » de 1989, les actinobactéries ou actinomycètes étaient classées, selon la morphologie et la chimiotaxonomie en plusieurs genres, qui appartenaient à un seul ordre *Actinomycetales* (Holt *et al.*, 1994 ; Williams *et al.*, 1989). Selon Kämpfer, (2010), les actinobactéries étaient classées dans 50

familles ; et l'ordre principale des *Actinomycetales* regroupait à lui seul, environ 45 familles et près de 290 genres.

Dans la nouvelle taxonomie de la dernière édition du « Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria » de 2015 (Goodfellow, 2015), basée sur la séquence de l'ADNr 16S, le phylum *Actinobacteria* englobe six classes, 23 ordres, 53 familles et de nombreux genres. Les classes constituantes sont : *Acidimicrobiia*, *Actinobacteria* (Stackebrandt *et al.*, 1997), *Coriobacteriia*, *Nitriliruptoria*, *Rubrobacteria*, et *Thermoleophila*. La classe *Actinobacteria* comprend 42 familles rassemblées dans 15 ordres, parmi lesquels se trouve l'ordre *Actinomycetales*. Ce dernier est restreint à cinq genres (*Actinomyces*, *Actinobaculum*, *Arcanobacterium*, *Mobiluncus* et *Varibaculum*) appartenants à une seule famille (*Actinomycetaceae*). Les autres classes du phylum *Actinobacteria* ne contiennent ensembles que 11 familles.

Le phylum *Actinobacteria* est l'un des principaux taxons dans le domaine *Bacteria* ; ceci est déduit de sa position dans l'arbre phylogénétique basé sur l'ARNr 16S (Ludwig et Klenk, 2005 ; Garrity et Holt, 2001) et des signatures d'ARNr 16S spécifiques à ce taxon (Zhi *et al.*, 2009). De plus, certains indels (Insertion/délétion) conservés dans l'ARNr 23S et des séquences protéiques, soutiennent la distinction des membres des actinobactéries de toutes les autres bactéries (Gao et Gupa, 2005).

Il a été rapporté par Maheshwari, (2015), que les actinobactéries halophiles et halotolérantes sont incluses dans les dix ordres suivants : *Actinopolysporales*, *Corynebacteriales*, *Glycomycetales*, *Jiangellales*, *Micrococcales*, *Micromonosporales*, *Propionibacteriales*, *Pseudonocardiales*, *Streptomycetales* et *Streptosporangiales*. Les genres *Nocardiopsis* (de la famille *Nocardiopsaceae*) et *Nesterenkonia* (de la famille *Micrococcaceae*) contiennent le plus grand nombre d'espèces Halophiles et halotolérantes.

Les actinobactéries halophiles et halotolérantes de différents taxons montrent une gamme remarquable de morphologies différentes, formant ainsi : des cocci (*Ruania* et *Serinicoccus*), des bâtonnets courts (*Cellulomonas*), des bâtonnets irréguliers (*Microbacterium* et *Salinibacterium*), des bâtonnets et des cocci (*Arthrobacter*) et des mycéliums qui se fragmentent en éléments coccoïdes et en bâtonnets (*Nocardiopsis*). D'autres bactéries, montrent une différenciation morphologique plus étendue, allant de celles qui produisent des hyphes de substrats fortement ramifiés qui portent des spores (*Micromonospora*) à celles qui forment un mycélium stable ramifié, qui porte des

hyphes aériennes qui se différencient en chaînes de spores courtes ou longues (*Actinopolyspora* et *Streptomyces*). En général, les spores sont non mobiles.

Les espèces d'actinobactéries halophiles et halotolérantes appartenant à 34 genres, valablement publiées, sont répertoriées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Liste de la plupart des espèces valides d'actinobactéries halophiles et halotolérantes (Maheshwari, 2015 ; Hamedi *et al.*, 2013).

Espèces d'actinobactéries halophiles et/ou halotolérantes	Gamme de NaCl (%)	Espèces d'actinobactéries halophiles et/ou halotolérantes	Gamme de NaCl (%)
<i>Actinopolyspora alba</i>	10-25	<i>Nocardiopsis rosea</i>	0-18
<i>Actinopolyspora algeriensis</i>	7-32	<i>Nocardiopsis rhodophaea</i>	0-18
<i>Actinopolyspora biskrensis</i>	10-30	<i>Nocardiopsis chromatogenes</i>	0-18
<i>Actinopolyspora erythraea</i>	10-25	<i>Nocardiopsis baichengensis</i>	0-18
<i>Actinopolyspora halophila</i>	10-30	<i>Nocardiopsis arabia</i>	0-15
<i>Actinopolyspora mortivallis</i>	5-30	<i>Nocardiopsis litoralis</i>	10-15
<i>Actinopolyspora mzabensis</i>	7-32	<i>Nocardiopsis salina</i>	10-20
<i>Actinopolyspora righensis</i>	15-25	<i>Nocardiopsis sinuspersici</i>	0-15
<i>Actinopolyspora saharensis</i>	10-30	<i>Nocardiopsis arvandica</i>	0-17,5
<i>Actinopolyspora xinjiangensis</i>	10-15	<i>Nocardiopsis terrae</i>	10-15
<i>Amycolatopsis halophila</i>	1-15	<i>Nocardiopsis flavescens</i>	0-10
<i>Amycolatopsis marina</i>	0,5-12	<i>Nocardiopsis coralliicola</i>	0-18
<i>Amycolatopsis salitolerans</i>	0-15	<i>Nocardiopsis gilva</i>	0-20
<i>Amycolatopsis halotolerans</i>	0-15	<i>Nocardiopsis halophila</i>	10-15
<i>Amycolatopsis cyhanbeyliensis</i>	0-15	<i>Nocardiopsis kunsanensis</i>	10-15
<i>Arthrobacter halodurans</i>	0-12	<i>Nocardiopsis xinjiangensis</i>	10-15
<i>Cellulomonas pakistanensis</i>	02-7	<i>Prauserella halophila</i>	5-25
<i>Cellulomonas phragmiteti</i>	02-7	<i>Prauserella alba</i>	0-25
<i>Corynebacterium halotolerans</i>	0-10	<i>Prauserella marina</i>	0-5
<i>Georgenia halophila</i>	5-15	<i>Prauserella rugosa</i>	10-15
<i>Glycomyces halotolerans</i>	04-5	<i>Prauserella flava</i>	10-15
<i>Haloactinobacterium album</i>	2-16	<i>Prauserella salsuginis</i>	10-15
<i>Haloactinopolyspora alba</i>	7-23	<i>Prauserella sedimina</i>	10-15
<i>Haloactinopolyspora alkaliphila</i>	7-23	<i>Prauserella aidingensis</i>	10-15
<i>Haloactinospora alba</i>	10-15	<i>Saccharomonospora paurometabolica</i>	5-20
<i>Haloechinothrix alba</i>	9-23	<i>Saccharomonospora halophila</i>	10-30
<i>Haloglycomyces albus</i>	3-18	<i>Saccharomonospora saliphila</i>	5-20
<i>Isoptericola halotolerans</i>	0-25	<i>Saccharopolyspora qijiaojingensis</i>	1-22
<i>Kocuria halotolerans</i>	0-15	<i>Saccharopolyspora halophila</i>	10-30
<i>Kocuria marina</i>	0-10	<i>Saccharopolyspora lacisalsi</i>	5-25
<i>Kocuria aegyptia</i>	01-5	<i>Saccharopolyspora paurometabolica</i>	10-15
<i>Marinactinospora thermotolerans</i>	0-5	<i>Salinactinospora qingdaonensis</i>	1-23

nd : non déterminé.

Tableau 4. Liste de la plupart des espèces valides d'actinobactéries halophiles et halotolérantes (Maheshwari, 2015 ; Hamedi *et al.*, 2013) (Suite).

Espèces d'actinobactéries halophiles et/ou halotolérantes	Gamme de NaCl (%)	Espèces d'actinobactéries halophiles et/ou halotolérantes	Gamme de NaCl (%)
<i>Nesterenkonia alba</i>	3-12	<i>Streptomonospora flavalba</i>	5-25
<i>Nesterenkonia aethiopica</i>	0-15	<i>Streptomonospora alba</i>	5-25
<i>Nesterenkonia lacusekhoensis</i>	4-18	<i>Streptomonospora halophila</i>	5-20
<i>Nesterenkonia halobia</i>	0-16	<i>Streptomonospora amylolytica</i>	5-20
<i>Nesterenkonia jeotgali</i>	3-20	<i>Streptomyces oceani</i>	2,5-12,5
<i>Nesterenkonia aethiopica</i>	0-10	<i>Streptomyces pharmamarensis</i>	9
<i>Nesterenkonia flava</i>	0-10	<i>Streptomyces albiacialis</i>	0-10
<i>Nesterenkonia suensis</i>	0-10	<i>Streptomyces chilikensis</i>	0-10
<i>Nocardiopsis xinjiangensis</i>	3-20	<i>Thermobifida halotolerans</i>	0-10
<i>Nocardiopsis kunsanensis</i>	3-20	<i>Yaniella halotolerans</i>	0-25
<i>Nocardiopsis halophila</i>	3-20	<i>Yuhushiella deserti</i>	nd
<i>Nocardiopsis composita</i>	0-15	<i>Zhihengliuella halotolerans</i>	0-15
<i>Nocardiopsis halotolerans</i>	0-15	<i>Zhihengliuella salsuginis</i>	5-15

nd : non déterminé.

5. Adaptation des actinobactéries à des concentrations élevées de sel

L'adaptation est un processus évolutif par lequel un organisme développe sa capacité à vivre dans son habitat (Dobzhansky *et al.*, 1968). Les actinobactéries halophiles survivent et se développent dans les environnements extrêmes où les concentrations de sel sont élevées. Parmi ces bactéries, l'espèce *Actinopolyspora halophila*, est capable de croître dans une concentration de NaCl saturante, car elle a été isolée pour la première fois, sur un milieu de culture contenant 25% de NaCl (Johnson *et al.*, 1986). Les actinobactéries halotolérantes ont une grande capacité d'adaptation à Na⁺, K⁺ et Mg²⁺, tandis que quelques souches peuvent croître même à de faibles concentrations de CaCl₂ (Tang *et al.*, 2003).

Les microorganismes halophiles et halotolérants supportent une forte pression osmotique exercée par leur milieu hautement salin. Il existe chez les halophiles deux mécanismes fondamentaux pour contrer le très fort gradient de sodium existant entre milieu extérieur et milieu intérieur, et assurer l'équilibre osmotique (Prieur, 2014).

- Le premier mécanisme consiste en l'accumulation d'ions inorganiques dans le milieu cellulaire, et en l'occurrence l'accumulation d'ions K⁺ et Cl⁻, jusqu'à une concentration de 5 M. Seuls quelques taxons accumulent du KCl dans le milieu intracellulaire pour équilibrer la pression osmotique. Chez les bactéries, ce mécanisme est utilisé par certains Firmicutes de l'ordre des *Halanaerobiales* et le genre *Salinibacter*.

- Le second mécanisme consiste à synthétiser et accumuler des molécules organiques solubles, appelées « solutés compatibles ». Ils sont dits "compatibles" car n'influencent pas sur la physiologie et les processus cellulaires même à des concentrations intracellulaires élevées (Roberts, 2005).

Contrairement à l'accumulation de sels, l'utilisation de molécules organiques ne nécessite pas une adaptation poussée des systèmes enzymatiques, et permet donc une plus grande adaptabilité aux fluctuations de l'environnement (Prieur, 2014).

L'accumulation de solutés compatibles est pratiquée par les bactéries halophiles et halotolérantes telles que les actinobactéries. Ces molécules sont très diverses, parfois synthétisées par la cellule, ce qui est coûteux en énergie, parfois prélevées dans le milieu extérieur, ce qui l'est moins. Les solutés compatibles les plus courants sont neutres ou zwitterioniques et comprennent des acides aminés, des sucres, des polyols, des dérivés de certains de ces composés, tels que : les bêtaïnes, les ectoïnes, le saccharose, le tréhalose et le glycérol. Certaines de ces molécules, en particulier la glycine bêtaïne et les ectoïnes, ont une importance biotechnologique considérable (Ventosa *et al.*, 1998).

Certains solutés compatibles produits par des actinomycètes halophiles sont utilisés comme protecteurs de protéines et de cellules dans diverses applications industrielles, impliquant la congélation et la décongélation (Maheshwari, 2015). L'ectoïne et l'hydroxyectoïne obtenues à partir des actinomycètes halophiles sont commercialement utilisées comme agents protecteurs et stabilisants des cellules de mammifères (Pastor *et al.*, 2010).

Comme exemple d'actinobactéries des sols salins, nous avons *Actinopolyspora halophila*, qui est l'une des rares bactéries hétérotrophes capables de synthétiser *de novo* le soluté compatible glycine bêtaïne, ainsi que *Nocardiopsis halophila*, qui utilise par contre, un dérivé hydroxylé de l'ectoïne et du β -glutamate comme solutés compatibles (DasSarma et Arora, 2001).

Le groupe de gènes (ect-ABCD) codant les enzymes pour la biosynthèse de l'ectoïne et de la 5-hydroxyectoïne a été identifié dans les génomes de *S. coelicolor* A3 (2), *S. avermitilis*, *S. griseus*, *S. scabiei* et *S. chrysomallus*, suggérant un rôle important de ces solutés compatibles comme protecteurs de stress dans le genre *Streptomyces* (Bursy *et al.*, 2008). En outre, *Rubrobacter xylanophilus* est une actinobactérie thermophile et

halotolérante, qui accumule du tréhalose et du mannosylglycérate (MG) (Empadinhas *et al.*, 2007).

6. Diversité écologique et distribution des actinobactéries halophiles et halotolérantes

Les actinobactéries sont largement distribuées dans les habitats terrestres et aquatiques, y compris les habitats extrêmes, tels que les environnements hypersalins qui sont largement distribués sur notre planète (Ventosa *et al.*, 2008). Les sols salins, les saumures, l'eau de mer, les lacs salés, les milieux salins alcalins sont considérés comme les meilleurs habitats pour isoler les actinobactéries halophiles. La plupart des espèces d'actinobactéries halophiles connues et validement décrites, ont été isolées de sols salins (Maheshwari, 2015). Certains exemples comprennent *Actinospolyspora mortivallis* (halophile modérée, isolée de sol salin en Californie, USA) (Yoshida *et al.*, 1991), *Amycolatopsis salitolerans* (halotolérante, isolée à partir d'un sol hypersalin, en Chine) (Guan *et al.*, 2012). *Prauserella isguenensis* et *Mzabimyces algeriensis* (halophiles, isolées de sols désertiques algériens) (Saker *et al.*, 2015, 2014). Récemment, une nouvelle espèce *Streptomyces massialgeriensis* a été isolée d'un sol extrêmement salé, dans le garaet de Ank el Djemel, en Algérie (Djaballah *et al.*, 2018).

En dehors des sources salines terrestres, de nombreuses espèces halophiles et halotolérantes ont été isolées à partir des eaux salines, principalement celles des lacs salés. Les espèces suivantes sont des exemples: *Streptomonospora amylolytica* et *Streptomonospora flavalba* (Cai *et al.*, 2009) et *Saccharopolyspora lacisalsi* (Guan *et al.*, 2011), qui ont été isolées de lacs salés en Chine. D'autre part, *Nesterenkonia lacusekhoensis* a été isolé à partir d'un échantillon d'eau de 23 m de profondeur du lac Ekho (un lac hypersalin, en Antarctique orientale) (Collins *et al.*, 2002).

Outre les lacs salés, de nombreuses espèces d'actinobactéries provenaient de sources marines. Parmi elles : *Nocardiopsis litoralis* (halophile, isolée d'une anémone de mer, en Chine) (Chen *et al.*, 2009b), *Microbacterium sediminis* (halotolérante, isolée des sédiments profonds, en Chine) (Yu *et al.*, 2013), *Arthrobacter halodurans* (halotolérante, isolée d'une eau de mer, en Chine) (Chen *et al.*, 2009a), et *Kocuria marina* (halotolérante, isolée des sédiments marins, en Sibérie orientale) (Kim *et al.*, 2004).

Certaines actinobactéries halophiles et halotolérantes ont été retrouvées dans d'autres habitats peu explorés, nous pouvons mentionner : *Zhihengliuella salsuginis* (modérément halophile, isolée de saumure souterraine prélevée dans une mine de sel, en

Chine) (Chen *et al.*, 2010). De plus, *Saccharopolyspora dendranthema* (endophyte et halotolérante, isolée d'une plante de marais salant côtier, en Chine) (Zhang *et al.*, 2013).

7. Importance biotechnologique des actinobactéries halophiles et halotolérantes

Les actinobactéries halophiles et halotolérantes sont une source très intéressante de nouvelles molécules chimiques bioactives, avec une importance croissante pour plusieurs applications biotechnologiques dans différents domaines.

7.1. Production de composés antimicrobiens, antiviraux et thérapeutiques

Les actinomycètes halophiles peuvent produire une variété de composés bioactifs, qui ont un large éventail d'activités biologiques, tels que : les antibactériens, les antifongiques, antiviraux, et d'autres composés d'intérêt médical.

L'arénimycine est un nouvel antibiotique isolé de l'actinomycète *Salinispora arenicola* (halophile extrême, d'origine marine). Il a démontré une activité antibactérienne puissante contre *Staphylococcus aureus* résistant à la rifampicine et à la méthicilline (Asolkar *et al.*, 2010).

La Chandrananimycine A est une nouvelle substance antifongique produite par *Actinomadura* sp. (souche M048, d'origine marine), qui a montré une forte activité antifongique contre *Mucor miehei*. Cette substance présente d'autres activités : antibactérienne, anticancéreuse et anti-algale (Maskey *et al.*, 2003).

Le N- (2-hydroxyphényl)-2-phénazamine (NHP) est un nouvel antibiotique produit par *Nocardiopsis dassonvillei* (actinomycète halophile, issue de sédiments marins). Il possède une puissante activité antifongique contre *Candida albicans* (Gao *et al.*, 2012).

Les études sur les agents antiviraux des actinobactéries halophiles, sont peu nombreuses. L'antimycine A est une substance antivirale produite par *Streptomyces kaviengensis* (isolée à partir de sédiments marins). Elle a une activité puissante contre le virus de l'encéphalite équine de l'Ouest, et contre plusieurs virus à ARN dans les cellules cultivées, y compris les membres des familles : *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Picornaviridae* et *Paramyxoviridae* (Raveh *et al.*, 2013). La benzastatine C extrait de *Streptomyces nitrosporeus*, est un composé à activité antivirale contre les virus de l'herpès simplex de type 1 et 2, et contre celui de la stomatite vésiculeuse (Lee *et al.*, 2007).

Des études sur les actinomycètes halophiles, ont conduit au développement de nombreux composés thérapeutiques, parmi lesquels on trouve : les anticancéreux, les anti-inflammatoires, les antioxydants et les antipaludiques. La Iodopyridone est un agent anticancéreux (contre la lignée cellulaire d'adénocarcinome du côlon humain HCT-116), obtenu d'une actinobactérie marine *Saccharomonospora* sp. (Maloney *et al.*, 2009). Le cyclomarine A (Renner *et al.*, 1999) est un nouvel agent anti-inflammatoire isolé des halophiles *Streptomyces* sp. La trioxacarcine est une nouvelle substance antipaludéenne isolée de *Streptomyces* sp. (Maskey *et al.*, 2004). Les actinosporines C et D sont de nouveaux antioxydants (contre les dommages génomiques induits par le peroxyde d'hydrogène dans la lignée cellulaire promyélocytaire humaine, HL-60) produits par l'actinomycète *Actinokineospora* sp. (souche EG49) associé à une éponge marine (Grkovic *et al.*, 2014).

7.2. Biodégradation de produits chimiques

Les environnements salins, en particulier les eaux et les sols, sont toujours exposés à la contamination par des métaux lourds ou d'autres substances chimiques toxiques en raison des activités anthropiques (Ventosa *et al.*, 1998). La dégradation de différentes substances dans l'environnement est un processus continu dû aux activités continues des microorganismes. Ces derniers dégradent les composés toxiques en matériaux non toxiques tels que le H₂O, le CO₂ ou d'autres composés inorganiques (Philip *et al.*, 2005). Les actinobactéries ont été signalées comme l'un de ces microorganismes qui contribuent à la dégradation des composés organiques dans la nature et jouent un rôle dans la minéralisation de la matière organique (Subramani et Aalbersberg, 2012). Les substances pétrolières constituent l'un des matériaux qui contaminent, particulièrement, les habitats marins (Fathepure, 2014). Dans une étude réalisée sur des bactéries halophiles utilisatrices de pétrole, les résultats phylogénétiques ont montré que 30% de tous les isolats appartenaient à des actinobactéries (Hamedi *et al.*, 2013). On a rapporté que l'actinobactérie extrêmement halophile, *Streptomyces albiacialis*, pouvait se développer dans un environnement extrême en utilisant du pétrole brut comme unique source de carbone dans un taux de salinité allant jusqu'à 10% de NaCl. Une autre actinobactérie halophile *Rhodococcus erythropolis* a été isolée d'un sol pollué par les hydrocarbures en Russie, et elle a été cultivée dans un milieu contenant du pétrole brut comme seule source de carbone (Zvyagintseva *et al.*, 2001). Une nouvelle souche d'actinomycète extrêmement halophile appartenant à

Actinopolyspora sp. a été isolée dans un environnement salin et aride d'un champ pétrolier du Sultanat d'Oman. Cette souche présentait la capacité de dégrader les alcanes jusqu'à C₁₅ et, à un rythme plus lent, jusqu'à C₂₅ (Al-Mueini *et al.*, 2007).

7.3. Production d'enzymes d'importance industrielle

Les enzymes extracellulaires produites par les actinobactéries halophiles présentent des avantages significatifs dans les applications biotechnologiques, telles que les procédés de biosynthèse, la bioremédiation environnementale et le traitement des aliments. Ces bactéries ont la capacité de sécréter des enzymes extracellulaires telles que : les lipases, les DNases, les protéases, les estérases, les pullulanases, les galactosidases, les nucléases, les xylanases, les inulinases, les cellulases, les pectinases, les gélatinases, les alpha-glucosidases, les bêta-glucosidases, les alpha-mannosidases, les bêta-mannosidases, les chitinases, les xylose isomérases, les fructokinases, les ribokinases, etc., qui présentent une activité plus élevée et une stabilité, en pH alcalin et à des concentrations de solvants organiques élevées, dans leur environnement (Essghaier *et al.*, 2010 ; Ningthoujam *et al.*, 2009). L'enzyme alpha-amylase halophile isolée de *Nesterenkonia* sp. pourrait tolérer divers solvants organiques tels que : le chloroforme, le cyclohexane, le benzène et le toluène. De telles propriétés des α -amylases halophiles pourraient être exploitées dans les industries de transformation de l'amidon, de la boulangerie, du brassage, du textile et de la distillation (Shafiei *et al.*, 2011).

Les cellulases et les protéases sont les enzymes extracellulaires les plus recherchées et constituent 60% des ventes mondiales d'enzymes (Niladevi et Prema, 2005). Les cellulases halophiles obtenues à partir des actinomycètes et de la bibliothèque métagénomique de certaines bactéries marines étaient halostables, thermostables et alcalostables, toutes favorables aux industries du textile et de la lessive (Shivanand *et al.*, 2013). Des études affirment qu'un certain nombre d'actinomycètes alcaliphiles et halophiles produisent des enzymes protéases extracellulaires (Dodia *et al.*, 2006). La protéase halophile sécrétée par *Nocardiopsis prasina* HA-4 résiste à une large gamme de pH (7-10) et de température (20-42 °C). *Nocardiopsis halotolerans* et *Saccharomonospora halophila* récupérées au Koweït, ont montré une meilleure activité kératinolytique sous forte concentration en sel (Al-Zarban *et al.*, 2002). Une enzyme dégradant la lignine est produite par *Streptomyces psammoticus*. Ce type d'enzymes a

des applications dans la décoloration des textiles, la délignification de la pulpe et le traitement des effluents (Niladevi et Prema, 2005).

7.4. Autres applications potentielles

Les actinobactéries halophiles et halotolérantes peuvent sécréter d'autres molécules comme les biosurfactants, les inhibiteurs d'enzymes et les pigments ; qui peuvent être très avantageuses dans différents domaines d'applications. Ces dernières années, un biosurfactant (de type lipopeptide) halothermophile et hautement actif contre plusieurs microorganismes, a été dérivé d'une souche B3 de *Streptomyces* sp. Modérément halophile (Khopade *et al.*, 2012). L'amylostreptine est parmi l'un des rares exemples d'inhibiteurs de l'enzyme alpha-amylase, qui est produit par l'actinobactérie halotolérante *Streptomyces corchorusii* subsp. *rhodomarinus*. Cet inhibiteur est très utile pour la suppression de maladies telles que le diabète, l'obésité et l'hyperlipémie (Imada et Simidu, 1988). Le streptocarbazole A et le N-(2-hydroxyphényl)-2-phénazamine (NHP) sont des pigments jaunes, originaires des halophiles *Streptomyces* sp. (souche FMA) et de *Nocardiopsis dassonvillei* (souche BM-17), respectivement. Ces pigments sont cytotoxiques et peuvent être utilisés dans le traitement de divers cancers (Fu *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2012).

8. Méthodes d'étude de la biodiversité bactérienne dans le sol

De manière générale, la diversité peut être définie comme étant « la mesure de la composition en espèces d'un écosystème, en terme du nombre d'espèces et de leurs abondances relatives » (Legendre et Legendre, 1984). Appliquer cette définition aux communautés microbiennes revient donc à décomposer la diversité en deux éléments : non seulement le nombre d'espèces microbiennes ou UTOs (Unités Taxonomiques Opérationnelles) dans la communauté, mais également leur abondance (Berdoulay, 2008).

Le sol est un système biologique complexe, hétérogène et dynamique, qui abrite une grande diversité d'êtres vivants dont les bactéries, qui sont représentées majoritairement par des *Proteobacteria*, *Acidobacteria* et *Actinobacteria* (Rebuffat et Zirah, 2018). Jusqu'à il y a environ quinze ans, il était encore difficile de déterminer la composition des communautés microbiennes dans le sol (Nannipieri *et al.*, 2017). La caractérisation des communautés bactériennes des sols se faisait et se fait toujours par des méthodes de culture *in vitro*, bien que ces dernières présentent des limites en ne permettant pas d'accéder à la diversité d'une manière exhaustive. Aujourd'hui, le

développement révolutionnaire des approches moléculaires, offre la possibilité d'affiner la classification des bactéries et de mieux comprendre leur diversité dans les sols (Theodorakopoulos, 2013).

8.1. Approche culturelle

Pour observer une bactérie, on a le plus souvent recours à la mise en œuvre de l'arsenal classique de l'approche culturelle (Pochon et Tardieux, 1962). Celui-ci comprend les cultures d'enrichissement, l'isolement de cultures pures, l'estimation du nombre (ou de l'abondance) par comptage de colonies exprimé en UFC (unité formant colonie) par gramme de sol, et la caractérisation taxonomique et fonctionnelle de l'organisme isolée. Cette dernière est basée sur l'étude des critères morphologique, physiologique, biochimique et métabolique. De plus, le séquençage de l'ADNr 16S des colonies isolées (comme approche moléculaire), peut ici aussi amener de nouvelles précisions dans la diversité bactérienne (Gobat *et al.*, 2010). Aussi, des milieux synthétiques additionnés de sel ou d'eau de mer pour enrichir et isoler les actinobactéries halophiles et halotolérantes des échantillons environnementaux ont souvent été utilisées.

Toutefois, les méthodes dépendantes de la culture présentent un désavantage majeur de ne pas rendre compte totalement de la composition de la communauté bactérienne présente dans le sol. En effet, les bactéries qui ne peuvent être cultivées en laboratoire représentent une grande fraction de la diversité totale existant dans la nature (Pham et Kim, 2012). Les causes principales qui font que de nombreuses bactéries échappent à la culture peuvent être les suivantes :

- les conditions de cultures (composition des milieux, pH, temps de croissance, température d'incubation etc.) utilisées lors de l'isolement ne reflètent, généralement pas les véritables conditions de l'environnement, et donc ce n'est pas toutes les bactéries qui peuvent s'y adapter (Barka *et al.*, 2016) ;
- L'existence de cellules viables mais non cultivables (VNC). Ces dernières ne croissent pas sur les milieux de cultures traditionnelles, bien qu'elles aient une activité métabolique faible. Elles sont rentrées dans un état dormant qui pourrait être dû au stress lié au changement des paramètres environnementaux. Nous pouvons citer dans ce cas, l'exemple du groupe *Halophaga-Acidobacterium* fréquent dans les sols, qui a été obtenu par des clones moléculaires et jamais par culture (Theodorakopoulos, 2013 ; Gobat *et al.*, 2010) ;

- L'absence de molécules signal qui peuvent être importantes dans la croissance de certaines bactéries. Par exemple, *Micrococcus luteus* sécrète une protéine appelée Rpf (Resuscitation promoting factor), qui est un facteur favorisant la croissance des cellules dormantes, du même organisme ; en plus d'être efficace pour stimuler la croissance d'autres bactéries comme *Mycobacterium bovis* (Mukamolova *et al.*, 1998) ;
- La concentration inhibitrice de nutriments dans le milieu, car la croissance des bactéries initialement présentes dans des environnements pauvres en substrat sera inhibée en présence d'une concentration trop élevée de ce même substrat (Gobat *et al.*, 2010 ; Calcott et Postgate, 1972) ;
- L'impossibilité de croître ou de former des colonies sur gélose pour certaines bactéries (Gobat *et al.*, 2010).

Or, au cours des 25 dernières années, de nombreuses avancées dans les techniques de culture, ont largement contribué à notre compréhension des microbes vivants. Parmi ces avancées on peut citer l'utilisation des milieux modifiés (Alain et Querellou, 2009) ; les changements des conditions de croissance (Alain et Querellou, 2009) ; la culture communautaire et co-culture pour la croissance de bactéries syntrophes (Vartoukian *et al.*, 2010) ; et l'assistance des méthodes indépendantes de la culture (Tyson et Banfield, 2005).

Bien qu'il soit difficile d'accéder de manière totale et précise à la diversité des bactéries dans les sols par l'approche culturale, celle-ci est encore largement utilisée notamment dans des études de diversité et d'activités antimicrobiennes des actinobactéries, dans les sols extrêmes salins (Gad, 2017 ; Harir *et al.*, 2017).

8.2. Approche moléculaire

Actuellement, il est plus facile d'étudier la diversité du monde bactérien et de s'affranchir du problème des non cultivables, grâce aux avancées technologiques de la biologie moléculaire, et à l'utilisation de techniques et de stratégies de plus en plus sophistiquées.

8.2.1. ARNr 16S et phylogénie

Dans l'identification et l'étude de la diversité bactérienne, on fait souvent appel aux gènes qui codent pour les acides ribonucléiques des ribosomes (les ADNr), en particulier au gène qui code pour l'ARNr 16S.

La séquence du gène qui code pour l'ARN ribosomal 16S (constituant de la petite sous-unité 30S des procaryotes) est maintenant fournie par presque tous les auteurs décrivant une nouvelle espèce. Un grand nombre de séquences différentes d'amorces ciblant le gène 16S a été publié. Elles peuvent être universelles (permettant l'amplification de la plupart des séquences d'ADNr 16S bactérien) (Baker *et al.*, 2003) ou spécifiques pour un groupe particulier, comme par exemple les amorces pour *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Bacilli* et *Planctomycètes* (Blackwood *et al.*, 2005; Stach *et al.*, 2003).

Pour être informative, la séquence de l'ADNr 16S doit être de bonne qualité (moins de 1 % des bases indéterminées) et d'une longueur d'au moins 1000 nucléotides sur les 1500 qui constituent ce gène (Bertrand *et al.*, 2012). Elle est composée de régions conservées permettant l'appariement d'amorces « universelles » (servant à l'amplification puis au séquençage) et de neuf zones hypervariables (de V1 à V9) (Baker *et al.*, 2003) permettant la distinction de l'espèce (Van de Peer *et al.*, 1996). La majorité des principaux groupes bactériens possède une ou des séquences nucléotidiques caractéristiques que l'on nomme des séquences signatures oligonucléotidiques (qui sont exclusives d'un groupe taxonomique donné) (Woese, 1987). Des exemples de signatures de trois familles des actinobactéries sont représentés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Signatures basées sur les séquences du gène codant pour l'ARNr 16S de trois familles d'actinobactéries (Goodfellow, 2015).

Familles	Position des signatures dans l'ARNr 16S
<i>Streptomycetaceae</i>	127:234 (G-C), 449 (A), 672:734 (C-G), 950:1231 (U-G), 952:1229 (U-A), 955:1225 (C-G), 965 (C), 986:1219 (A-U), 1362 (C).
<i>Nocardiopsaceae</i>	440:497 (U-U), 485 (G), 501:544 (G-C), 502:543 (A-U), 833:853 (U-G), 1355:1367 (G-C).
<i>Actinopolysporaceae</i>	127:234 (A-U), 242:284 (C-G), 480 (U), 564 (C), 657:759 (G-C), 672:734 (C-G), 828 (A), 829:857 (G-C), 831:855 (U-G), 832:854 (G-U), 833:853 (U-G), 840:846 (C-G), 952:1229 (U-A), 986:1219 (U-A), 1100 (U), 1117:1183 (G-C), 1309:1328 (G-U).

L'analyse phylogénétique des séquences d'ADNr 16S permet de préciser la position du microorganisme considéré par rapport aux autres microorganismes dont les séquences d'ADNr 16S sont connues. Un avantage de cette approche est que le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S peut être fait non seulement sur des

isolats, mais aussi sur des communautés complexes (Bertrand *et al.*, 2012), ou encore directement sur des échantillons de l'environnement. Dans ce dernier cas, certains groupes phylogénétiques entiers, n'ont aucun représentant cultivable et l'appellation de « Candidate Division » leur est destinée (Theodorakopoulos, 2013).

Les séquences d'autres gènes sont parfois utilisées dans le but de ne pas dépendre l'identification sur un seul marqueur. Cette approche appelée MLST (Multilocus sequence Typing) s'est développée suite à la constatation que la phylogénie de nouveaux gènes ne suivait pas nécessairement celle de l'ADNr 16S. En effet, la quantité d'information présente dans l'ADNr 16S peut parfois être insuffisante pour positionner d'une manière fiable des souches. L'utilisation de marqueurs phylogénétiques alternatifs est donc importante pour affiner la position phylogénétique des microorganismes étudiés par rapport à ce qui peut être obtenu avec le gène de l'ADNr 16S seul. Grâce à l'augmentation des capacités de séquençage, il est tout à fait possible que dans le futur la séquence génomique complète soit demandée pour l'identification d'un isolat (Bertrand *et al.*, 2012).

En plus de la caractérisation phénotypique, le rapprochement d'un nouvel isolat de taxons déjà décrits fait appel, de plus en plus fréquemment, à l'analyse phylogénétique. Cette dernière permet d'aborder l'étude de la biodiversité et la classification des procaryotes, en utilisant des techniques moléculaires directes qui s'affranchissent de la mise en culture des microorganismes. L'analyse phylogénétique a pour but de déterminer les relations de parenté entre taxons (souches, espèces, genres, etc.) et donc les plus proches parents connus de la souche d'intérêt. Le marqueur de référence utilisé pour ces analyses est le gène codant pour l'ADNr 16S. Ce dernier, a été choisi comme marqueur phylogénétique par Woese, (1987), pour plusieurs raisons : il est (ubiquiste) présent chez tous les procaryotes, où il joue le même rôle dans la traduction de l'ARN messager en protéines ; il évolue lentement ; sa séquence est une alternance de régions dont les vitesses d'évolution varient, permettant de comparer des espèces très proches sur des régions hypervariables et des espèces très éloignées sur des régions très conservées (figures 3 et 4) ; et il est aisément séquencé grâce à ses régions hautement conservées avec peu de mutations fixées au cours de l'évolution. Une identification basée sur ce gène amène la question du niveau de similarité, seuil en dessous duquel il est considéré que l'isolat appartient à une espèce définie classiquement par hybridation ADN-ADN (Wayne *et al.*, 1987).

Stackebrandt et Goebel, (1994) ont proposé qu'un seuil de 70 % d'hybridation d'ADN génomique entre souches de la même espèce correspondait à un pourcentage d'identité d'au moins 97 % de leurs gènes codant pour l'ARNr 16S. Il faut comprendre le nombre de 97 % comme un seuil en dessous duquel il ne sera pas nécessaire de faire une hybridation ADN-ADN car il s'agit d'espèces différentes. Ceci ne signifie pas que dans la situation inverse (plus de 97 % d'identité au niveau des ARNr 16S), l'hybridation ADN-ADN entre les génomes des deux souches ne soit pas nécessaire. Plus tard, une proposition a été faite pour élever ce seuil, à 98,7 % par Stackebrandt et Ebers, (2006). Ces derniers auteurs ont pu montrer, suite à une analyse statistique très fine, que les séquences qui partagent moins de 98,7 % de similarité du gène codant pour l'ARNr 16S correspondent à des espèces différentes.

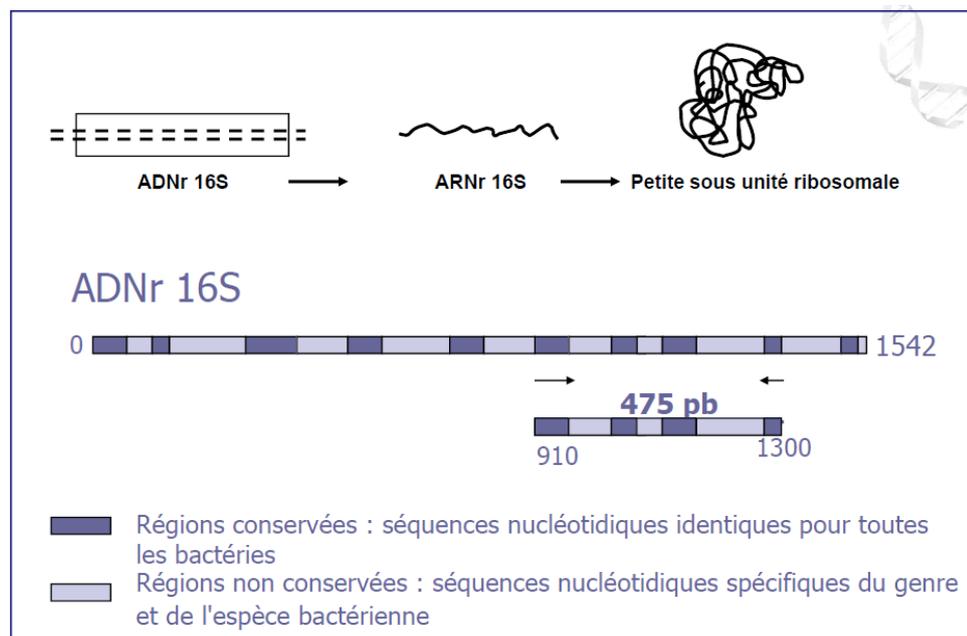


Figure 3 : Organisation du gène codant pour l'ARNr (Boisset, 2008).

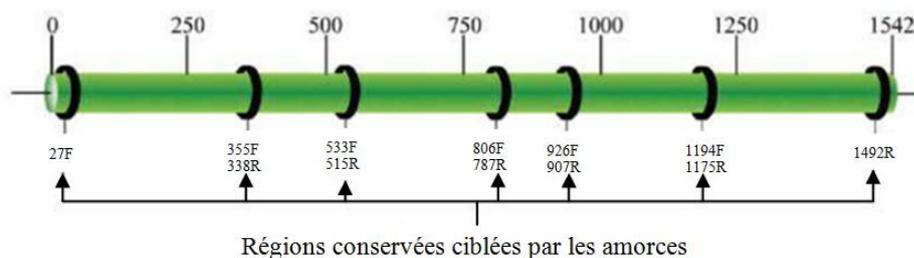


Figure 4 : Représentation schématique du gène codant pour l'ARNr 16S. Les cercles représentent les régions conservées utilisées pour le design d'amorces nécessaires à l'amplification et au séquençage (Reller *et al.*, 2007).

L'analyse phylogénétique de marqueurs moléculaires (l'ARNr 16S par exemple) s'effectue en plusieurs étapes. La première consiste à comparer la séquence d'intérêt afin de rechercher si des séquences homologues déjà connues sont présentes dans les banques de séquences, par exemple la banque de données généraliste Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), ou la base de données spécialisée EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>). Cette première recherche est basée sur la similarité (ou la ressemblance) entre les séquences de la banque et la séquence analysée. En effet, plus deux souches sont apparentées, plus les séquences de leurs gènes (dont l'ARNr 16S) sont proches. Un des logiciels les plus fréquemment utilisés pour effectuer ces recherches est BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de Genbank. Il permet d'identifier les régions similaires entre deux séquences nucléiques ou protéiques. L'identification des séquences homologues à une séquence d'intérêt ne permet d'obtenir qu'un positionnement taxonomique brut (niveau du genre ou supérieur) qu'il importe d'affiner par une analyse phylogénétique. Pour l'analyse phylogénétique, toutes les séquences homologues provenant de microorganismes proches du microorganisme analysé sont extraites de la base de données et alignées (par un logiciel d'alignement multiple comme Clustal W). Les régions pour lesquelles l'homologie entre les sites est non-ambiguë (régions conservées et ne présentant pas d'insertion/délétion au niveau de l'alignement multiple) sont utilisées pour construire l'arbre phylogénétique. Une des méthodes de reconstruction d'arbre les plus utilisées en taxonomie est le « Neighbor joining » (Saitou et Nei, 1987) en raison de sa simplicité et de sa rapidité. Le « Neighbor joining » appartient à la famille de reconstruction phylogénétique dite de distances, car la première étape du « Neighbor joining » passe par la quantification des distances génétiques ou distances évolutives entre toutes les paires de séquences homologues étudiées. L'estimation des distances évolutives entre les séquences est basée sur l'utilisation d'un modèle évolutif. Le calcul des distances évolutives entre chaque base de séquences permet l'établissement d'une matrice de distance. Ces distances sont ensuite représentées sous forme d'arbres phylogénétiques dont les longueurs des branches sont proportionnelles aux distances évolutives entre les séquences. Un des avantages du « Neighbor joining » est qu'il permet de traiter un grand nombre de séquences en un temps très court (quelques secondes pour analyser plusieurs centaines de séquences). Son utilisation est préférable à l'UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using the Arithmetic Average) qui suppose que toutes les séquences

évoluent à la même vitesse, mais moins satisfaisante que le Maximum de Vraisemblance (Bertrand *et al.*, 2012).

8.2.2. Métagénomique

On peut dire que l'un des événements les plus remarquables dans le domaine de l'écologie microbienne au cours des dernières décennies a été l'avènement et le développement de la métagénomique.

L'idée de la métagénomique a été initialement énoncée par (Pace *et al.*, 1985). Par la suite, (Schmidt *et al.*, 1991) ont été les pionniers à appliquer ce concept, en clonant directement de l'ADN extrait d'échantillons d'eau de mer dans des phages lambda. La technique fut ensuite reprise et améliorée par DeLong et son équipe qui ont cloné des grands fragments d'ADN planctonique marin dans des fosmidés, marquant ainsi le point de départ de la métagénomique (Stein *et al.*, 1996). En 1998, c'était la première fois que le terme métagénomique a été mentionné officiellement par (Handelsman *et al.*, 1998), qui ont appliqué l'approche du clonage sur le microbiote du sol.

La métagénomique, ou encore génomique environnementale ou génomique des communautés, indique l'étude du métagénome, qui lui-même réfère à l'ensemble des séquences d'ADN extraites de communautés multi-espèces prélevées dans l'environnement (sol, eau, etc.). Ces communautés sont généralement composées d'organismes non cultivables, soit qu'ils ne sont pas ciblés par les conditions de culture car non-connus, soit qu'ils résistent aux tentatives de culture (Baussand et Carbone, 2006). En d'autre terme, la métagénomique est l'étude des séquences de tout ou partie de l'ADN extrait d'échantillons de milieux naturels qui renferme les génomes de la totalité des organismes présents. Elle permet l'étude des communautés de microorganismes directement dans leur environnement naturel, sans passer par les méthodes d'isolement et de culture en laboratoire de souches individuelles (Chen et Pachter, 2005).

Récemment, des études sur la métagénomique, la métatranscriptomique et la métaprotéomique ont proposé un criblage rapide de nouvelles enzymes à partir de microorganismes non cultivables spécialement identifiés dans des environnements extrêmes comme, les régions arides, salines, thermophiles et arctiques (Mukhtar *et al.*, 2017).

8.2.3. Clonage et séquençage de l'ADNr 16S

Cette approche est l'une des premières à avoir été utilisée pour s'affranchir des méthodes culturales. Les différentes étapes de cette approche consistent : à extraire et à purifier l'ADN bactérien total, à partir d'un échantillon prélevé dans l'environnement (sol) ; à amplifier par PCR le gène codant pour l'ARNr 16S ; à cloner les produits ainsi générés ; à séquencer les clones de la banque ; et enfin offrir la possibilité d'estimer la diversité bactérienne par génération d'arbres phylogénétiques.

8.2.3.1. Extraction et purification de l'ADN bactérien du sol

Après échantillonnage, il est très important de bien conserver les échantillons de sol afin de garder les cellules intactes et de limiter la dégradation des acides nucléiques. La méthode de conservation dans le froid par congélation est la plus souvent utilisée.

La phase la plus critique dans l'approche moléculaire de la biodiversité du sol est certainement celle de l'extraction de l'ADN. Une autre difficulté à résoudre tient à la purification de l'ADN du sol : les acides humiques sont difficiles à séparer de l'ADN et inhibent fortement la réaction de la PCR (Daniel, 2005). Pour réaliser l'amplification d'un segment d'ADN par PCR, il est indispensable que ce segment ne soit pas coupé ; l'ADN doit être le plus intact possible, ce qui interdit l'application de traitements d'extraction trop violents. Or, l'ADN bactérien est contenu dans le cytoplasme lui-même entouré d'une paroi solide qu'il faut rompre pour l'extraction. Certaines bactéries ont une paroi particulièrement résistante (comme celle des Gram positives), aussi leur ADN risque-t-il de n'être que peu, voire pas du tout extrait. C'est là l'un des principaux obstacles de l'approche moléculaire. Même limité par l'extraction de la molécule, la fenêtre ouverte sur la diversité microbienne à partir de l'ADN du sol est donc bien différente et probablement plus large que celle définie par la culture des organismes (Gobat *et al.*, 2010).

Plusieurs protocoles d'extraction d'ADN ont été mis au point, et de nombreux kits commerciaux d'extraction d'ADN sont disponibles (Daniel, 2005). Ces protocoles utilisent plusieurs méthodes de lyse des cellules qui peuvent être chimique (par des détergents et enzymes), mécanique (par des billes en mouvement « bead beating ») ou physique (rupture par microonde). La purification des ADN extraits se fait généralement sur des colonnes de silice (Miller, 2001).

8.2.3.2. Méthode de la PCR

L'étape d'amplification va permettre de cibler le *locus* génomique d'intérêt, qui est dans notre cas l'ADNr 16S, et d'en synthétiser une quantité suffisante pour le clonage et/ou le séquençage.

La PCR consiste à amplifier un segment défini d'ADN au moyen d'une enzyme, l'ADN polymérase, travaillant à température élevée. Ce segment est défini par deux séquences de 15 à 25 bases, situées chacune à l'une de ses extrémités sur, respectivement, l'un et l'autre brin de la molécule. C'est à partir de ces amorces complémentaires, que vient se fixer la polymérase pour effectuer la réplication de la molécule. Le choix des amorces se fait souvent sur base bibliographique, en utilisant un couple déjà valide par des études précédentes sur le même type de microbiote (Siegwald, 2017).

Chaque doublement de la quantité d'ADN du segment considéré implique trois phases, se déroulant à des températures différentes, contrôlées par une machine automatique (thermo-cycler) : la dénaturation (séparation des deux brins d'ADN, p.ex. 94°C), la fixation des amorces (p.ex. 62°C) et la réplication (p.ex. 72°C). A chaque cycle de ces trois phases la quantité d'ADN du segment considéré est doublée. Après une vingtaine de cycle, le segment d'ADN d'origine est amplifié jusqu'à un million de fois. En choisissant par exemple un couple d'amorces, dont les séquences de nucléotides correspondent à des régions identiques chez toutes les *Bacteria*, et situées près de chacune des extrémités du gène codant pour l'ARNr 16S, on amplifie par PCR un segment représentant la plus grande partie de ce gène chez tous les ADN bactériens présents. Les gènes correspondants dans les ADN des autres domaines d'organismes (*Eucarya* et *Archaea*) ne sont en revanche pas amplifiés, car les amorces spécifiques aux bactéries n'y trouvent pas leurs séquences complémentaires.

Des gènes codant pour des fonctions peuvent également être amplifiés par PCR, à condition qu'ils soient homologues et possèdent des séquences de nucléotides suffisamment chez les différentes espèces, de manière à ce qu'ils soient reconnus par des amorces communes (Gobat *et al.*, 2010).

8.2.3.3. Clonage moléculaire

De manière à caractériser les fragments PCR et à essayer d'identifier les organismes d'origines, il faut les amplifier individuellement. Pour cela, il est nécessaire de les cloner, c'est-à-dire de les introduire dans des cellules bactériennes (organisme

hôte), généralement *Escherichia coli*, après les avoir inclus dans des plasmides spécifiques de cette bactérie. Le fait de faire rentrer de l'ADN étranger au sein d'une cellule hôte s'appelle une « transformation » chez les procaryotes. Les plasmides sont les vecteurs, les plus souvent utilisés pour l'insertion des produits PCR de petite taille (1500 pb pour l'ADNr 16S). Ce sont des molécules d'ADN extrachromosomiques, circulaires, bicaténaires, de petites tailles et doivent posséder pour réaliser le clonage, au minima : une origine de répllication, un site de clonage multiple et un ou plusieurs gènes permettant la sélection (résistance à un antibiotique, Lac Z...) (Saulnier, 2015).

Le clonage peut être réalisé directement sur produits de PCR en utilisant le principe du clonage TA (TA-cloning) (Mead *et al.*, 1991) ou après digestion du produit de PCR et d'un vecteur afin de réaliser des clonages en bouts francs et ou en bouts cohésifs. L'avantage de la dernière méthode est de connaître l'orientation du fragment inséré, mais le traitement du produit de PCR par des enzymes peut entraîner une digestion partielle de ce dernier. Il n'est alors pas possible d'accéder à la séquence du gène dans son intégrité (Corre, 2000).

Le "TA-Cloning" est une méthode de clonage simple et rapide. Le principe de cette méthode repose sur le fait que les ADN polymérase dépourvues d'activité exonucléase de 3' vers 5' (dont la Taq polymérase) ajoutent préférentiellement une Adénine (A) supplémentaire en 3' en fin d'élongation. Par le biais de vecteur de clonage fournis linéarisé avec une Thymine (T) sortante à chaque extrémité 3'OH (par exemple : pGEM-T). L'insertion du fragment d'intérêt sera facilité, grâce à la complémentarité des bases. Cependant, l'insertion du fragment n'est pas orientée. En vue d'un futur séquençage, cela n'est pas nécessaire. Chacun des clones ainsi obtenus reproduit la séquence du gène ADNr 16S d'un des membres de la communauté bactérienne de l'échantillon. On choisit un certain nombre de ces clones recombinés, qui sont le plus souvent sélectionnés avec le système blanc/bleu de l'opéron lactose, d'où l'on extrait les segments en question, pour le séquencer et le caractériser (Saulnier, 2015).

La détermination de la taille de l'insert cible, du vecteur de clonage et du nombre minimum de clones de la bibliothèque est régie par le type de gènes recherchés et la complexité de la communauté microbienne (Sabree *et al.*, 2009). Des courbes de collection ou d'abondance (de raréfaction) ainsi que des estimateurs de richesse spécifique ont été produits, et permettent de vérifier si une librairie de clones est suffisamment large pour estimer une richesse phylotypique stable d'une communauté

microbienne environnementale (Kemp et Aller, 2004). Les estimateurs les plus couramment utilisés sont les indices de Simpson, de Shannon et Chao 1.

8.2.3.4. Séquençage de Sanger

Le séquençage de l'ADN, est la détermination de la succession des nucléotides le composant.

❖ Principe de la Méthode de Sanger *et al.*, (1977)

Cette méthode est basée sur l'interruption de la synthèse enzymatique d'un brin d'ADN complémentaire (arrêt d'élongation). L'ADN à séquencer est cloné et de nombreuses molécules d'ADN simple brin sont produites. Une amorce (généralement synthétisée chimiquement et éventuellement marquée) est ajoutée à l'ADN. Le point de fixation de l'amorce sert de point de départ pour la synthèse du brin complémentaire. La polymérase est alors ajoutée avec :

- les quatre nucléotides normaux : d-ATP, d-CTP, d-GTP et d-TTP (au moins un d'entre eux est marqué au phosphore 32, au Phosphore 33 ou au soufre 35) ;
- une faible concentration de quatre nucléotides analogues dans des incubations séparées. Les analogues sont des didésoxynucléotides (ddNTP) qui sont identiques aux nucléotides normaux sauf que les groupes hydroxyles (OH) des riboses sont remplacés par des hydrogènes (H). La polymérase ne peut pas distinguer ce substrat des nucléotides normaux.

La synthèse du brin d'ADN complémentaire est initiée au niveau de l'amorce. L'intégration d'un didésoxynucléotide dans le brin synthétisé entraîne l'arrêt de l'élongation en raison de l'absence du groupement OH, nécessaire à l'extension. Les quatre incubations contiennent donc un mélange de molécules partiellement synthétisées d'ADN double brin marqué. La longueur des fragments d'ADN varie en fonction du point d'intégration du didésoxynucléotide. Comme cette intégration est aléatoire, l'ensemble des molécules dans un mélange représente l'ensemble des positions pour une base particulière. Les quatre mélanges sont analysés simultanément sur un gel d'électrophorèse. Celui-ci contient un composé qui entraîne la dénaturation de l'ADN double brin et le processus est mené sous un voltage fort pour éviter la réassociation des brins. Les bandes sont révélées par autoradiographie et la séquence est lue directement sur le gel. Une adaptation de cette technique consiste à marquer les didésoxynucléotides plutôt que les amorces, ce qui permet de n'utiliser qu'un seul mélange au lieu des quatre nécessaires dans le cas d'un marquage des amorces. Chaque

didésoxyribonucléotides est marqué par un fluorophore spécifique. Les fragments d'ADN synthétisés portent ce fluorophore terminal. On les appelle des terminateurs d'élongation ou "Big Dye Terminators" ou "Dye-labeled terminator". Dans ce cas on parle d'un séquençage par arrêt de synthèse à l'aide d'un terminateur marqué «dye terminator sequencing» proposé par Smith *et al.*, (1986). C'est la technique actuellement utilisée dans certains séquenceurs automatisés.

❖ Automatisation de la technique de Sanger *et al.*, (1977)

Au cours des 40 dernières années, la méthode de Sanger a été largement développée grâce à plusieurs avancées technologiques importantes :

- Le développement de la synthèse chimique automatisée des amorces.
- L'introduction de traceurs fluorescents à la place des marqueurs radioactifs utilisés initialement. Ce progrès a permis de sortir le séquençage des pièces confinées, réservées à l'usage des radioisotopes.
- L'adaptation de la technique PCR pour le séquençage.
- L'utilisation de séquenceurs automatiques de gènes.
- L'utilisation de l'électrophorèse capillaire pour la séparation et l'analyse (El Fahime et Ennaji, 2007).

A côté des séquenceurs en gel plat, les séquenceurs capillaires ont apporté une plus grande automatisation dans les laboratoires de plus en plus demandeurs en séquençage de routine. La technique de Sanger est celle qui est mise en œuvre dans les premiers séquenceurs automatiques (Le premier séquenceur automatisé a été mis au point en 1987, par la compagnie Applied Biosystem ABI). En général l'automatisation requiert l'emploi :

- d'un système d'électrophorèse piloté par ordinateur,
- des marqueurs fluorescents de différentes couleurs qui sont révélés après excitation par un laser à l'aide d'une caméra CCD (Charge Coupled Device),
- des logiciels permettant l'analyse des signaux sortant de l'appareil et leur mise en forme sous forme de résultats (électrophorégramme et séquence) (figure 5),
- d'un robot passeur d'échantillon permettant d'enchaîner les échantillons les uns à la suite des autres (notamment passage de plaques de réaction à 96 puits).

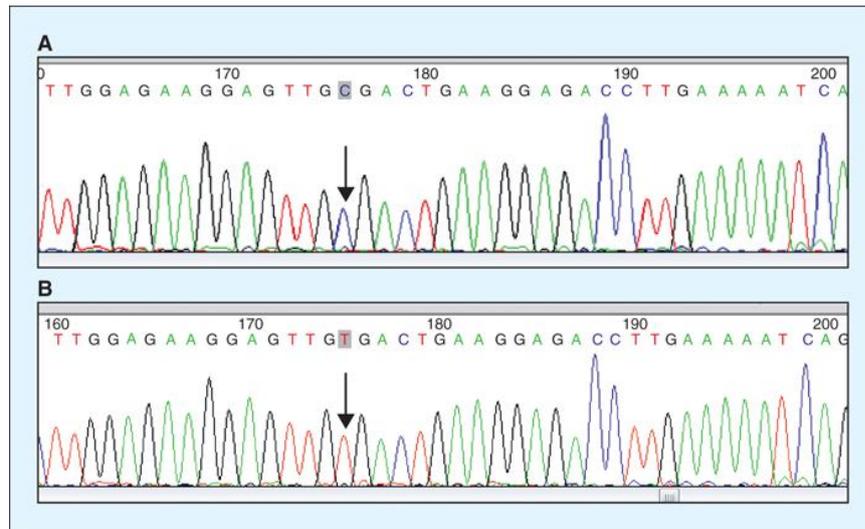


Figure 5 : exemple de deux électrophorégrammes A et B.

❖ Séquenceurs capillaires

Un séquenceur de gènes à capillaire utilise des tubes capillaires de verre ayant quelques microns de diamètre, sur plusieurs dizaines de centimètres de longueur (30 à 50 cm en général), pour réaliser la séparation des brins d'ADN durant l'électrophorèse. Avec généralement un nombre de capillaires multiples de 2 (2, 4, 8, 16...). On multiplie ainsi le nombre de migrations simultanées, ce qui permet de passer un plus grand nombre d'échantillons dans le même laps de temps. Les instruments à capillaire les plus modernes de séquençage automatique de l'ADN sont capables de lire jusqu'à 384 échantillons d'un coup (1 run) et réaliser jusqu'à 24 runs en une journée. Ces instruments ne réalisent que la séparation des brins et la lecture des pics ; les réactions de séquençage, la purification et la suspension dans un tampon approprié doivent être réalisées séparément, de façon manuelle ou à l'aide d'un robot pipeter. Les séquenceurs automatiques présentent de nombreux avantages : l'automatisation et l'utilisation d'une chromatographie au lieu d'une électrophorèse permet un gain de temps appréciable. Le coût de revient est bien moindre. De plus, alors qu'on ne peut guère espérer lire plus de 300 nucléotides de manière correcte lors d'un séquençage « à la main », les séquenceurs permettent de lire plusieurs centaines de nucléotides avec une très bonne qualité, jusqu'à 1000 à 1100 pb pour les appareils les plus performants. La seule limitation à l'utilisation de séquenceurs automatiques reste leur coût élevé d'achat et de maintenance, ce qui impose, concrètement, la mise en place de services communs de séquençage dans les centres de recherches (El Fahime et Ennaji, 2007).

8.2.3.5. Séquençage de nouvelle génération

Par clonage-séquençage des gènes ribosomiques, on peut identifier la position phylogénétique des organismes d'une communauté, mais on n'a pas d'information sur les fonctions qu'ils sont à même de remplir. De même pour les gènes fonctionnels, on peut établir et comparer leurs séquences, mais on ne sait pas à quelle espèce ces gènes appartiennent. En outre le choix des amorces pour la PCR se fait à partir de séquences connues d'organismes cultivés. De nombreux gènes aux séquences inconnues échappent ainsi à l'investigation (Gobat *et al.*, 2010).

Actuellement, la métagénomique s'appuie fortement sur le séquençage de nouvelle génération (NGS : *Next-Generation Sequencing*) afin de réaliser du séquençage à très haut débit. Il s'agit en fait de séquencer un très grand nombre (des millions) de fragments d'ADN provenant d'un échantillon, directement après extraction, sans passer par une étape laborieuse de clonage. Parmi les technologies NGS qui ont été largement appliquées aux échantillons métagénomiques, on peut citer : les systèmes 454 ou pyroséquençages (de Roche) et Illumina (de Solexa). Le coût de production des données est ainsi de plus en plus faible. Mais, si l'utilisation des NGS permet d'obtenir énormément de données à coût modéré, ces nouvelles technologies apportent aussi leur lot de difficultés. En effet, depuis peu de temps, la génération des données n'est plus le point limitant d'une étude métagénomique ; c'est dorénavant l'analyse des données qui est longue et coûteuse. L'augmentation considérable de la quantité de données pose ainsi de nouveaux challenges aux logiciels existants d'où la recherche et le développement continuels d'outils informatiques puissants.

Bien que l'avènement des NGS offrent une vue assez large sur la diversité, il faut préciser qu'il est souvent très difficile, voire impossible, d'avoir en sortie d'une analyse métagénomique la liste précise de tous les génomes présents dans l'échantillon à l'origine. Par contre, on peut avoir des informations pertinentes sur la communauté microbienne qui vit dans le milieu, sur l'activité d'un écosystème à un moment donné... Enfin, cela permet d'étudier le fonctionnement des organismes tels qu'ils sont dans leur environnement et non pas tels qu'ils sont après quelque temps passé dans un laboratoire, isolés des autres organismes (Nicolas, 2012).

Aussi, le séquençage de Sanger est toujours appliqué après culture ou dans la métagénomique, en raison de son taux faible d'erreurs et de sa longueur de lecture qui est supérieure à 700 pb.

MATERIEL ET METHODES

1. Sites d'étude

Au cours de ce travail, trois sites de prélèvements ont été ciblés (figures 6, 7, 8 et 9).

1.1. Sebkhia d'Ezzemoul

Le site fait partie des hauts plateaux de l'est situés dans les étages bioclimatiques semi-arides à arides (100 à 400 mm/an de précipitation) et renfermant de grandes dépressions continentales salées appelées chotts et sebkhas. Il est situé à 17 Km au sud de la ville de Aïn M'lila et à 10 Km à l'est de la commune de Souk Nâmane, à proximité du chott Tinsilt, avec pour latitude : 35° 53' 14'' au Nord, et pour longitude : 06° 30' 20'' à l'Est. Il a été classé comme site Ramsar le 18 décembre 2009. La commune d'Ouled Zouaï se trouve à environ 200 m de la rive sud de la sebkha qui, administrativement, dépend de la Wilaya d'Oum El Bouaghi, des daïras de Souk Nâmane et de Aïn Kercha puis des communes d'Ouled Zouaï et Harmelia. Cette dernière est située à 1 Km au Nord-Est du site.

Cette sebkha est constituée d'un plan d'eau salé, temporaire et peu profond atteignant rarement les 40 cm. Elle a une superficie de 6 765 hectares. Ce plan d'eau est cerné d'un encroûtement de sel très important, limité par une prairie à base d'une végétation halophile, et de terrains agricoles à céréales. L'extraction de sel par l'ENASEL se fait à partir de la rive Ouest de la sebkha dans sa partie orientale. Il est adjacent à un autre lac salé, classé sur la Liste Ramsar, Chott Tinsilt (Moali et Remichi, 2009).



Figure 6 : Photo de la vue générale de la sebkha d'Ezzemoul.

1.2. Chott Tinsilt

Le site se situe dans l'étage bioclimatique semi-aride caractérisé par un climat continental froid, pluvieux en hiver et chaud et sec en été. Il se situe à 5 km de la

commune de Souk-Naâmane et à 17 Km au sud de la ville de Aïn M'lila. Il longe la route nationale n°3 desservant les villes de Constantine, Batna et la voie ferrée qui dessert Constantine et Biskra et la sebkha d'Ezzemoul. Il se trouve à l'Est avec pour latitude : 35° 53' 00" au Nord, et pour longitude : 6° 29' 00" à l'Est). Il est classé comme site Ramsar depuis le 12 décembre 2004. Il fait partie, sur le plan administratif, de la wilaya d'Oum El Bouaghi, de la daïra de Souk Naâmane et de la commune d'Ouled Zouaï. Il a une superficie de 2 154 hectares et une profondeur qui ne dépasse jamais 0,5 mètre (Boumezbeur et Khalfallah, 2005).

Le chott est alimenté essentiellement par les eaux pluviales provenant de l'Oued Zrhaib et des eaux usées du village de Souk Naamane (Ladjal, 1995).

Le chott est exploité par la céréaliculture. Nous notons aussi la présence d'une végétation naturelle dont les espèces connues sont représentées par *Salicornia arabica*, *Ruppia maritima* et *Atriplex* (Messaoui et Besouli, 2004).



Figure 7 : Photo de la vue générale de Chott Tinsilt.

1.3. Sebkha de Djendli

Ce site « ancien Lacus Regius » fait partie de la wilaya de Batna, de la daïra de Chemora et de la commune de Boumia avec pour latitude : 35° 43' 15" au Nord, et pour longitude : 06° 32' 23" à l'Est).

A elle seule et avec ses 3200 hectares, sa faune et sa flore, la sebkha de Djendli, située non loin de la commune de Djerma, est pratiquement la seule zone humide importante de Batna. Elle peut ainsi prétendre à une inscription sur la liste Ramsar. Des procédures préliminaires ont été engagées et la sebkha de Djendli a été proposé en février 2007 afin d'être classée comme site Ramsar (Chenchouni, 2009). Elle se trouve entourée de trois

chaînes de montagnes : Djebel Bou Arif au Sud, Djebel Toumbait au Nord et Djebel Taфраout à l'Est. Elle s'ouvre également à l'Est sur les plaines de Boulhilet et de Chemorah (Adjal et Mouici, 2004).

Le site est alimenté principalement par les eaux pluviales ; il est fréquenté régulièrement par une grande variété d'oiseaux d'eau, notamment le flamant rose et le Tadorne de Belon.



Figure 8 : Photo de la vue générale de la sebkha de Djendli.

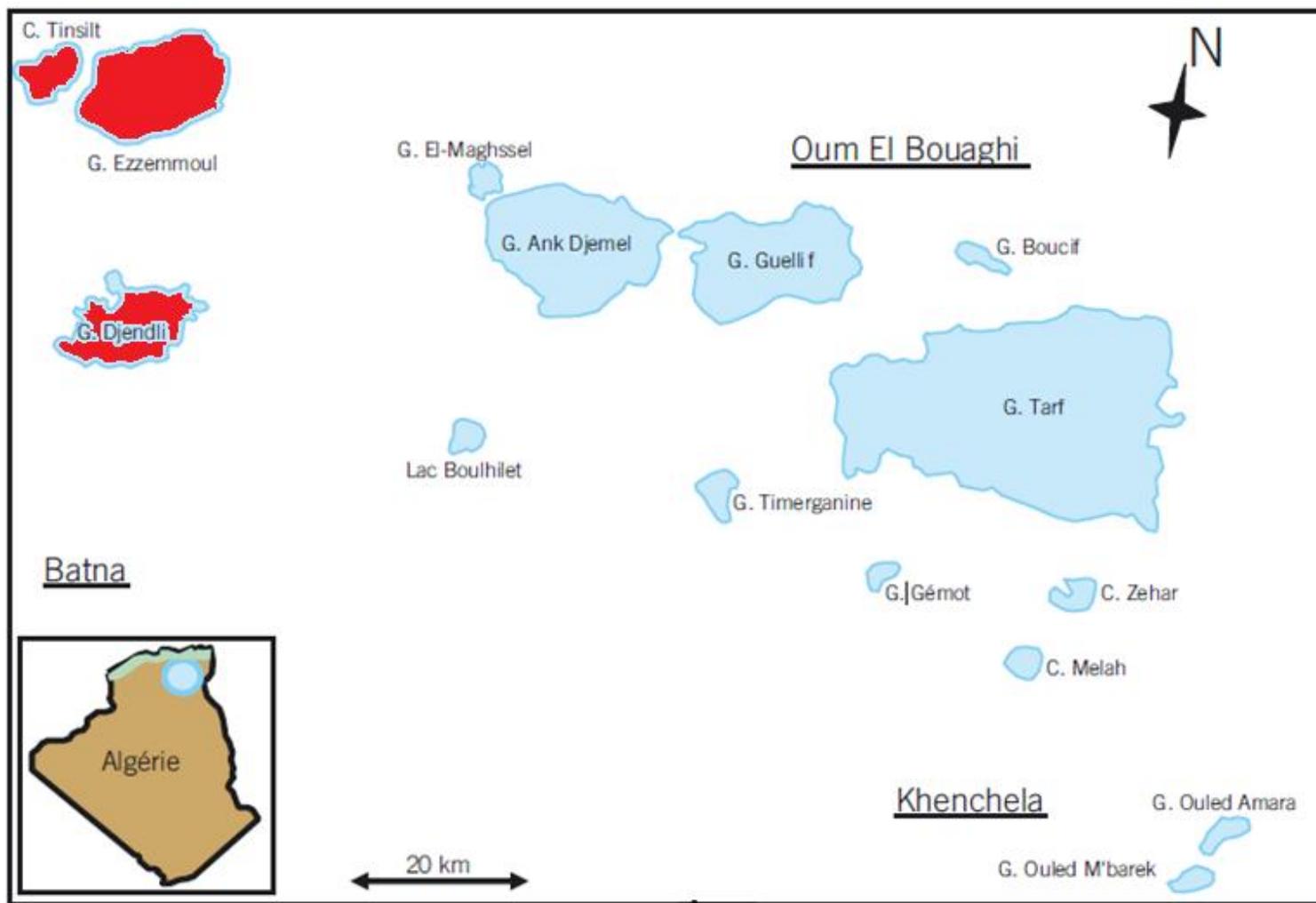


Figure 9 : Situation géographique des zones humides des hauts plateaux de l'Est de l'Algérie. Les trois zones de cette étude (Ezzemmoul, Tinsilt et Djendli) se trouvent en haut à gauche de la figure. C : Chott et G : Garaet (Houhamdi *et al.*, 2009).

2. Echantillonnage

27 échantillons de sol ont été prélevés des trois sites : la sebkha d'Ezzmoul, Chott Tinsilt et de la sebkha de Djendli (9 échantillons ont été prélevés de chaque site, en allant de la rhizosphère vers le centre) (figures 10 et 11). L'échantillonnage a été réalisé au mois de mars de l'année 2013.

A l'aide d'une spatule stérile, les cinq premiers centimètres de la couche superficielle du sol sont écartés, 100 à 150 grammes de terre (entre 5 et 15 centimètres de profondeur) sont alors prélevés avec une petite spatule stérile. Ils sont déposés sur une feuille d'aluminium stérile. Les gros débris sont écartés (pierre, racines etc.) et environ 50 grammes sont placés dans un flacon stérile et transportés au laboratoire (Pochon et Tardieux, 1962).

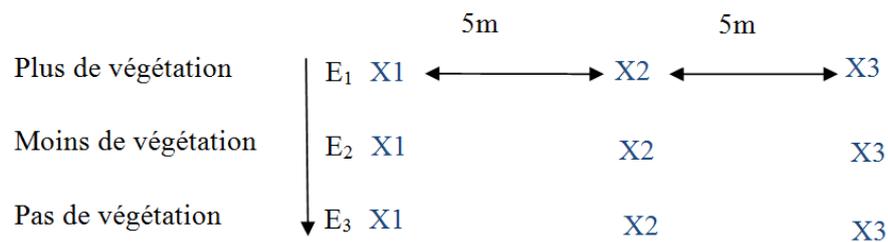


Figure 10 : Schéma du processus d'échantillonnage par site. E₁ : Echantillon prélevé de la partie du site contenant de la végétation (rhizosphère), E₂ : Echantillon prélevé de la partie du site où il y a moins de végétation, E₃ : Echantillon prélevé de la partie du site où il n'y a pas de végétation. Chacun des échantillons E₁, E₂, E₃ est prélevé trois fois (X1, X2, X3) à une distance de 5 m entre X1, X2, X3.



Figure 11 : Photos des échantillons de sol. (EE₁) Echantillon n° 1 de la sebkha d'Ezzemmoul, (EE₂) Echantillon n°2 de la sebkha d'Ezzemmoul, (EE₃) Echantillon n°3 de la sebkha d'Ezzemmoul, (TE₁) Echantillon n° 1 de chott Tinsilt, (TE₂) Echantillon n° 2 de chott Tinsilt, (TE₃) Echantillon n° 3 de chott Tinsilt, (DE₁) Echantillon n°1 de la sebkha de Djendli, (DE₂) Echantillon n°2 de la sebkha de Djendli, (DE₃) Echantillon n°3 de la sebkha de Djendli. 1 : Echantillon prélevé de la partie du site contenant de la végétation (rhizosphère), 2 : Echantillon prélevé de la partie du site où il y a moins de végétation, 3 : Echantillon prélevé de la partie du site où il n'y a pas de végétation.

3. Etude physico-chimique des échantillons

3.1. Mesure du pH

Vingt grammes de sol sec tamisé (avec un tamis de 2 mm de diamètre) sont mis en suspension dans 50 ml d'eau distillée (selon le rapport $\frac{\text{sol}}{\text{eau}} = \frac{1}{2,5}$). Après une demi-heure d'agitation à l'aide d'un agitateur magnétique, le pH est alors mesuré à l'aide d'un pH mètre de type HANNA (Pochon et Tardieux, 1962).

3.2. Détermination de la conductivité électrique CE et de la salinité

Vingt grammes de sol sec tamisé (avec un tamis de 2 mm de diamètre) sont mis en suspension dans 100 ml d'eau distillée. Après une heure d'agitation dans un agitateur culbuteur, suivie de 30 min de repos, jusqu'à l'obtention de la sédimentation de la terre. Le liquide surnageant est transféré dans un bécher, et la conductivité est mesurée à l'aide d'un conductimètre de type WTW. La salinité (salure) est égale à cinq fois la conductivité (Richards, 1954).

3.3. Pourcentage d'humidité

Les échantillons de sol sont séchés au four Pasteur à $105 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à l'obtention d'un poids constant. La différence entre le poids avant et après séchage, exprime la teneur en eau de l'échantillon initial. Le poids après séchage représente la matière sèche. Le pourcentage d'humidité est calculé d'après la relation (Lee et Hwang, 2002) :

$$H = \frac{PH - PS}{PH} \times 100$$

H: humidité en pour cent (%).

PH: poids humide de l'échantillon

PS : poids sec de l'échantillon

3.4. Taux de la matière organique

Après calcul de l'humidité, le sol de chaque échantillon est incinéré dans un four à moufle à $450 \text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 16 heures (Lee et Hwang, 2002). Le taux de la matière

organique est calculé selon la relation : $MO = \frac{PS - PC}{PS} \times 100$

MO : matière organique en pour cent (%).

PS : poids sec de l'échantillon.

PC : poids des cendres de l'échantillon.

3.5. Granulométrie

L'analyse granulométrique consiste à séparer la partie minérale de la terre, en catégories classées, d'après la dimension des particules minérales inférieures à 2mm et afin de déterminer, les proportions relatives de ces catégories, en pourcentage de la masse totale du sol minéral. Les particules minérales ont été classées selon l'échelle internationale de la façon suivante :

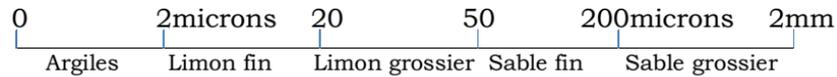


Figure 12 : Echelle internationale de classification des particules minérales du sol (Aubert, 1978).

L'analyse granulométrique par sédimentométrie s'adresse à des échantillons de sols ne contenant que des éléments de diamètre inférieur à 100 μm , c'est-à-dire ce qui est désigné sous l'appellation de sols fins. Elle complète l'analyse granulométrique par tamisage qui est limitée aux grains de diamètre supérieur à 0,063 mm. Elle permet de tracer la courbe granulométrique des éléments fins jusqu'à un diamètre d'environ 2 μm (Dupain *et al.*, 2000). Cette analyse a été réalisée par le laboratoire de géologie et hydrologie de Sidi Mabrouk Constantine.

4. Prétraitement des échantillons

Les trois échantillons de sol de la sebkha d'Ezzemoul uniquement, ont subi deux types de prétraitement :

1. Le prétraitement thermique qui consiste à chauffer 2 g de chaque échantillon à 50°C pendant une heure (Takizawa *et al.*, 1993).
2. Le prétraitement chimique qui consiste à traiter 1g de sol de chaque échantillon avec 0,1 g de CaCO_3 . Le mélange est mis dans une enceinte stérile saturée d'humidité pendant une semaine à 28°C (Cavalla et Eberlin, 1994).

5. Isolement, dénombrement et conservation des isolats

5.1. Isolement

Dans le but d'isoler les actinobactéries halotolérantes et halophiles faibles, modérées et extrêmes à partir des trois sites Ezzemoul, Tinsilt et Djnedli, nous avons essayé de préparer un protocole approprié. Tout d'abord nous avons testé les échantillons de sol d'un seul site qui est la sebkha d'Ezzemoul, sur trois milieux de

culture spécifiques des actinobactéries (glucose-asparagine, Olson et ISP5), auxquels nous avons additionné la plus faible concentration de NaCl (celle de 2 %, qui vise les halophiles faibles). Aussi, ces mêmes échantillons ont subis des traitements thermique et chimique (voir le paragraphe 4) avant de réaliser l'isolement, uniquement sur le milieu ISP5 supplémenté de 2 % de sel.

Selon les résultats préliminaires obtenus (voir les détails dans le paragraphe « isolement et dénombrement », dans la partie résultats et discussion), nous avons choisi de continuer l'isolement sur le milieu ISP5 additionné de 2, 5, 10 et 15 % de NaCl, sans prétraitements des échantillons de sol des trois sites d'étude.

Il faut noter qu'avant d'entamer la procédure de l'isolement, tous les échantillons ont été séchés à température ambiante. Puis, des échantillons composites ont été préparés par mélange des échantillons X1, X2 et X3 de chaque site. Ensuite, 2 g de chaque échantillon de sol ont été suspendus dans 18 ml d'eau physiologique stérile ; à partir desquels quatre dilutions décimales ont été préparées, et 100 µl de chaque dilution ont été ainsi étalés sur les milieux de cultures cités ci-dessus. En plus, ces derniers ont été additionnés d'un antifongique (la nystatine à 50 µg/l) et d'un antibactérien anti-Gram négatif (la polymyxine à 20 µg/l). Les boîtes de Pétri sont incubées à 30 °C pendant 3 à 4 semaines.

5.2. Dénombrement

Après la période d'incubation nécessaire (21 jours), le dénombrement est réalisé pour toute la flore apparente sur les boîtes de Pétri à l'aide d'un compteur automatique de colonies muni d'une loupe grossissante. Les colonies des champignons, des bactéries et notamment les actinobactéries sont dénombrées en fonction de leur aspect macroscopique caractéristique et estimées en UFC/g.

5.3. Conservation

Dans un premier temps, les colonies d'actinobactéries sont repérées d'après leur aspect macroscopique caractéristique (colonies dures incrustées dans la gélose). Puis par leur aspect microscopique filamenteux (colonies circulaires constituées d'hyphes), par observation directe sous microscope optique (Leica DMLS, grossissement $\times 10$). Les colonies sont ensuite purifiées par repiquage, sur le même milieu d'isolement ISP5 exempt d'antifongique et d'antibactérien.

Les souches purifiées appartenant aux actinobactéries sont conservées en gélose inclinée sur le milieu ISP5 à 4°C pour une période de quelques mois et au congélateur à -20 °C après culture liquide sur le milieu ISP5 en présence de glycérol (50%, v/v) utilisé comme cryo-protecteur pour une durée plus longue.

6. Identification moléculaire

6.1. Extraction de l'ADN génomique

Les colonies sont inoculées dans des tubes contenant 5 ml du milieu ISP5 liquide. Elles sont cultivées à 30°C dans un incubateur-agitateur à une vitesse de 120 rpm, pendant 4 à 7 jours. La culture est ensuite centrifugée à 12000 g pendant 1 min à 4°C, l'extraction d'ADN génomique à partir du culot bactérien est réalisée selon deux méthodes :

6.1.1. Extraction de l'ADN par une lyse chimique alcaline

Le culot bactérien est repris dans 100 µl de la solution d'extraction froide (Solution 1, annexe 2). Après homogénéisation, 200 µl d'une deuxième solution (la solution 2, annexe 2) sont ajoutés. Le mélange est placé dans la glace pendant 10 min. 150 µl d'une troisième solution (la solution 3, annexe 2) glacée sont alors rajoutés. Le tout est bien mélangé et mis dans la glace pendant 5 min. Après centrifugation à 12000 g pendant 5 min à 4°C, deux volumes d'éthanol à 100% sont mélangés au surnageant pour précipiter l'ADN et ce pendant 2 min à température ambiante. Une autre centrifugation est réalisée, le surnageant est éliminé et un volume d'éthanol à 70 % est rajouté. Une autre centrifugation est effectuée, pour éliminer à nouveau le surnageant. Après séchage à l'air libre, le culot est suspendu dans 50 µl de Tris-EDTA (TE) (Maniatis *et al.*, 1992).

6.1.2. Extraction de l'ADN par choc thermique

Le culot bactérien est repris dans 500 µl de Tris-EDTA (TE). Après homogénéisation et centrifugation à 12000 g pendant 5 min à 4°C, le culot est recueilli dans le TE. Les cellules bactériennes sont chauffées à 100°C pendant 10 min, puis refroidies sur glace pendant 5 min. Après centrifugation à 7500 g pendant 3 min à 4°C, le surnageant contenant l'ADN bactérien est récupéré et conservé à -20°C pour une utilisation ultérieure (Queipo-Ortuño *et al.*, 2008).

6.3. Amplification des séquences des gènes ADNr 16S

Le gène codant l'ARN ribosomal 16S a été amplifié par PCR dans un thermocycler de type Eppendorf, en utilisant les amorces universelles 27F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) et 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) (Lane, 1991). La taille du fragment amplifié par ces amorces est d'environ 1500 paires de bases (pb). L'amplification est réalisée dans un volume final de 25 µl (23 µl du mélange réactionnel et 2 µl d'ADN extrait). La composition du mélange réactionnel et le programme de la PCR sont consignés dans les tableaux 6 et 7.

A chaque réaction de PCR, un contrôle positif (mélange réactionnel additionné de l'ADN d'*Escherichia coli*) et un contrôle négatif (mélange réactionnel additionné d'eau stérile), sont soumis aux mêmes conditions d'amplification.

Tableau 6 : Composition du mélange réactionnel (pour une réaction PCR).

Composés	Volume en µl par tube
Eau pure stérile (Sigma Life Science)	16,35
Tampon 10X contenant 15 mM MgCl ₂ (Roche)	2,5
dNTP 2,5 mM (Roche)	2
Amorce 27F 10 µM (GATC Biotech)	1
Amorce 1492R 10 µM (GATC Biotech)	1
AmpliTaq ADN polymérase 5U/µl (Roche)	0,15
ADN extrait	2

Tableau 7 : Programme de PCR.

	Étapes	Température (°C)	Temps
	Dénaturation initiale	95	4 min
30 cycles	Dénaturation	94	30 s
	Hybridation	54	1 min
	Elongation	72	1 min
	Elongation finale	72	10 min

6.4. Electrophorèse sur gel d'agarose à 1%

Après amplification, les mélanges de 5 µl de chaque amplicon (produits PCR) et de 1 µl de tampon de charge sont injectés dans les différents puits de gel d'agarose 1%. 3 µl du marqueur de taille (GenRuler 1KB Plus DNA Ladder de 250 à 20000 paires de base) sont injectés dans le 1^{er} et le dernier puits afin de contrôler la migration de l'ADN. Une tension de 100 V est appliquée pendant 20 à 40 minutes. Après la migration, le gel est trempé dans un bac contenant une solution de bromure d'éthidium BET (0,5%)

pendant 10 minutes, puis rincé dans un bac à eau pendant 15 minutes. Le gel est ensuite examiné sous une lumière ultraviolette pour repérer les bandes d'ADN amplifiées. Ces dernières sont visionnées par le logiciel Vision-capt et photographiées.

6.5. Séquençage capillaire

Les produits PCR bruts ont été purifiés selon le protocole du Kit **illustra™ ExoStar™ 1-Step (GE Healthcare, Life Sciences, UK Limited)**, dans le but d'enlever les amorces et les nucléotides (dNTPS) non utilisés durant la réaction de PCR, pour la préparation au séquençage. La méthode de séquençage utilisée est adaptée à celle décrite par Sanger *et al.*, (1977).

Les amorces utilisées pour le séquençage sont les mêmes que celles utilisées pour l'amplification de l'ADNr 16S. Le séquençage est réalisé avec le séquenceur capillaire **(AB3730, 48 capillaires de la société Applied Biosystems)**, selon le protocole du Kit **Big Dye Terminator (version 3.1, Applied Biosystems)**.

La purification et le séquençage ont été effectués à la plateforme génomique **GenoBiRD, Biogenouest** de l'Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes (France).

6.6. Analyse des séquences

Les résultats du séquençage sont sous forme d'électrophorégrammes bruts. L'analyse et l'assemblage des séquences sont effectués par le logiciel Chromas Pro (ver. 1.5 copyright© 2003-2009 Technelysium Pty Ltd). Les séquences consensus obtenues sont comparées aux séquences disponibles dans la base de données EzBioCloud (Yoon *et al.*, 2017) ainsi que dans la base GenBank du site NCBI par le programme BLAST (Altschul *et al.*, 1990). L'alignement multiple des séquences est réalisé par le programme CLUSTALX 2.0.12 (Larkin *et al.*, 2007).

Les arbres phylogénétiques enracinés ont été construits avec le programme MEGA ver.6.0.6. Selon la méthode de Neighbour-Joining (Saitou et Nei, 1987), la matrice de distance est calculée selon le model Kimura à deux paramètres (Kimura, 1980). La topologie des arbres est évaluée par l'analyse des bootstrap avec 1000 répliques (Felsenstein, 1985).

7. Diversité macroscopique, physiologique et métabolique

7.1. Etude macroscopique et caractères cultureux

Les caractères macroscopiques des isolats sélectionnés sont déterminés sur les milieux gélosés ISP5 et ISP2 (annexe 1). Les isolats sont ensemencés par stries et incubés à 30°C pendant 7 à 14 jours. L'état de croissance, l'aspect des colonies, la couleur du mycélium de substrat et celle du mycélium aérien ainsi que la présence de pigments diffusibles dans la gélose autres que les pigments mélanoïdes sont notés (Shirling et Gottlieb, 1966).

7.2. Etude physiologique

7.2.1. Tolérance au chlorure de sodium

En plus d'avoir été isolées sur le milieu ISP5 additionné de 2, 5, 10 et 15% de NaCl, les souches sélectionnées ont été testées sur le même milieu avec les différentes concentrations (0, 3, 5, 10 et 15%) de NaCl. Tous les isolats ont été testés à la concentration de 0% et aux concentrations supérieures auxquelles ils ont été isolés. L'incubation des boîtes est faite à 30°C pendant 21 jours. La tolérance maximale au NaCl correspond à la dernière concentration présentant encore une croissance (Geraldine et Klaus, 1981).

7.2.2. Croissance à différentes températures

Les différents isolats d'actinomycètes sont ensemencés sur le milieu ISP2 solide. La croissance est estimée pendant 21 jours d'incubation à 5°C, 20°C, 30°C, 37°C, 45°C et 55°C (Chun *et al.*, 1998).

7.2.3. Croissance à différents pH

Les isolats d'actinomycètes sont ensemencés sur le milieu ISP2 gélosé préparé à différents pH (2, 4, 6, 8, 10 et 12). La croissance des souches est appréciée après 21 jours d'incubation à 30°C.

7.3. Etude métabolique

7.3.1. Production de pigments mélanoïdes

La mise en évidence de la production des pigments bruns diffusibles (mélanoïdes), est réalisée par ensemencement des souches sur la gélose ISP7 (annexe 1). Les résultats sont appréciés après 48 heures d'incubation à 30°C, en comparaison avec le milieu témoin non ensemencé (Shirling et Gottlieb, 1966).

7.3.2. Mise en évidence de l'hydrolyse des polysaccharides

7.3.2.1. Hydrolyse de l'amidon

Les souches sont ensemencées sur gélose nutritive contenant 1 % (p/v) d'amidon soluble (annexe 1), après 14 jours d'incubation à 30°C, la culture est recouverte d'une solution de lugol (annexe 2). L'hydrolyse de l'amidon est mise en évidence par l'absence de coloration autour des colonies. Au contraire, les zones contenant de l'amidon se colorent en brun (Gordon et Smith, 1953).

7.3.2.2. Hydrolyse de la cellulose

Afin de rechercher la présence de la cellulase, les souches sont cultivées sur le milieu minimum ISP9 (annexe 1) contenant 1% (p/v) de Carboxy Méthyl Cellulose (CMC). Après 14 jours d'incubation à 30°C, les boîtes sont submergées avec une solution au rouge Congo à 0,1% (p/v), et incubées à 30°C pendant 15 à 30 minutes. Les boîtes sont ensuite lavées par une solution de NaCl 1M durant 5 à 10 minutes à température ambiante. L'apparition de zones claires autour des colonies indique la présence de cellulase (Mwirichia *et al.*, 2010).

7.3.2.3. Hydrolyse de la pectine

Les isolats sont ensemencés sur le milieu pectine agar (annexe 1). Après 14 jours d'incubation à 30°C, les résultats (sous forme d'un halo clair autour des cultures) sont notés après inondation des cultures avec une solution de CTAB (bromure d'héxadecyl tri-méthyl ammonium) à 1% (p/v) et sont laissées à température ambiante pendant quelques minutes (Jacob *et al.*, 2008).

7.3.3. Détermination de l'activité lipolytique : hydrolyse du Tween 80

Les bactéries sont ensemencées (par touche) sur le milieu de Sierra (annexe 1), dans lequel le Tween 80 (monooléate de sorbitane polyoxyéthylène) est utilisé comme substrat lipidique. Après 3 à 9 jours d'incubation à 30°C, l'apparition d'un halo opaque autour des touches, indique que la souche bactérienne possède une enzyme lipolytique (Sierra, 1957).

7.3.4. Détermination de l'activité protéolytique

7.3.4.1. Hydrolyse de la gélatine

Les isolats sont cultivés sur gélose nutritive contenant 0,4% (p/v) de gélatine (annexe 1). Après 14 jours d'incubation à 30°C, une solution de chlorure mercurique (annexe 2) est ajoutée sur la gélose. L'hydrolyse de la gélatine est observée par l'apparition de zones claires autour des colonies, si le milieu de culture devient opaque le test est négatif (Chaphalkar et Dey, 1996).

7.3.4.2. Hydrolyse de la caséine

Les isolats sont ensemencés sur gélose nutritive au lait (10 ml de lait écrémé stérile sont mélangés avec 20 ml de gélose nutritive stérile). Après 7 à 14 jours d'incubation à 30°C, la dégradation de la caséine se traduit par l'apparition d'un halo clair autour de la culture (Larpent et Larpent-Gourgaud, 1970).

7.3.4.3. Action sur le lait écrémé

Les isolats sont ensemencés dans 5 ml de lait écrémé stérile et incubés à 30°C. Après 14 jours, les résultats de la coagulation et de la peptonisation (digestion totale) du lait, sont notés (Singleton, 1999).

7.3.5. Dégradation des pesticides

Après stérilisation du milieu de base complètement exempt de source de carbone (annexe 1), l'herbicide glyphosate et l'insecticide cypémetrine (avec une concentration de 500 mg /l chacun) filtrés à travers une membrane de 0,22 µm de porosité, ont été ajoutés (séparément) comme seule source de carbone. Les isolats ont été inoculés par stries sur les milieux. Toute croissance sur ces milieux témoigne de l'aptitude de production des enzymes qui dégradent ces pesticides (Hocinat et Boudemagh, 2016).

7.4. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne

7.4.1. Microorganismes-tests

Les souches d'actinobactéries isolées ont été testées pour la production de substances inhibitrices de certains microorganismes. Il s'agit de deux bactéries à coloration de Gram positive (*Staphylococcus aureus* ATCC (American Type Culture Collection) 25923 et *Bacillus subtilis* ATCC 6633), deux bactéries à coloration de Gram négative (*Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027), une levure (*Candida albicans* ATCC 10231) et une moisissure (*Aspergillus niger* CIP (Collection of Pasteur Institute) 1431). Les bactéries tests ont été obtenues auprès du laboratoire de bactériologie du C.H.U (Centre Hospitalo-Universitaire Benbadis) de Constantine. Les champignons proviennent du laboratoire de Génie Microbiologique et Applications de l'Université des Frères Mentouri Constantine.

7.4.2. Activité antibactérienne

Préparation des inocula de bactéries-tests

Pour chaque bactérie-test, une suspension est réalisée dans de l'eau physiologique stérile (0,9% NaCl), à partir de cultures pures de 24 heures sur le milieu Trypticase Soja Agar (TSA) (annexe 1). La solution 0,5 Mc Farland (annexe 2) est

utilisée comme référence pour ajuster la turbidité des suspensions bactériennes et ce en ajoutant de l'eau physiologique stérile, afin d'obtenir une concentration cellulaire finale de 10^6 cellules/ml sur le milieu Mueller-Hinton (Cavalla et Eberlin, 1994).

Technique des cylindres d'agar

Les isolats d'actinobactéries sont ensemencés par stries serrés croisés sur le milieu ISP2 et incubés à 30°C pendant 7 à 14 jours. A partir de ces cultures, des cylindres d'agar de 6 mm de diamètre, sont prélevés à l'aide d'un emporte-pièce. Ils sont ensuite placés à l'aide d'une pince stérile à la surface de la gélose de Mueller-Hinton (annexe 1) préalablement ensemencée par les bactéries-tests, en utilisant la technique de l'écouvillonnage, selon les recommandations du NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard) (Wagner, 2007).

Les boîtes de Pétri sont placées dans un réfrigérateur à 4°C pendant 4 heures, pour permettre la diffusion des substances bioactives (Barakate *et al.*, 2002). Puis incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés en millimètres.

7.4.3. Activité antifongique

A partir d'une culture pure de levure de 24 à 48 heures sur la gélose de Sabouraud (annexe 1), une suspension est réalisée et ajustée avec de l'eau physiologique stérile, afin d'obtenir une densité optique entre 0,14 et 0,16 à 623 nm (correspondant à 10^6 levures/ml) (Bastide *et al.*, 1986). A partir de cette suspension le milieu de Sabouraud est ensemencé par écouvillonnage.

Le champignon filamenteux est ensemencé sur la gélose de Sabouraud, et incubé pendant 7 jours à 28°C. Une suspension sporale est préparée en versant 10 ml d'eau distillée stérile dans la boîte contenant la culture fongique, et en raclant les spores de surface. La suspension ainsi obtenue est filtrée à travers un coton hydrophile stérile afin d'éliminer les mycéliums. Cette suspension est ensuite diluée avec de l'eau physiologique stérile et les spores sont dénombrées en utilisant la cellule de Thomas. A partir des dilutions, un volume correspondant à 10^5 spores/ml est ensemencé en masse dans la gélose de Sabouraud (Lemriss *et al.*, 2003).

L'activité antifongique des actinobactéries est mise en évidence par la technique des cylindres d'agar. La mesure des diamètres d'inhibition est notée après 24 heures

d'incubation à 28°C concernant la levure et après 48 heures concernant le champignon filamenteux.

8. Clonage et séquençage de l'ADNr 16S (approche métagénomique)

8.1. Extraction d'ADN génomique environnemental

Les sols congelés ont été décongelés à 4°C et tamisés à l'aide d'un tamis de 2 mm de diamètre après avoir mélangé 3 répliques (X1, X2, X3) de sols prélevés de la zone la plus herbacée de chaque site. L'extraction d'ADN génomique est réalisée selon deux méthodes :

8.1.1. Méthode de Griffiths *et al.*, (2000)

L'ADN a été extrait selon le protocole de Griffiths *et al.*, (2000), à partir de 0,5 g (poids humide) du sol, en utilisant des tubes Lysing Matrix E (contenant des sphères en céramique de 1,4 mm, des sphères en silice de 0,1 mm et une perle de verre de 4 mm, MP Biomedicals). Les extractions ont été effectuées à pH 8 par addition de 0,5 ml de tampon d'extraction au CTAB (bromure d'héxadecyl tri-méthyl ammonium) et 0,5 ml de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1). Le tampon d'extraction CTAB, modifié à partir de la méthode de Kowalchuk *et al.*, (1998), a été préparé en mélangeant des volumes égaux de CTAB à 10% (p/v) dans du NaCl 0,7 M avec du tampon phosphate de potassium 240 mM, pH 8,0. Les échantillons ont été lysés dans un « bead beater » pendant 1 min, trois fois à une vitesse de 5,5 m/s, et les acides nucléiques contenant la phase aqueuse ont été séparés par centrifugation (16000 g) pendant 5 min à 4 °C. La phase aqueuse a ensuite été extraite et le phénol a été éliminé par mélange avec un volume égal de chloroforme-alcool isoamylique (24:1), suivi d'une autre centrifugation (16 000 g) pendant 5 minutes à 4 °C. L'ADN total a ensuite été précipité à partir de la couche aqueuse extraite avec 2 volumes de polyéthylène glycol 6000-1,6M de NaCl à 30% (p/v) pendant 2h à température ambiante, suivi d'une centrifugation (18 000 g) à 4 °C pendant 10 min. Les ADN agglomérés ont ensuite été lavés dans de l'éthanol glacé à 70% (v/v) et séchés à l'air avant la remise en suspension dans 50 ml de tampon Tris-EDTA sans RNase et sans DNase (pH 7,4).

8.1.2. Méthode au Kit FastDNA™ SPIN Kit for soil

L'extraction d'ADN génomique est réalisée à partir de 0,5 g de sol en utilisant le Kit FastDNA™ SPIN Kit for soil (MP Biomedicals, Santa Ana, CA), selon les

recommandations du fabricant. L'ADN a été re-suspendu dans 50 µl de la solution d'élution fournie par le Kit.

L'ADN extrait est purifié en utilisant le Kit illustra Microspin™ S-400 HR Columns 27-5140-01 (GH Healthcare, UK Limited) : 50 µl d'ADN élué sont déposés sur les colonnes de purification. A la fin 50 µL d'ADN purifié sont récupérés, selon les recommandations du fabricant.

8.2. Amplification des séquences des gènes ADNr 16S

Afin de cibler les actinobactéries, l'amplification par PCR des gènes ADNr 16S est réalisée avec le couple d'amorces **Act 1159R** (TCCGAGTTRACCCCGGC) (spécifique des actinobactéries)/**Eub 338F**(ACGGGCGGTGTGTACA) (spécifique des eubactéries) (Blackwood *et al.*, 2005), pour une taille d'amplicon de 820 pb, et le couple d'amorces **S-C-Act-235-a-S-20 F** (CGCGGCCTATCAGCTTGTTG) et **S-C-Act-878-a-A-19 R** (CCGTACTCCCCAGGCGGGG) spécifique des actinobactéries (Stach *et al.*, 2003), pour une taille d'amplicon de 643 pb.

Cette amplification est effectuée dans un volume final de 25 µl (24 µl du mélange réactionnel plus 1µl d'ADN extrait purifié). La composition du mélange réactionnel et les programmes de PCR de chaque couple d'amorces sont indiqués dans les tableaux 8, 9 et 10.

Tableau 8 : Composition du mélange réactionnel (pour une réaction PCR).

Composés	Volume en µl par tube
Eau pure stérile (Sigma Life Science)	18,85
Tampon 10X contenant 15mM MgCl ₂ (Roche)	2,5
T4gp32 Bulk 500 µg/µl (MP Biomedicals)	1
dNTP 10 mM (Thermo Fisher Scientific)	0,5
Amorce F 10µM (Eurofins Genomics)	0,5
Amorce R 10µM (Eurofins Genomics)	0,5
AmpliTaq ADN polymérase 5U/µl (Roche)	0,15
ADN extrait purifié	1

Tableau 9 : Programme de PCR du couple d'amorces Act 1159R/Eub 338F.

	Etapes	Température (°C)	Temps
	Dénaturation initiale	95	3 min
35 cycles	Dénaturation	94	30 s
	Hybridation	68	1 min
	Elongation	72	1 min
	Elongation finale	72	10 min

Tableau 10 : Programme de PCR du couple d'amorces S-C-Act-878-a-A-19/ S-C-Act-235-a-S-20 selon le protocole « Touchdown » (Roux, 1995).

	Etapes	Température (°C)	Temps
	Dénaturation initiale	95	4min
10 cycles (la température d'hybridation diminue de 0,5°C/cycle par rapport au précédent)	Dénaturation	95	45s
	Hybridation	72	45s
	Elongation	72	1min
20 cycles	Dénaturation	95	45s
	Hybridation	68	45s
	Elongation	72	1min
	Elongation finale	72	5min

Dans le tableau 10, il est à noter que nous avons augmenté le nombre de cycles à 20 par rapport à Stach *et al.*, (2003) qui ont utilisé 15 cycles dans la deuxième étape de la dénaturation, de l'hybridation et de l'élongation.

Le clonage nécessite de grands volumes de produits PCR. Par conséquent, une fois le choix des amorces fait, l'amplification des ADN extraits et purifiés, est réalisée en duplicata pour chaque échantillon dans un volume final de 50 µl (48 µl du mélange réactionnel plus 2 µl d'ADN) pour chaque PCR. Les composés du mélange réactionnel sont les mêmes que ceux du tableau 8 sauf que les quantités sont doublées. Le programme de PCR est le même que celui du tableau 10. Les produits PCR des deux PCR d'un même échantillon sont mélangés pour avoir un volume de 100 µl.

8.3. Purification des amplicons des actinobactéries

Les amplicons mélangés de chaque échantillon sont purifiés sur les colonnes du Kit GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich, Inc), selon les consignes du fabricant. Ils sont maintenant prêts pour le clonage.

8.4. Méthodes de clonage TA

La méthode de clonage TA tire parti de l'activité terminale transférase de certaines ADN polymérases telles que la Taq polymérase. Cette enzyme ajoute un seul nucléotide unique dA à l'extrémité débordante 3' à chaque extrémité du produit de PCR. Ceci permet de cloner ce produit de PCR directement dans un vecteur de clonage linéarisé avec des extrémités débordantes 3'-dT uniques. Dans la présente étude, deux méthodes de clonage TA ont été effectuées :

8.4.1. Méthode au pGEM-T et pGEM-T Easy Vector (Promega)

Les systèmes pGEM-T et pGEM-T Easy Vector sont des systèmes pratiques pour le clonage des produits PCR. Les vecteurs sont préparés en coupant les vecteurs pGEM avec l'enzyme de restriction EcoR V et ajout d'une dT aux deux extrémités 3'. Ces extrémités débordantes uniques 3'-dT améliorent l'efficacité de la ligation d'un produit de PCR dans les plasmides. Ceci en empêchant la recircularisation du vecteur, en fournissant une extrémité débordante compatible pour les produits de PCR générées par certaines polymérase thermostables, qui ajoutent souvent une seule désoxyadénosine à l'extrémité 3'.

Le clonage est réalisé à l'aide du kit (pGEM®-T et pGEM®-T Easy Vector Systems, Promega, USA) selon les recommandations du fabricant, et selon les étapes suivantes et ce, avec de légères modifications au niveau des quantités des produits de la ligation qui ont été divisées par deux.

8.4.1.1. Ligation

Pour un volume final de 5µl, 4µl des réactifs suivants : 2,5 µl du tampon de ligation rapide (2X) (annexe 2), 0,5 µl du vecteur pGEM®-T (50 ng/µl) (annexe 3), 0,5 µl de BSA (albumine de sérum bovin) (10X), 0,5 µl de T4 ADN ligase sont mélangés pour constituer un pré-mix pour un seul échantillon. Ensuite 1 µl de produit PCR purifié est rajouté. Cette réaction de ligation est incubée pendant une heure à température ambiante.

8.4.1.2. Transformation d'*Escherichia coli* JM109 par choc thermique

Le mix de ligation est introduit dans les cellules chimio-compétentes d'*Escherichia coli* (JM109 High Efficiency, promega, USA) par choc thermique. 2 µl du mix de ligation sont rajoutés à 25 µl de cellules compétentes. Ces derniers sont incubés sur glace pendant 20 min, avant de subir un choc thermique dans un bain marie à 42°C pendant 50s, ce qui va permettre au vecteur de pénétrer dans la cellule. Les cellules compétentes sont ensuite remises sur glace pendant 2 min, pour permettre aux pores de ces mêmes cellules de se refermer et d'emprisonner le vecteur à l'intérieur. Le milieu de culture liquide LB (Luria Bertani) maintenu à 37°C, est par la suite ajouté aux cellules, à raison de 800µl par réaction de clonage. Les cellules sont alors incubées sous agitation à 37°C pendant une heure. 70µl sont alors étalés sur des boîtes de Pétri contenant le milieu LB additionné de 100 mg/l d'ampicilline, 40 mg/l d'IPTG (Isopropyl

β -D-1-ThioGalactopyranoside) et 50 mg/l de X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside). Les boîtes sont ensuite incubées toute la nuit à 37°C.

8.4.1.3. Amplification par PCR et séquençage des inserts

A partir de chaque échantillon, les cellules de toutes les colonies blanches (clones positifs contenant l'insert) sont suspendues dans 50 μ l d'eau stérile et lysées à 700 w pendant 1 min au micro-onde. Les ADN issus de cette lyse sont amplifiés par PCR en utilisant des amorces spécifiques au vecteur SP6 (ATTTAGGTGACACTATAG) et T7 (TAATACGACTCACTATAGGG), dans un volume final de 50 μ l (45 μ l du mélange réactionnel plus 5 μ l d'ADN matrice). La composition du mélange réactionnel et le programme de PCR sont indiqués dans les tableaux suivants 11 et 12.

Tableau 11 : Composition du mélange réactionnel (pour une réaction PCR).

Composés	Volume (μ l) pour un tube
Eau pure stérile (Sigma Life Science)	35,35
Tampon 10X contenant 15 mM MgCl ₂ (Roche)	5
dNTP 2,5 mM (Roche)	4
Amorces SP6 10 μ M (Thermo Fisher Scientific)	0,2
Amorce T7 10 μ M (Thermo Fisher Scientific)	0,2
AmpliTaq ADN polymérase 5U/ μ l (Roche)	0,25
ADN recombinant	5

Tableau 12: Programme de PCR.

	Etapas	Température (°C)	Temps
	Dénaturation initiale	94	5 min
35 cycles	Dénaturation	94	15 s
	Hybridation	55	30 s
	Elongation	72	1 min
	Elongation finale	72	7 min

Les produits PCR sont visualisés sur gel d'agarose à 1%, pour s'assurer de la présence des inserts de la taille appropriée (800 pb).

8.4.2. Méthode au TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Life Technologies)

Le vecteur TOPO TA linéarisé, pCR2.1-TOPO, est spécialement conçu pour le clonage de produit de PCR avec un seul nucléotide unique dA de chaque extrémité débordante 3' directement dans un vecteur de clonage linéarisé avec des extrémités débordantes 3'-dT uniques. Cela permet l'appariement de bases des résidus A et T entre

le vecteur et les produits de PCR. La ligature du produit de PCR au vecteur est réalisée par l'enzyme Topoisomérase I (isolée du virus de la vaccine).

Le clonage est réalisé à l'aide du TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing (Life Technologies, © 2014 Thermo Fisher Scientific Inc) selon les recommandations du fabricant et selon les étapes suivantes :

8.4.2.1. Ligation

Quatre microlitres des produits PCR purifiés sont mélangés à 1 µl de sels (200 mM NaCl, 10 mM MgCl₂) et à 1 µl du vecteur pCR® 4Blunt-TOPO® (10 ng/µl) (annexe 3). Le tout est incubé pendant 5 min à température ambiante, ensuite placé sur glace.

8.4.2.2. Transformation d'*Escherichia coli* DH5α par électroporation

Le mix de ligation est introduit dans les cellules compétentes d'*Escherichia coli* (One Shot® DH5α™-T1^R) par électroporation (choc électrique) : 6 µl de réaction de ligation sont dilués avec 18 µl d'eau, dans le but de diminuer la concentration de sels et d'éviter un arc électrique. 2 µl de cette dilution sont mélangés à 40 µl de bactéries compétentes et transférés dans une cuvette de 2 mm, qui est ensuite placée dans un électroporateur de type (Gene Pulser Xcell™ System, Biorad, USA). Sous l'influence du champ électrique de cet appareil (voltage : 2500 V, capacitance : 25 µF et résistance : 200 Ω, temps 4-5 ms), les membranes cytoplasmiques des bactéries deviennent perméables et, permettent l'entrée du matériel plasmidique (vecteur). 250 µl du milieu de culture liquide S.O.C (Super Optimal broth with Catabolite repression) (annexe 1) sont rajoutés, puis le tout est transféré dans un tube de 15 ml et incubé sous agitation pendant 1 h à 37°C.

Le vecteur de clonage pUC 19 a été transféré dans une cellule compétente en tant que témoin positif pour confirmer l'efficacité de la transformation.

Les cellules transformées ont été cultivées sur la gélose LB (annexe 1) additionnée de 50 µg/ml d'ampicilline et incubées pendant une nuit à 37°C, pour permettre l'expression des gènes de résistance aux antibiotiques.

A partir de chaque échantillon, tous les clones sont sélectionnés et conservés à 4°C.

8.4.2.3. Amplification par PCR et séquençage des inserts

Les cellules de tous les clones ont été suspendues dans 100 µl d'eau stérile qui vont servir d'ADN matrice pour la PCR. Cette dernière est effectuée dans le but de vérifier si les clones contiennent les inserts de la taille appropriée (743 pb). La PCR est

réalisée en utilisant des amorces spécifiques au vecteur T7 (TAATACGACTCACTATAGGG) et T3 (ATTAACCCTCACTAAAGGGA) dans un volume final de 40 μ l (38 μ l du mélange réactionnel plus 2 μ l d'ADN matrice). La composition du mélange réactionnel et le programme de PCR sont indiqués dans les tableaux suivants 13 et 14.

Tableau 13 : Composition du mélange réactionnel (pour une réaction PCR).

Composés	Volume (μ l) pour un tube
Eau pure stérile (Sigma Life Science)	31,34
Tampon 10X contenant 15 mM MgCl ₂ (Roche)	4
dNTP 2,5mM (Roche)	0,80
Amorce T3 10 μ M (Thermo Fisher Scientific)	0,24
Amorce T7 10 μ M (Thermo Fisher Scientific)	0,8
AmpliTaq ADN polymérase 5U/ μ l (Roche)	0,8
ADN recombinant	2

Tableau 14 : Programme de PCR.

	Etapes	Température (°C)	Temps
30 cycles	Dénaturation initiale	94	10 min
	Dénaturation	94	15 s
	Hybridation	55	15 s
	Elongation	72	30 s
	Elongation finale	72	10 min

Les produits PCR sont révélés par un système d'électrophorèse E-Gel[®] (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). 20 μ l de chaque produit PCR et du marqueur de poids moléculaire, sont chargés dans les puits d'une plaque « e-gel 96 agarose 2% », puis placés dans un système d'alimentation électrique iBase[™] afin de permettre la migration en 12 min. Le gel est examiné sous une lumière ultraviolette et photographié. La photo est traitée par le logiciel E. Editor 2.0.

Les produits PCR contenant les recombinants de la taille désirée sont purifiés et séquencés comme il a été décrit précédemment dans le paragraphe 6.5. Les séquences sont analysées selon les méthodes détaillées précédemment dans le paragraphe 6.6. Les séquences des amorces spécifiques du vecteur sont éliminées, avant de vérifier la présence de séquences chimériques par l'outil en ligne DECIPHER-find Chimeras (Wright *et al.*, 2012), laissant ainsi des séquences d'environ 640 pb pour l'étude phylogénétique.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Analyses physicochimiques des échantillons de sol

Les valeurs moyennes des caractéristiques physicochimiques des échantillons de sol de la sebkha d'Ezzemoul, de Chott Tinsilt et de la sebkha de Djendli sont rassemblées dans le tableau 15. Les valeurs détaillées de ces dernières sont indiquées dans les tableaux de l'annexe 4.

Tableau 15 : Propriétés physicochimiques des échantillons de sol.

Sites d'étude	pH	CE (dS/m)	Salinité (méq/100g)	H	Quantité en % de			
					M.O	Sable	Limon	Argile
Sebkha d'Ezzemoul	8,56	16,26	81,27	6,01	6,07	52,76	22,39	24,85
Chott Tinsilt	8,57	15,46	77,34	3,58	8,62	40,02	28,41	31,57
Sebkha de Djendli	8,03	11,57	57,88	6,16	5,82	30,97	32,7	36,33

CE : conductivité électrique ; H : humidité ; M.O : matière organique

En fonction de l'échelle d'interprétation du pH signalée par Gagnard *et al.* (1988) (tableau 16), nos sols sont alcalins (pH entre 8,03 et 8,57). Ces valeurs se rapprochent de celles de Chenchouni (2009) pour le site Djendli et de celles de Djaballah (2010) pour le site Ezzemoul. Elles sont un peu plus élevées que celles de Aliat *et al.* (2016) qui ont mesuré un pH de 7,2 pour les sites Ezzemoul et Tinsilt.

Tableau 16 : Echelle d'interprétation du pH.

pH	<5,5	5,5-6,5	6,5-6,8	6,8-7,2	7,2-7,5	7,5-8,5	> 8,5
Appréciation	Fortement acide	Acide	Très légèrement acide	Voisin de la neutralité	Légèrement alcalin	alcalin	Fortement alcalin

En se référant à l'échelle de salinité qui est en relation directe avec la conductivité électrique (CE) de Richards (1954) (tableau 17), les sols des trois sites sont extrêmement salés. Le phénomène de salinisation est dû principalement à la rareté de la pluie qui sert à transporter les sels, mais aussi aux taux élevés de l'évaporation qui sont caractéristiques des régions à climat aride et semi-aride. Nos résultats concordent avec ceux rapportés par (Aliat *et al.*, 2016 ; Djaballah, 2010 ; Chenchouni, 2009).

Tableau 17 : Type de sol en fonction de la salinité et de la conductivité électrique.

Types de sol	Non salé	Peu salé	salé	Très salé	Extrêmement salé
CE (dS/m)	< 0,6	0,6 - 1,2	1,2 - 2,4	2,4 - 6	> 6
Salinité en (méq/100g de sol)	< 3	3 - 6	6 - 12	12 - 30	> 30

Selon la classification de Lee et Hwang, (2002) (tableau 18), nos sols sont caractérisés par un faible taux d’humidité compris entre 3,58 et 6,16 %. Les sols des sebkas d’Ezzemoul et de Djendli ont des taux faibles de matière organique (6,03% et 5,82%) respectivement, contrairement à celui de chott Tinsilt qui est modéré (8,62%).

Tableau 18: Classification des sols selon le pourcentage d’humidité et de matière organique (Lee et Hwang, 2002).

Humidité (%)	2 - 9	9,1 - 13	13,1 - 20
Matière organique (%)	4 - 7	7,1 - 9	9,1 - 11
Appréciation	Faible	Modéré	élevé

D’après le triangle des textures minérales d’ Eswaran *et al.* (2002) (annexe 5), la texture des sols de la sebkha d’Ezzemoul et de la sebkha de Djendli est de type limoneux–argileux-sableux, alors que celle de chott Tinsilt est de type limoneux-argileux.

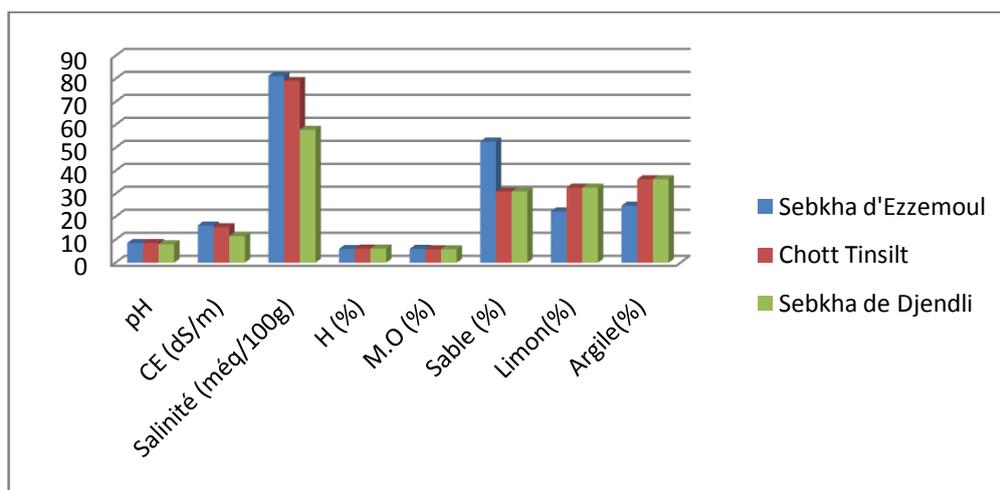


Figure13 : Propriétés physicochimiques des échantillons de sol.

D’une manière générale, les trois sites d’étude se caractérisent par des propriétés physicochimiques presque similaires (figure 13). Ces dernières peuvent agir comme des facteurs potentiels influençant le nombre, la croissance et la composition de la communauté des actinobactéries dans les sols étudiés.

2. Isolement et dénombrement

Le but principal de ce travail, est d'étudier la biodiversité des actinobactéries halophiles et halotolérantes (faibles, modérées et extrêmes), dans la sebkha d'Ezzemoul, le chott Tinsilt et la sebkha de Djendli. Les actinobactéries halophiles sont largement distribuées dans les milieux salins, hypersalins terrestres et aquatiques. L'isolement de celles-ci ne nécessite pas de techniques d'enrichissement particulières, il suffirait d'ajouter du sel au milieu d'isolement (Kanekar *et al.* 2012).

Afin d'élaborer un protocole adéquat pour l'isolement des actinobactéries halophiles, nous avons testé au départ, uniquement les échantillons de sol du site Ezzemoul, en utilisant en premier lieu, trois milieux de culture spécifiques à ces bactéries (Glucose-Asparagine, Olson et ISP5), auxquels nous avons rajouté la concentration la plus faible de 2% de NaCl (qui cible les halophiles faibles). En deuxième lieu, nous avons traité thermiquement (à 50 °C pendant 60 min) et chimiquement (par le CaCO₃), les mêmes échantillons du site Ezzemoul, avant de faire l'isolement sur le milieu ISP5 additionné de 2 % de NaCl. Tous les milieux utilisés ont été supplémentés d'antibiotiques et le dénombrement de la flore totale a été réalisé. Les résultats sont mentionnés dans les tableaux 19 et 20.

Tableau 19 : Dénombrement de la flore totale sur trois milieux contenant 2 % de NaCl, à partir des sols d'Ezzemoul sans prétraitement.

Echantillons	Actinobactéries ×10 ⁴ en UFC/g			Autres bactéries ×10 ⁵ en UFC/g			Champignons ×10 ⁵ en UFC/g		
	G-A	Olson	ISP5	G-A	Olson	ISP5	G-A	Olson	ISP5
EE ₁	0	2,85	2,7	0,07	2,02	12,7	16	0	38
EE ₂	0	51	8,6	0,02	12,3	5,06	0,06	7	5,5
EE ₃	0	0	0	0,055	182	7,47	3,07	0,01	1,05

G-A : Glucose-Asparagine

Le tableau 19 montre que, le milieu Glucose-Asparagine n'a permis d'isoler aucune actinobactérie, à partir des trois échantillons de la sebkha d'Ezzemoul. Au contraire, les deux milieux ISP5 et Olson ont permis l'isolement de ces bactéries, à partir des deux échantillons EE₁ et EE₂. Le plus grand nombre de ces dernières est observé sur le milieu Olson (de 2,85 à 51 UFC/g). Djaballah, (2010) a rapporté également, un bon résultat d'isolement d'actinomycètes (à partir du site Ezzemoul) sur le milieu ISP5 additionné de 15% de NaCl, mais le résultat était négatif sur le milieu Olson supplémenté de 12% de NaCl.

Les milieux Olson et ISP5 contiennent certains composants en commun: le glycérol (source de carbone), l'asparagine (source d'azote) et le K_2HPO_4 (source de potassium et de phosphore). Le milieu Olson contient en plus le sodium caséinate et le sodium propionate. Ce dernier agit comme un antifongique, ce qui est confirmé par nos résultats (tableau 19), qui prouvent que le nombre de champignons sur le milieu Olson (de 0 à 7×10^5 UFC/g) est beaucoup plus faible par rapport à celui obtenu sur les autres milieux. Tous ces composants favorisent donc, la croissance des actinobactéries.

Tableau 20 : Dénombrement de la flore totale sur le milieu ISP5 contenant 2 % de NaCl, après prétraitements thermique et chimique des sols d'Ezzemoul.

Echantillons	Actinobactéries $\times 10^4$ en UFC/g		Autres bactéries $\times 10^5$ en UFC/g		Champignons $\times 10^3$ en UFC/g	
	PT	PC	PT	PC	PT	PC
EE ₁	0	0	4,43	9	0	0
EE ₂	0	1,95	Ind	8,27	5,5	0
EE ₃	0	0	Ind	5,48	1	0

PT : Prétraitement thermique, PC : Prétraitement chimique, Ind : indécombrable

D'habitude, les prétraitements (thermique et chimique) des échantillons de sol, ont pour but de favoriser la croissance des actinomycètes par rapport aux autres bactéries et aux champignons (Shearer 1997). Dans le même sens, Djaballah, (2010) a prouvé l'efficacité du traitement par le $CaCO_3$, qui augmente le nombre des actinomycètes et qui diminue le nombre des autres microorganismes. La même conclusion peut être tirée lors de notre étude. Au fait nous avons remarqué que le traitement thermique a permis de diminuer le nombre des champignons et le $CaCO_3$ les a éliminés complètement sur le milieu ISP5. Le traitement au $CaCO_3$ a également diminué le nombre des autres bactéries surtout concernant les échantillons EE₁ et EE₃ (tableaux 19 et 20). Cependant, en ce qui concerne l'isolement des actinobactéries, ces prétraitements n'ont pas été très efficaces. En effet, aucune actinobactérie n'a pu être isolée, après prétraitement thermique, et très peu ($1,95 \times 10^4$ UFC/g) ont été obtenues de l'échantillon EE₂, après prétraitement chimique (tableau 20).

En se basant sur les résultats ci-dessus, nous avons donc, décidé de poursuivre le travail avec le milieu ISP5, sans prétraitement des échantillons de sol, des trois sites d'études. Le milieu ISP5 a été additionné de 2, (5, 10) et 15% d'NaCl afin de cibler les actinobactéries faibles, modérées et extrêmes, respectivement. Le milieu ISP5 modifié par 2% de NaCl a été utilisé, uniquement pour l'isolement des actinobactéries à partir

des sites Tinsilt et Djendli (vue que nous avons déjà les résultats du site Ezzemoul à cette même concentration de sel). En plus des actinobactéries nous avons dénombré les autres bactéries et les champignons. Les résultats détaillés des trois échantillons de sol des trois sites sont consignés en annexe 9. Leurs valeurs moyennes sont indiquées dans le tableau 21.

Tableau 21 : Dénombrement des actinobactéries et des autres microorganismes, isolés des trois sites, en fonction des concentrations de NaCl additionnées au milieu ISP5.

Sites d'étude	ISP5 additionné de NaCl en %	Actinobactéries $\times 10^4$ en UFC/g	Autres bactéries $\times 10^5$ en UFC/g	Champignons $\times 10^5$ en UFC/g
Sebkha d'Ezzemoul	2	3,77 (16)	8,42	14,9
	5	1,75 (4)	12,4	43,4
	10	2,25 (20)	0,89	0,56
	15	0	0,17	0
Chott Tinsilt	2	62 (9)	652	0,23
	5	81,9 (20)	2,13	39,5
	10	107 (11)	2,94	1,24
	15	0,5 (2)	0,16	0,61
Sebkha de Djendli	2	34,7 (11)	301	1,75
	5	24,4 (11)	194	40,2
	10	3,33 (0)	0,3	4,97
	15	0	0,56	1,39

Les valeurs entre parenthèses représentent le nombre de colonies purifiées et conservées

Les valeurs moyennes du nombre d'actinobactéries qui se sont développées sur le milieu de culture ISP5 contenant différentes concentrations de sel (tableau 21), varient de $(0,5 \text{ à } 107 \times 10^4)$ (UFC/g) dans le site Tinsilt, et sont plus élevées que celles des sites Djendli et Ezzemoul qui varient de $(0 \text{ à } 34,7 \times 10^4)$ et de $(0 \text{ à } 3,77 \times 10^4)$ (UFC/g), respectivement. Les nombres totaux de colonies qui ont pu être purifiées et conservées, pour cette étude, sont de : 42 dans le site Tinsilt, 40 dans le site Ezzemoul et 22 dans le site Djendli (tableaux 21 et 22). Nos résultats sont plus élevés que ceux trouvés par (Okoro *et al.*, 2009) dans les sols salés du Chili. La majorité des actinobactéries ont été isolées à partir des échantillons E₁ et E₂ (tableaux 19 et 22). A la concentration de 15% de NaCl aucune colonie n'a été dénombrée des sites Ezzemoul et Djendli et seulement deux colonies du site Tinsilt ont été comptées. La plupart des actinobactéries ont été observées aux concentrations allant de 2 à 10 %. On peut donc conclure que les bactéries de cette étude, sont soit des halophiles soit des halotolérantes faibles et modérées.

Les isolats sont représentés par des codes alphanumériques (tableau 22). La première lettre indique l'initial du nom de chaque site, E pour Ezzemoul, T pour Tinsilt et D pour Djendli. La deuxième lettre indique la concentration de sel, (O, J, K : 2 %), (C, G, H : 5%), (D, F : 10 %). La lettre (S) représente 5% de sel dans le site Ezzemoul et 15% dans le site Tinsilt.

Dans cette étude, en plus du sel, nous avons rajouté des antibiotiques à tous les milieux de culture utilisés, afin de favoriser la croissance des actinobactéries. Cependant, nous avons obtenue un taux considérable de champignons (tableaux de 19 à 21), cela pourrait s'expliquer par le fait que la nystatine n'est pas un antifongique a large spectre, de plus il se pourrait que ces champignons résistent à cet antibiotique. L'addition de la polymyxine permet de réduire le nombre de bactéries à Gram négatif mais pas celui des Gram positives, d'où leur observation dans les tableaux de 19 à 21.

Tableau 22 : Isolats d'actinobactéries purifiés et conservés, par échantillon et par concentration de NaCl additionnée à ISP5.

Sites d'étude	Echantillons	Nombre de colonies des actinobactéries isolées				Total des isolats	
		NaCl en %					
		2	5	10	15		
Sebkha d'Ezzemoul	EE ₁	EO1, EO3, EO4, EO5, EO6, EO8, EO9, EO10, EO12, EO14, EO15, EO16, EO17, EO18	EC13, EC15, ES42	ED1, ED2, ED6, ED8, ED10, ED14, ED15, ED23, ED28, ED29, ED30, ED39, ED40, ED41, ED42, ED43, ED44, ED46, ED32, ED35	-	40	
		EE ₂	EO19, EO20	ES72	-	-	
		EE ₃	-	-	-	-	

Tableau 22 : Isolats d'actinobactéries purifiés et conservés, par échantillon et par concentration de NaCl additionnée à ISP5 (suite).

Sites d'étude	Echantillons	Nombre de colonies des actinobactéries isolées				Total des isolats
		NaCl en %				
		2	5	10	15	
Chott Tinsilt	TE ₁	TJ1, TJ3, TJ12, TJ13, TJ15, TJ21, TJ27, TJ30, TJ4	TG12, TG13, TG18, TG19, TG20, TG24, TG26, TG27, TG29, TG30, TG33	TF2, TF3, TF5, TF6, TF18, TF19, TF21, TF292	-	42
	TE ₂	-	TG1, TG201, TG3, TG5, TG61, TG72, TG92, TG10, TG22	TF11, TF12, TF16	-	
	TE ₃	-	-	-	TS2, TS31	
Sebkha de Djendli	DE ₁	DK2, DK7, DK11, DK12, DK13, DK14, DK15, DK16, DK17, DK21, DK23	DH3, DH4, DH7, DH10, DH12, DH13, DH14, DH20, DH21, DH24	-	-	22
	DE ₂	-	-	-	-	
	DE ₃	-	DH18	-	-	

3. Analyse de la diversité phylogénétique des isolats d'actinobactéries

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à la diversité de la communauté d'actinobactéries isolées par des techniques microbiologiques classiques dans les sols de sebkhas, en se basant sur le séquençage de l'ADNr 16S des isolats.

Nous avons essayé d'optimiser un protocole d'extraction d'ADN génomique en testant deux méthodes, sur quatre souches d'actinobactéries. La première méthode (lyse cellulaire chimique alcaline) de Maniatis *et al.*, (1992), a donné un résultat négatif sur les quatre souches. Cependant, la deuxième méthode d'extraction (lyse cellulaire par choc thermique) de Queipo-Ortuño *et al.* (2008), a donné un résultat positif sur les $\frac{3}{4}$ des souches, et c'est à partir de là que nous avons opté pour généraliser cette méthode sur le reste des souches. Parmi les méthodes d'extraction d'ADN bactérien les plus utilisées, la méthode qu'on a appliquée est la plus simple. Elle suffit et convient pour

l'extraction d'ADN des cellules à partir de cultures pures, mais elle n'élimine pas les composés inhibiteurs des réactions d'amplification tels que les acides humiques qui se trouvent dans les sols ; par conséquent cette méthode ne peut pas être appliquée pour ce genre d'échantillon.

Après extraction des ADN génomiques à partir de 104 isolats, l'amplification de leurs ADNr 16S est effectuée en utilisant les amorces universelles : la 27F (position 8-27) et la 1492R (position 1492-1513) (Lane 1991). Les photos des gels qui montrent l'amplification des ADNr 16S de quelques isolats, sont représentées dans l'annexe 6. Des fragments d'environ 1500 pb ont été obtenus et séquencés. Les chromatogrammes bruts obtenus ont été traités par le logiciel chromas Pro et les séquences consensus ont été confrontées à celles disponibles au niveau des banques de données GenBank et EzBioCloud. Toutes les séquences ont été alignées par le logiciel CLUSTALX. Les résultats de l'alignement multiple par ce logiciel, ont montrés que les séquences (du gène codant pour l'ARNr 16S) n'ont pas la même longueur, ce qui a nécessité des corrections manuelles avant leur utilisation par le logiciel MEGA, qui utilise l'algorithme d'alignement multiple progressif CLUSTALW. Il a été démontré que la qualité de l'alignement pouvait avoir un impact sur l'arbre final, aussi important, voire plus, que la méthode de construction employée (Ebihara *et al.* 2006). La préparation d'un alignement de qualité est donc une étape critique de toute analyse phylogénétique. La construction des arbres phylogénétiques a été réalisée par le programme MEGA 6. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'identité de la souche à identifier avec les espèces-types les plus proches dans les banques de données (tableaux 23, 24 et 25), et sous forme d'arbres phylogénétiques (figures de 14 à 20) qui évaluent et montrent la position taxonomique de chaque isolat.

3.1. Diversité phylogénétique des isolats de la sebkha d'Ezzemoul

Les gènes de l'ADNr 16S de 40 isolats d'actinobactéries, issus de la sebkha d'Ezzemoul, ont été séquencés et déposés à Genbank avec les numéros d'accession MG597500 à MG597539. L'analyse de ces dernières (figure 14, tableau 23) a révélé la présence de trois genres : *Nocardiopsis* (Meyer 1976) *Streptomyces* (Skerman *et al.* 1980) et *Rhodococcus* (Zopf 1891). Ces derniers appartiennent aux familles : *Nocardiopsaceae*, *Streptomycetaceae* et *Nocardiaceae* ; et aux ordres : *Streptosporangiales*, *Streptomycetales* et *Corynebacteriales*, respectivement.

Le genre *Nocardioopsis* (tableau 23, figure 14 et figure 14 (a)) domine avec 95% des isolats, répartis sur quatre espèces différentes. Presque la moitié des isolats est affiliée à l'espèce *N. dassonvillei* avec des pourcentages d'identité de 98,38 à 99,93%, suivie de 35% à *N. lucentensis* avec 99,35 à 100% d'identité, 10% à *N. aegyptica* avec 99,07 à 99,57% d'identité et 2,5% (1 isolat) à *N. synnemataformans* (avec 100% d'identité).

Les 19 isolats affiliés à *N. dassonvillei* semblent très proches entre eux, de même pour ceux affiliés à *N. lucentensis* (14). Ceux affiliés à *N. aegyptica* (4) semblent représenter la même souche avec une valeur de bootstrap très élevée (98%). En effet, plus le pourcentage de bootstrap de deux souches est élevé, plus la probabilité qu'elles appartiennent à la même espèce est élevée. Statistiquement, un nœud solide est défini par une valeur d'au moins 95 % de bootstrap. En pratique, ce seuil a été considéré comme sévère, ainsi Hillis et Bull, (1993) ont démontré qu'une valeur de bootstrap d'au moins 70% correspondait à une probabilité très élevée, que le clade correspondant soit exact.

Le pourcentage d'identité 98,38% de l'isolat ED43 avec l'espèce *N. dassonvillei* est inférieur au seuil 98,7% séparant les nouvelles espèces de Stackebrandt et Ebers, (2006). Ainsi, cet isolat pourrait représenter un nouveau taxon du genre *Nocardioopsis*.

Tableau 23 : Identification taxonomique des isolats de la sebkha d'Ezzemoul.

Code des isolats	Numéros d'accession	Taille en (pb)	Espèce type la plus proche	Numéros d'accession	Identité (%)
ED2	MG597500	1389	<i>Nocardioopsis dassonvillei</i> subsp. <i>dassonvillei</i> DSM 43111(T)	ABUI01000017	99,93
ED28	MG597501	1399			99,86
ED46	MG597502	1400			99,78
ED40	MG597503	1398			99,79
ED8	MG597504	1396			99,71
ED35	MG597505	1398			99,64
ED42	MG597506	1367			98,38
ED41	MG597507	1396			
ED39	MG597508	1397			
ED10	MG597509	1380			
ED6	MG597510	1370			
ED29	MG597511	1399			
ED32	MG597512	1402			
ED1	MG597513	1402			
ED14	MG597514	1387			
ED44	MG597515	1377			
ED15	MG597516	1404			
ED30	MG597517	1390			
ED43	MG597518	1436			

Tableau 23 : Identification taxonomique des isolats de la sebkhia d'Ezzemoul (suite).

Code des isolats	Numéros d'accession	Taille en (pb)	Espèce type la plus proche	Numéros d'accession	Identité (%)	
ED23	MG597519	1402	<i>Nocardiosis synnemataformans</i> DSM 44143(T)	ANAW01000308	100	
EO18	MG597520	1398	<i>Nocardiosis lucentensis</i> DSM 44048(T)	ANBC01000932	100	
EO20	MG597521	1401				
EO8	MG597522	1401				
EO9	MG597523	1402				
EO15	MG597524	1406				
EO14	MG597525	1401				
EC15	MG597526	1398				99,93
EO12	MG597527	1400				99,86
EC13	MG597528	1387				99,78
EO16	MG597529	1402				99,71
EO17	MG597532	1377				99,64
EO19	MG597530	1407				
EO4	MG597531	1400				99,35
EO5	MG597533	1406				
EO6	MG597534	1401				
EO1	MG597535	1397				
EO10	MG597536	1413				
EO3	MG597537	1399	<i>Nocardiosis aegyptica</i> DSM 44442(T)	AJ539401	99,57	
ES72	MG597538	1377	<i>Rhodococcus corynebacterioides</i> DSM 20151(T)	AF430066	99,49	
			<i>Rhodococcus kroppenstedtii</i> DSM 44908(T)	jgi.1107894	99,20	
			<i>Rhodococcus enclensis</i> NIO-1009(T)	HQ858009	99,19	
			<i>Rhodococcus trifolii</i> T8(T)	FR714843	98,97	
ES42	MG597539	1383	<i>Streptomyces cavourensis</i> NBRC 13026(T)	AB184264	99,42	
			<i>Kitasatospora albolonga</i> NBRC 13465(T)	AB184425	99,35	
			<i>Streptomyces araujoniae</i> ASBV-1(T)	EU792889	99,13	

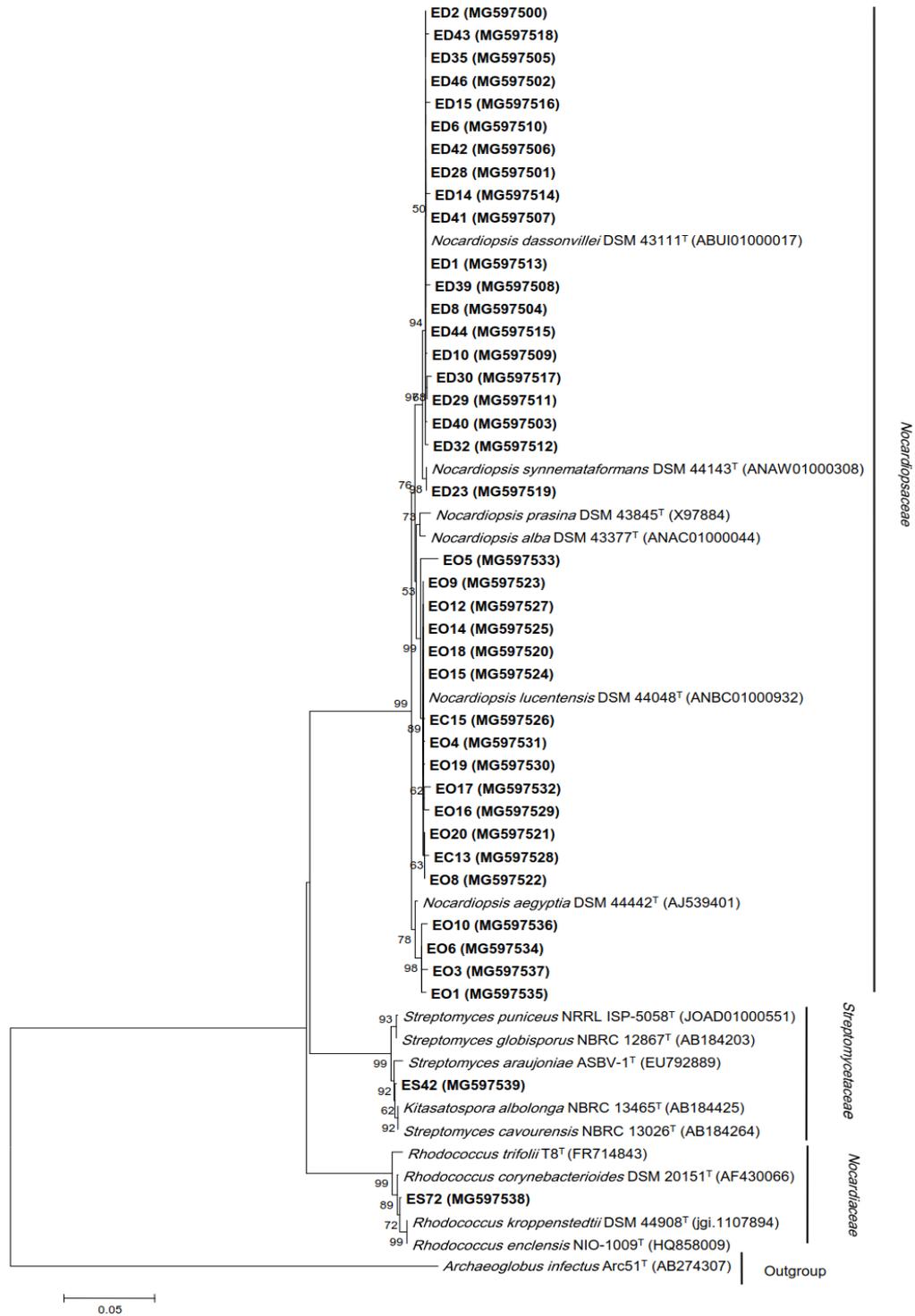


Figure 14 : Arbre phylogénétique enraciné construit par la méthode de Neighbor-Joining montrant la relation des isolats du site Ezzemoul avec les espèces les plus proches des genres *Nocardiostrictus*, *Streptomyces* et *Rhodococcus*. Les valeurs de Bootstrap supérieures à 50% (après 1000 répliquions) sont représentées sur les noeuds. Les numéros d'accèsion de chaque séquence sont représentés entre parenthèses. *Archaeoglobus infectus* Arc51^T est utilisée comme outgroup. L'échelle 0,05 représente le nombre de substitution par position de nucléotide et estime la divergence des séquences. EO, (EC, ES) et ED sont les isolats des concentrations 2%, 5% et 10% d'NaCl, respectivement.

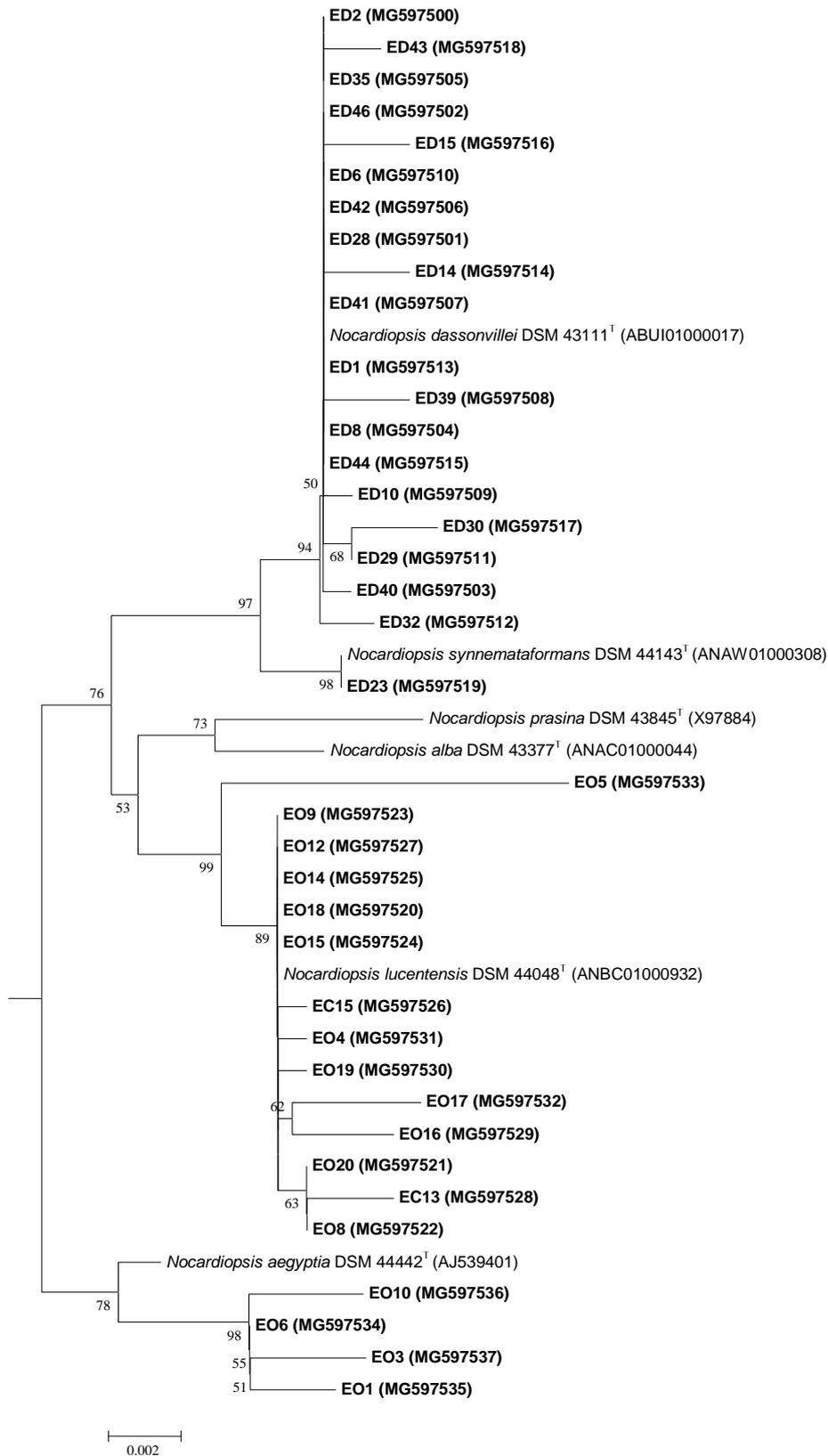


Figure 14 (a) : Clade de la famille des *Nocardioptisaceae* (genre *Nocardioptis*).



Figure 15 : Arbre phylogénétique enraciné construit par la méthode de Neighbor-Joining montrant la relation de l'isolat ES42 du site Ezzemoul avec les espèces les plus proches du genre *Streptomyces*. Les valeurs de Bootstrap supérieures à 50% (après 1000 réplifications) sont représentées sur les noeuds. Les numéros d'accèsion de chaque séquence sont représentés entre parenthèses. *Salinactinospora qingdaonensis* CXB832^T est utilisée comme outgroup. L'échelle 0,01 représente le nombre de substitution par position de nucléotide et estime la divergence des séquences.

L'isolat unique ES42 (tableau 23 ; figures 14 et 15) présente des homologies de 99,42% avec *Streptomyces cavourensis*, de 99,35% avec *Kitasatospora albolonga* (anciennement *Streptomyces albolongus*) et de 99,13% avec *Streptomyces araujoniae*. Cependant, il se détache de ces espèces en formant une ligne phylogénétique distincte, et il pourrait donc représenter une nouvelle espèce.

L'isolat unique ES72 (tableau 23 ; figures 14 et 16) présente des homologies de 99,49% avec *Rhodococcus corynebacterioides*, de 99,20% avec *Rhodococcus kroppenstedtii*, de 99,19% avec *Rhodococcus enclensis* et de 98,97% avec *Rhodococcus trifolii*. Cependant, il se détache de ces espèces en formant une ligne phylogénétique distincte, et il pourrait donc représenter une nouvelle espèce.

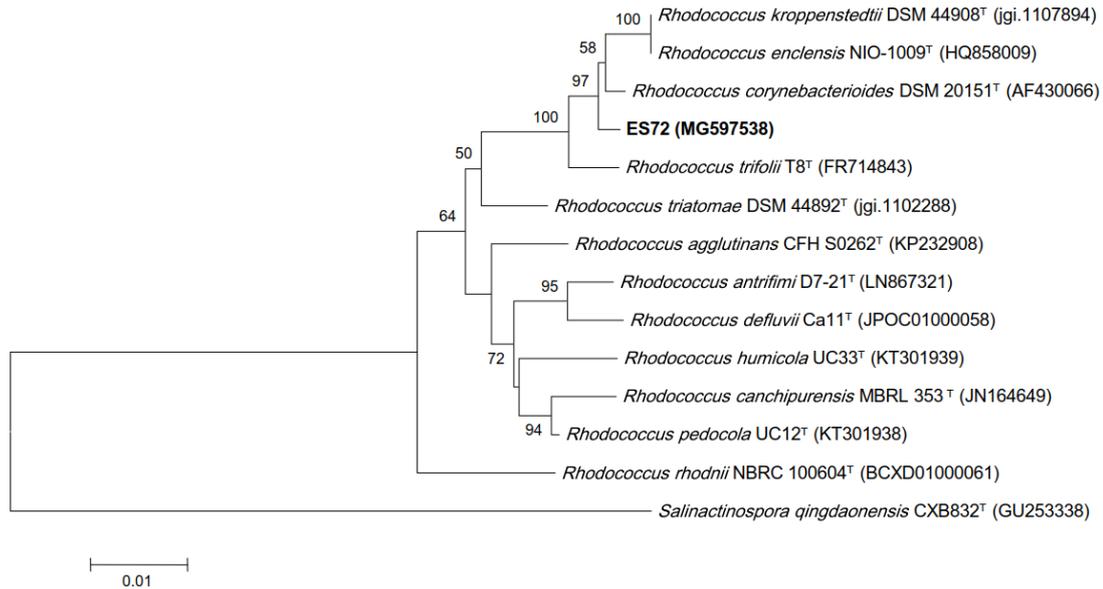


Figure 16 : Arbre phylogénétique enraciné construit par la méthode de Neighbor-Joining montrant la relation de l'isolat ES72 du site Ezzemoul avec les espèces les plus proches du genre *Rhodococcus*. Les valeurs de Bootstrap supérieures à 50% (après 1000 réplifications) sont représentées sur les noeuds. Les numéros d'accèsion de chaque séquence sont représentés entre parenthèses. *Salinactinospora qingdaonensis* CXB832^T est utilisée comme outgroup. L'échelle 0,01 représente le nombre de substitution par position de nucléotide et estime la divergence des séquences.

3.2. Diversité phylogénétique des isolats de chott Tinsilt

Les gènes de l'ADNr 16S de 42 isolats d'actinobactéries, issus de chott Tinsilt, ont été séquencés. Leurs séquences sont déposées au niveau de Genbank avec les numéros d'accèsion MG597562 à MG597603. L'analyse moléculaire de ces séquences (tableau 24, figures de 17 (a) à 19 et figure 10 annexe 8) a permis de les classer en quatre genres : *Streptomyces* (dominant avec 57,14%) (Skerman *et al.* 1980), *Nocardiopsis* (38,09%) (Meyer 1976), suivie par *Brevibacterium* (Breed 1953) et *Actinopolyspora* (Gochnauer *et al.* 1975) avec 2,38% chacun. Ces derniers appartiennent aux familles : *Streptomycetaceae*, *Nocardiopsaceae*, *Brevibacteriaceae* et *Actinopolysporaceae* ; et aux ordres : *Streptomycetales*, *Streptosporangiales*, *Micrococcales* et *Pseudonocardiales*, respectivement.

Tableau 24 : Identification taxonomique des isolats de chott Tinsilt.

Code des isolats	Numéros d'accession	Taille en (pb)	Espèce type la plus proche	Numéros d'accession	Identité (%)
TF12	MG597562	1393	<i>Nocardioopsis aegyptica</i> DSM 44442(T)	AJ539401	99,78
TF3	MG597563	1400			99,79
TF16	MG597564	1401			
TF2	MG597565	1399			
TF6	MG597566	1398			
TF11	MG597567	1399			
TF21	MG597568	1408			99,71
TF18	MG597569	1396			
TF19	MG597570	1396			
TF5	MG597571	1395			99,64
TS2	MG597572	1404			99,57
TG72	MG597573	1400			99,43
TG92	MG597574	1403			
TS31	MG597575	1417			99,29
TJ21	MG597576	1400	<i>Nocardioopsis alba</i> DSM 43377(T)	ANAC01000044	99,93
TG12	MG597577	1396	<i>Nocardioopsis umidischolae</i> 66/93(T)	AY036001	99,86
TJ15	MG597578	1386	<i>Streptomyces anulatus</i> NRRL B-2000(T)	DQ026637	100
TJ13	MG597579	1377			99,93
TJ30	MG597580	1352	<i>Streptomyces pratensis</i> ch24(T)	JQ806215	99,85
TJ12	MG597581	1387			100
TG22	MG597582	1383	<i>Streptomyces xantholiticus</i> NBRC 13354(T)	AB184349	99,35
TG5	MG597583	1395			99,28
TG1	MG597584	1395			99,43
TG33	MG597585	1395			
TG19	MG597586	1351	<i>Streptomyces xinghaiensis</i> S187(T)	EF577247	100
TG18	MG597587	1392			98,41
TG20	MG597588	1346	<i>Streptomyces luteus</i> TRM 45540(T)	KN039946	99,93
			<i>Streptomyces mutabilis</i> NBRC 12800(T)	AB184156	
TG26	MG597589	1347	<i>Streptomyces thinghirensis</i> DSM 41919(T)	FM202482	99,85
TJ4	MG597590	1399			98,06

Tableau 24 : Identification taxonomique des isolats de chott Tinsilt (suite).

Code des isolats	Numéros d'accession	Taille en (pb)	Espèce type la plus proche	Numéros d'accession	Identité (%)
TG13	MG597591	1348	<i>Streptomyces marokkonensis</i> Ap1(T)	AJ965470	99,78
TG24	MG597592	1346			
TG10	MG597593	1394	<i>Streptomyces iakyrus</i> NRRL ISP-5482(T)	JNXI01000062	99,57
TG61	MG597594	1346			99,55
TJ3	MG597595	1346			99,48
TG30	MG597597	1346	<i>Streptomyces ambofaciens</i> ATCC 23877(T)	CP012382	99,55
TG201	MG597598	1394			99,50
TJ27	MG597599	1396			99,35
TJ1	MG597600	1372			99,05
TG3	MG597596	1369	<i>Streptomyces griseorubens</i> NBRC 12780(T)	AB184139	99,49
TG29	MG597601	1378			98,76
TF292	MG597602	1415	<i>Actinopolyspora erythraea</i> YIM 90600(T)	JPMV01000059	99,15
TG27	MG597603	1411	<i>Brevibacterium permense</i> VKM Ac-2280(T)	AY243343	99,15
			<i>Brevibacterium siliguriense</i> DSM 23676 (T)		99,01
			<i>Brevibacterium sediminis</i> FXJ8.269(T)		98,87

Un seul isolat (TF292) est affilié à l'espèce *Actinopolyspora erythraea* avec un pourcentage d'identité de 99,15% (tableau 24), ce qui est confirmé sur l'arbre de la figure 10 (annexe 8) avec une valeur de bootstrap de 87%.

Un autre isolat unique (TG27) est apparenté à l'espèce *Brevibacterium permense* avec un pourcentage d'identité de 99,15% (tableau 24). Sur les arbres des figures 17 (c) et 10 (annexe 8), il apparaît plus proche des espèces *Brevibacterium siliguriense* (avec 99,01%) et *Brevibacterium sediminis* (avec 98,87%) tout en formant une ligne phylogénétique différente. Sur l'arbre de la figure 18 construit en utilisant les dix espèces les plus proches, il semble affilié à *Brevibacterium permense* avec une valeur de bootstrap très faible (41%). Nous concluons donc, que la position taxonomique de l'isolat TG27 est incertaine par rapport à l'espèce.

Les isolats appartenant au genre *Nocardiopsis* sont répartis en trois clades différents (figures 10 (annexe 8) et 17 (b)). Les isolats TG12 et TJ21 appartiennent aux espèces *Nocardiopsis umidischolae* (avec 99,86% d'identité) et *Nocardiopsis alba* (avec 99,93% d'identité), respectivement (tableau 24). Les arbres des figures 10 (annexe 8) et 17 (b) consolident les positions taxonomiques de ces isolats, car ils occupent la même ligne phylogénétique que ces espèces avec une valeur de bootstrap élevée (99%). Quatorze isolats (TG72, TG92, TF18, TS2, TS31, TF2, TF12, TF19, TF16, TF11, TF21, TF5, TF6 et TF3) semblent très proches de l'espèce *Nocardiopsis aegyptica* avec des pourcentages d'identité allant de 99,29 à 99,78%. D'autres tests sont nécessaires pour confirmer s'ils appartiennent tous à cette même espèce ou pas.

Un peu plus que la moitié des isolats est affiliée au genre *Streptomyces*. Un pourcentage d'homologie de 99,78% a été obtenu entre les séquences de l'ADNr 16S de l'espèce *Streptomyces marokkonensis* et celles des souches TG13 et TG24. Il est fort possible que ces deux souches appartiennent à cette même espèce (figures 10 (annexe 8) et 17 (a)).

Les séquences d'ADNr 16S des souches TG26 et TJ4 présentent des pourcentages d'identité de 99,85 et de 98,06% avec l'espèce *Streptomyces thinghirensis*. Cela est confirmé sur l'arbre des figures 10 (annexe 8) et 17 (a), sauf que la souche TJ4 présente une distance assez importante avec cette espèce, et son pourcentage d'identité est inférieur au seuil de 98,7% qui différencie les nouvelles espèces (Stackebrandt et Ebers, 2006). Par conséquent, la souche TJ4 pourrait représenter un nouveau taxon.

L'isolat TG19 est 100% identique avec l'espèce *Streptomyces xinghaiensis*. L'isolat TG18 est proche de cette même espèce avec 98,41% d'identité. En plus de représenter un pourcentage inférieur à celui de Stackebrandt et Ebers, (2006), l'isolat TG18 forme une ligne phylogénétique complètement distincte avec les espèces de références les plus proches (figures 10 (annexe 8), 17(a) et 19). Cet isolat est donc, un nouveau taxon du genre *Streptomyces*.

L'isolat TG20 montre la même homologie de 99,93% avec les deux espèces *Streptomyces luteus* et *Streptomyces mutabilis*. L'analyse de l'ADNr 16S ne nous a pas permis d'affilier cet isolat à une espèce bien précise.

Les isolats TG1, TG5, TG22, et TG33 sont très proches de *Streptomyces xantholiticus* avec des pourcentages d'identité allant de 99,28 à 99,43%, mais les arbres

des figures 10 (annexe 8) et 17 (a) montrent que ces isolats occupent une ligne phylogénétique bien différente de cette espèce et des autres espèces les plus proches. Ils peuvent représenter une même nouvelle espèce en partageant un bootstrap de 85%.

Les isolats TJ15 et TJ13 sont affiliés à *Streptomyces anulatus* avec des pourcentages de 100% et de 99,93%, respectivement. Les isolats TJ12 et TJ30 sont apparentés à *Streptomyces pratensis* avec 100 et 99,85%. Cependant, sur les arbres de la figure 17 (a) et des figures 2 et 10 de l'annexe 8, l'affiliation des quatre isolats n'est pas bien définie par rapport aux espèces les plus proches : *S. anulatus*, *S. pratensis* et *S. setonii*.

Les isolats TJ3, TG61 et TG10 présentent des homologies de 99,48 à 99,57% avec *Streptomyces iakyrus*. Les arbres de la figure 17 (a) et des figures 9 et 10 de l'annexe 8, montrent clairement que ces isolats sont très proches entre eux avec une valeur de bootstrap supérieure à 80% et peuvent former une nouvelle espèce, car ils occupent une même ligne phylogénétique, qui est bien séparée des espèces les plus proches.

Les isolats TJ1, TJ27, TG201 et TG30 se rapprochent le plus de l'espèce *Streptomyces ambofaciens* avec des pourcentages allant de 99,05 à 99,55% d'identité. Les isolats TG29 et TG3 sont apparentés à l'espèce *Streptomyces griseorubens* (avec 98,76 et 99,49%) et forment un clade très distinct de toutes les espèces les plus proches (figure 5 annexe 8). Contrairement aux résultats du pourcentage d'identité, ces cinq isolats se rassemblent sur un seul clade, qui est proche de l'espèce *Streptomyces thinghirensis*. L'isolat TJ1 semble toujours proche de l'espèce *S. ambofaciens* (figure 17 (a) ; figures 4, 6 et 10 de l'annexe 8).

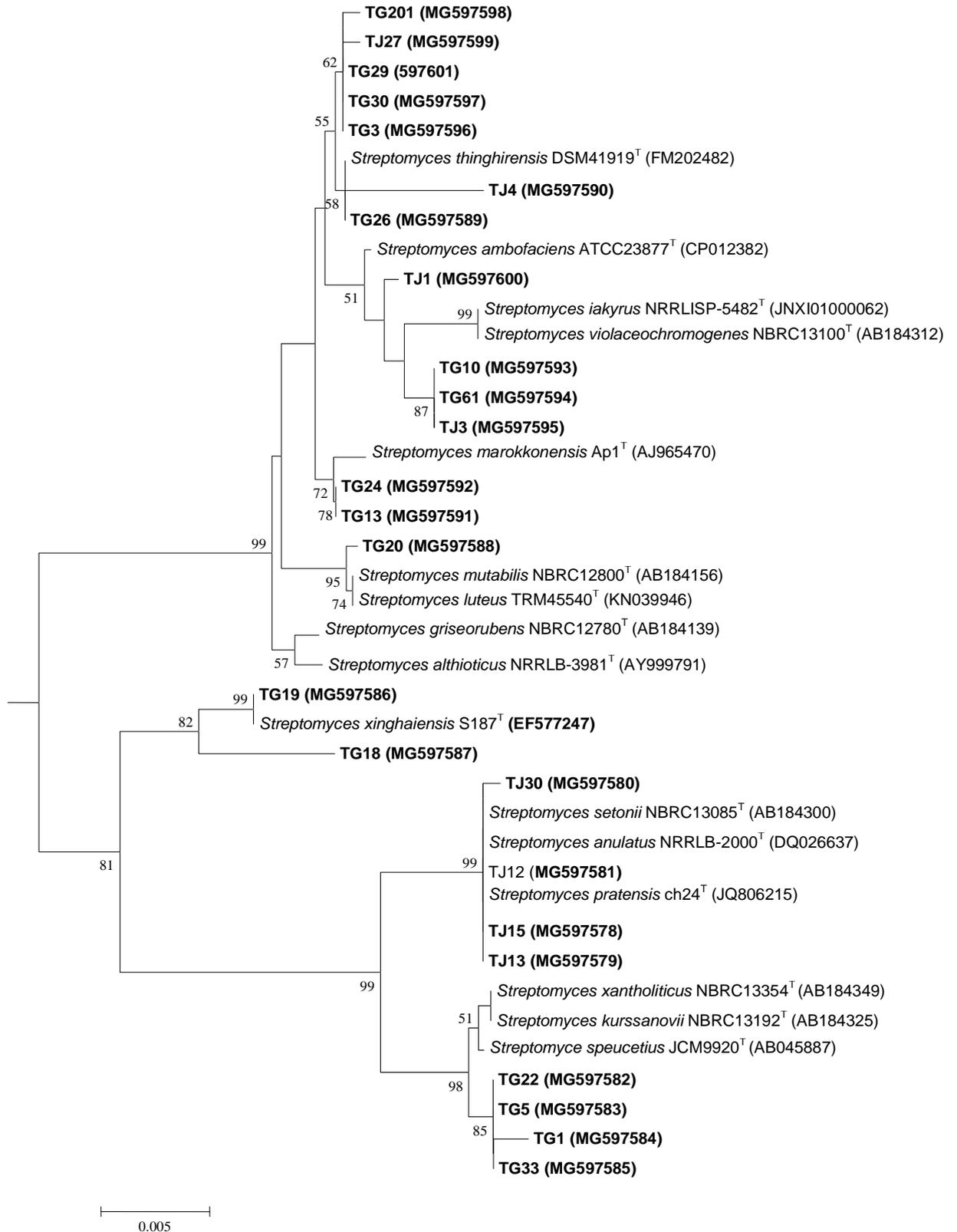


Figure 17 (a) : Clade de la famille des *Streptomycetaceae* (genre *Streptomyces*).

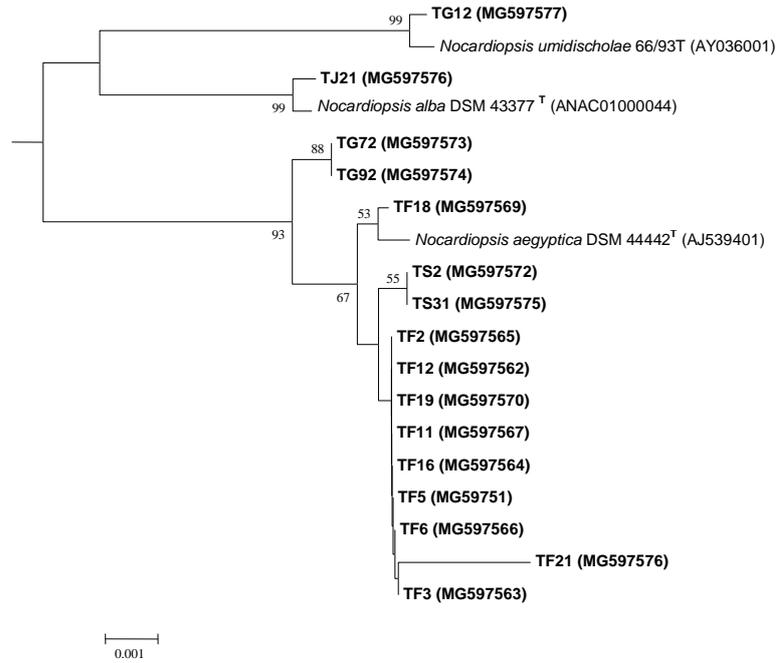


Figure 17 (b) : Clade de la famille des *Nocardiopeceae* (genre *Nocardiopece*).

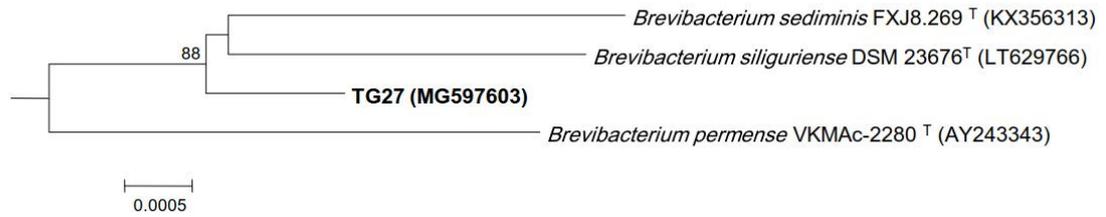


Figure 17 (c) : Clade de la famille des *Brevibacteriaceae* (genre *Brevibacterium*).

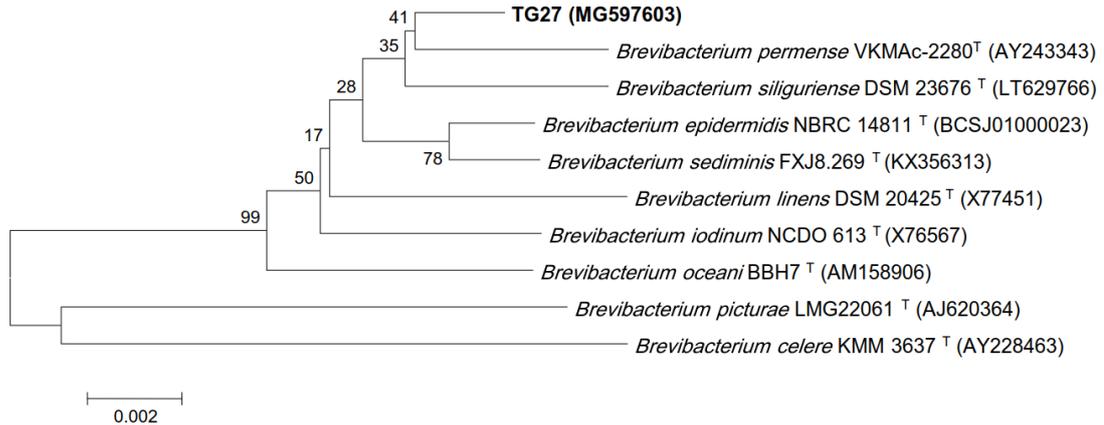


Figure 18 : Arbre phylogénétique non enraciné construit par la méthode de Neighbor-Joining, montrant la relation de l’isolat TG27 du site Tinsilt avec les espèces les plus proches du genre *Brevibacterium*. Les valeurs de Bootstrap aux nœuds représentent le pourcentage après 1000 réplifications. Les numéros d’accession de chaque séquence sont représentés entre parenthèses. L’échelle 0,002 représente le nombre de substitution par position de nucléotide et estime la divergence des séquences.

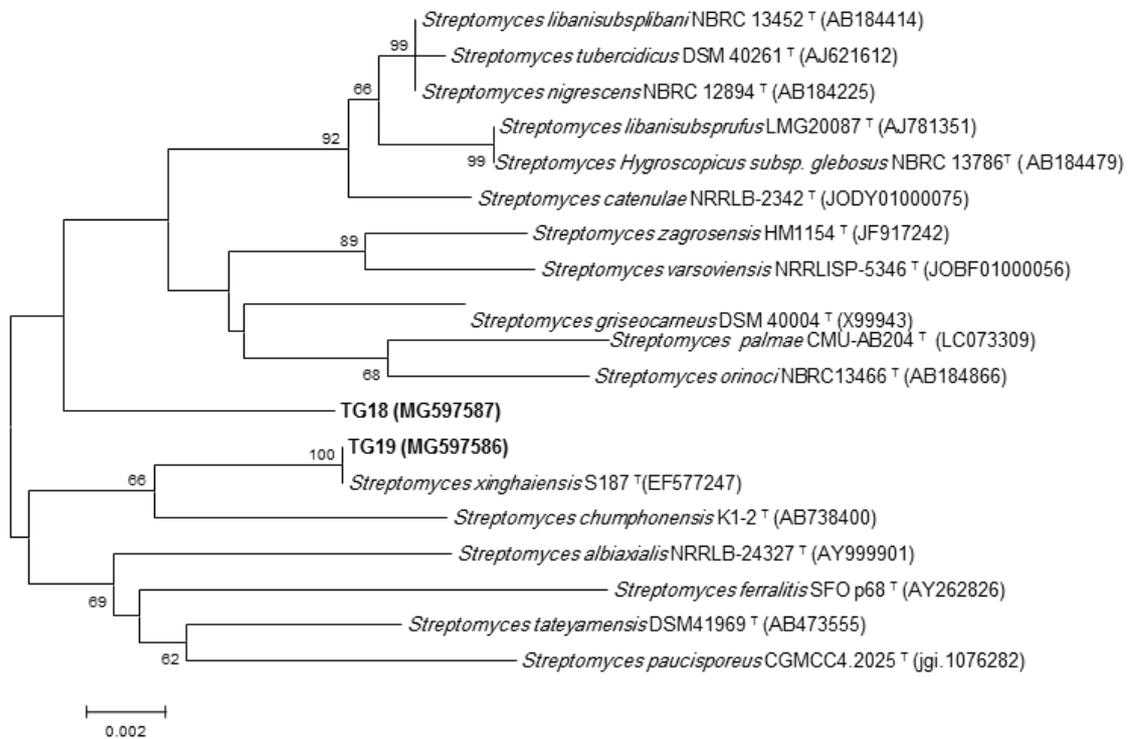


Figure 19 : Arbre phylogénétique non enraciné construit par la méthode de Neighbor-Joining montrant la relation des isolats TG18 et TG19 du site Tinsilt avec les espèces les plus proches de genre *Streptomyces*. Les valeurs de Bootstrap supérieures à 50% (après 1000 réplifications) sont représentées sur les noeuds. Les numéros d’accession de chaque séquence sont représentés entre parenthèses. L’échelle 0,002 représente le nombre de substitution par position de nucléotide et estime la divergence des séquences.

3.3. Diversité phylogénétique des isolats de la sebkha de Djendli

Les gènes de l'ADNr 16S de 22 isolats d'actinobactéries, issus de la sebkha de Djendli, ont été séquencés et leurs séquences sont déposées au niveau de Genbank avec les numéros d'accèsion MG597540 à MG597561. L'analyse de ces dernières (figure 20 et tableau 25) a permis de détecter les mêmes genres *Nocardiopsis* et *Streptomyces* déjà trouvés dans les sites Ezzemoul et Tinsilt. C'est le genre *Streptomyces* qui domine avec 81,82% des isolats comme était le cas pour le site Tinsilt.

Tableau 25 : Identification taxonomique des isolats de la sebkha de Djendli.

Code des isolats	Numéros d'accèsion	Taille en (pb)	Espèce type la plus proche	Numéros d'accèsion	Identité (%)
DH10	MG597540	1399	<i>Nocardiopsis aegyptica</i> DSM 44442(T)	AJ539401	99,71
DK15	MG597541	1403			99,79
DH21	MG597542	1384			99,43
DH14	MG597543	1396			99,41
DK7	MG597544	1394	<i>Streptomyces xantholiticus</i> NBRC 13354(T)	AB184349	99,36
DK12	MG597545	1346			99,33
DK16	MG597546	1401			99,29
DK13	MG597547	1348			99,21
DK14	MG597548	1402			
DK17	MG597549	1395			
DK21	MG597550	1382	<i>Candidatus Streptomyces philanthi triangulum</i>	DQ375802	99,54
			<i>Streptomyces youssoufiensis</i> X4(T)	FN421338	99,42
DH24	MG597551	1397	<i>Streptomyces violascens</i> ISP 5183(T)	AY999737	99,50
DH12	MG597552	1378	<i>Streptomyces albidoflavus</i> DSM 40455(T)	Z76676	99,71
DH18	MG597553	1393			
DH20	MG597554	1394			
DH3	MG597555	1395			
DH4	MG597556	1370	<i>Streptomyces marokkonensis</i> Ap1(T)	AJ965470	98,98
DH13	MG597557	1377			99,78
DH7	MG597558	1381	<i>Streptomyces thinghirensis</i> DSM 41919(T)	FM202482	100
DK2	MG597559	1348			99,93
DK23	MG597560	1400			99,79
DK11	MG597561	1342			99,55

Les quatre isolats DH7, DK2, DK23 et DK11 sont très proches de l'espèce *Streptomyces thinghirensis* avec les pourcentages d'identité de 100%, 99,93%, 99,86% et 99,55%, respectivement (tableau 25) ; ce qui est confirmé sur l'arbre de la figure 20, car ils occupent la même ligne phylogénétique que cette même espèce. Ils semblent très proches les uns des autres avec le pourcentage de bootstrap de 86%.

Les isolats DH13 et DH4 se rapprochent de l'espèce *Streptomyces marokkonensis* avec les pourcentages d'identité de 98,98% et 99,78%, respectivement (tableau 25). Par contre, les arbres phylogénétiques de la figure 20 et la figure 4 de l'annexe 7, montrent que ces isolats (qui semblent représenter la même espèce) se distinguent de toutes les espèces les plus proches, ce qui suggère la possibilité d'une nouvelle espèce du genre *Streptomyces*.

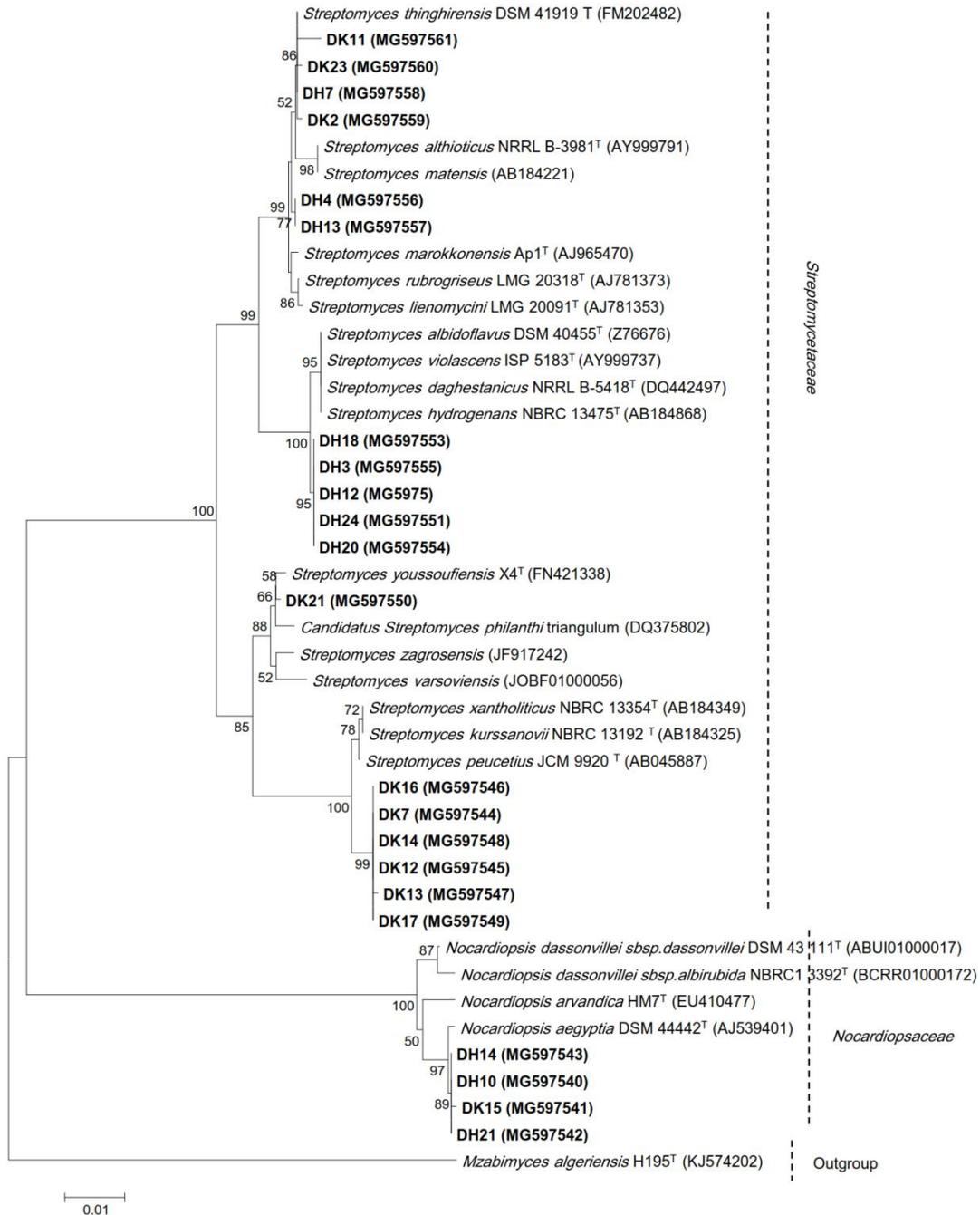


Figure 20 : Arbre phylogénétique enraciné construit par la méthode de Neighbor-Joining montrant la relation des isolats du site Djendli avec les espèces les plus proches des genres *Nocardiopsis* et *Streptomyces*. Les valeurs de Bootstrap supérieures à 50% (après 1000 répliques) sont représentées sur les noeuds. Les numéros d'accèsion de chaque séquence sont représentés entre parenthèses. *Mzabimycetes algeriensis* H195^T est utilisée comme outgroup. L'échelle 0,01 représente le nombre de substitution par position de nucléotide et estime la divergence des séquences. DK et DH sont les isolats des concentrations 2% et 5% d'NaCl, respectivement.

L'isolat DH24 est apparenté à l'espèce *Streptomyces violascens* avec 99,5% d'identité et les isolats DH12, DH18, DH20 et DH3 partagent le même pourcentage d'identité de 99,71% avec l'espèce *Streptomyces albidoflavus* (tableau 25). Cependant,

sur l'arbre de la figure 20, ces cinq isolats se positionnent sur la même ligne phylogénétique et semblent représenter la même espèce avec un bootstrap élevé de 95%. Cette ligne se détache des espèces *Streptomyces violascens*, *Streptomyces albidoflavus* et des autres espèces les proches ; donc ces isolats peuvent appartenir à une nouvelle espèce.

L'isolat DK21 est affilié aux espèces *Candidatus Streptomyces philanthi* avec 99,54% d'identité et à *Streptomyces youssoufiensis* avec un pourcentage légèrement moins élevé (99,42%) (tableau 25) ; alors que sur les arbres phylogénétiques de la figure 20 et de la figure 2 de l'annexe 7, il semble plus proche que *S. youssoufiensis*. L'analyse de l'ADNr 16S ne nous a pas permis d'affilier cet isolat à une espèce bien précise, donc d'autres tests seront nécessaires pour éclaircir sa position taxonomique.

Les isolats DK17, DK14, DK13, DK16, DK12 et DK7 se rapprochent le plus de l'espèce *Streptomyces xantholiticus* (99,21 à 99,43% d'identité) (tableau 25) ; sauf que sur l'arbre de la figure 20, ces isolats forment une ligne phylogénétique qui se détache des espèces les plus proches. Ils présentent probablement une nouvelle espèce. Ces isolats semblent appartenir à la même espèce avec un bootstrap très élevé de 99%.

En plus d'être présente dans la sebkha d'Ezzemoul et dans le chott Tinsilt, l'espèce *Nocardioopsis aegyptica* est également détectée dans le site Djendli et elle est apparentée avec 18,18% des isolats (DH10, DK15, DH21 et DH14) avec 99,71 à 99,79% d'identité et 97% de bootstrap. Ces isolats peuvent représenter la même espèce (bootstrap 89%).

L'analyse phylogénétique (basée sur le gène de l'ARN 16S) de 104 isolats, issus des trois sites d'étude (la sebkha d'Ezzemoul, le chott Tinsilt et la sebkha de Djendli), nous a permis de les assimiler à cinq différents genres : *Streptomyces*, *Nocardioopsis*, *Rhodococcus*, *Actinoplyspora* et *Brevibacterium*. La majorité des isolats sont affiliés à ces genres avec des pourcentages d'identité supérieurs à 99%. L'association du pourcentage de similitude (ou d'identité) avec la construction des arbres phylogénétiques (qui montrent les relations de parenté entre les groupes bactériens) nous a permis d'identifier certaines actinobactéries jusqu'au stade de l'espèce. Pour la plupart d'entre elles, seule l'appartenance au genre est vérifiée, car certaines ont des pourcentages de similitude inférieurs à 98,7% (Stackebrandt et Ebers, 2006), et d'autres

sont éloignées des espèces les proches sur l'arbre phylogénétique, en présentant des clades ou des lignes complètement d'instincts.

Le gène de l'ARNr 16S est le marqueur génétique le plus connu utilisé pour identifier et classer les bactéries, mais dans certains cas, il trouve ses limites dans la discrimination de certaines espèces. Par conséquent, afin de vérifier la position taxonomique des souches douteuses et de confirmer leur appartenance à de nouvelles espèces, d'autres analyses phénotypiques (morphologiques, physiologiques et biochimiques) et génotypiques (hybridation ADN-ADN et/ou séquençage de plusieurs gènes de ménage), doivent être réalisées. Dans certains cas, le séquençage du génome complet est recommandé pour distinguer les espèces très proches.

Les espèces du genre *Streptomyces* peuvent s'adapter à de fortes concentrations de sel dans les sols (Sudnitsyn 2009). Un grand nombre de celles de *Nocardiopsis* sont de nature halotolérantes, isolées de sols désertiques et d'environnements marins (Bennur *et al.* 2016).

Des études ont rapporté que les membres du genre *Nocardiopsis* étaient prédominants dans certains sols désertiques en Algérie (Meklat *et al.*, 2011) et dans un sol salé en Chine (Lv *et al.* 2006). Ceux du genre *Streptomyces* étaient prédominants dans d'autres sols salés en Chine (Cai *et al.* 2009) et en Inde (Jose et Jebakumar, 2013).

Les espèces du genre *Rhodococcus* peuvent occuper divers habitats tels que : le sol, l'eau, l'air, les plantes et les animaux. Certaines ont été retrouvées dans le milieu marin, et très peu ont été décrites dans les sols salins (Táncsics *et al.* 2017).

Les brevibactéries ont été isolées de nombreux habitats, notamment ceux à forte concentration en sel, tels que les environnements marins et les sédiments de lac hypersalin. Une seule espèce nommée *Brevibacterium album* a été isolée de sol salin en chine (Tang *et al.* 2008). La plupart des espèces proviennent de produits laitiers, de peau humaine ou de matériel clinique (Trujillo et Goodfellow, 2015).

Jusqu'à ce jour, peu d'espèces (13) du genre *Actinopolyspora*, sont décrites. Toutes proviennent de milieux hypersalins et en particulier du sol. Parmi elles cinq ont été découvertes en Algérie : *A. mzabensis*, *A. righensis*, *A. biskrensis*, *A. algeriensis* et *A. saharensis* (Saker *et al.*, 2015 ; Meklat *et al.*, 2013(a) ; Meklat *et al.*, 2013(b) ; Meklat *et al.*, 2011).

Nous constatons que la variation des concentrations de NaCl ajoutées au milieu de culture ISP5, a joué un rôle remarquable dans la diversité des actinobactéries isolées des trois sites étudiés. La concentration de 10% de NaCl, a permis d'isoler les espèces : *Nocardiopsis dassonvillei*, *Nocardiopsis synnemataformans* (sebkha d'Ezzemoul), *Nocardiopsis aegyptica* et *Actinopolyspora earythraea* (chott Tinsilt). La concentration de 5% a permis de détecter les espèces *Nocardiopsis lucentensis* (sebkha d'Ezzemoul) et *Nocardiopsis umidischolae* (chott Tinsilt), ainsi que les genres *Rhodococcus* (sebkha d'Ezzemoul), *Brevibacterium* (chott Tinsilt) et *Streptomyces* dans les trois sites. Les espèces *Nocardiopsis aegyptica* (sebkha d'Ezzemoul) et *Nocardiopsis alba* (chott Tinsilt); et le genre *Streptomyces* (sebkhas de Djendli et chott Tinsilt) ont été isolés sur le milieu ISP5 à 2% de NaCl.

Néanmoins, les conditions de cultures choisies ont peut être conditionnés cette diversité, d'où l'absence des autres genres d'actinobactéries. En outre, malgré l'abondance des bactéries dans le sol, plus de 99% de ces dernières ne peuvent être cultivées par des techniques traditionnelles (Pham et Kim, 2012). Par conséquent, La confirmation de la présence des autres genres dans ces écosystèmes, pourrait être effectuée par une autre méthode non cultivable telle que la métagénomique, et notamment le clonage moléculaire.

4. Diversité macroscopique, physiologique et métabolique des souches

L'identification moléculaire est très rapide et même efficace pour identifier nos isolats. Néanmoins, dans le but de mieux caractériser ces isolats et afin d'évaluer leur potentiel biotechnologique, nous avons étudié leurs caractères, macroscopiques, physiologiques et métaboliques ainsi que leurs activités antimicrobiennes. Pour réaliser ces tests, nous avons procédé à une sélection de souches, en se basant sur le pourcentage d'identité après identification par l'ADNr 16S. Nous avons donc pris un seul isolat parmi ceux qui peuvent représenter la même espèce, c'est-à-dire avec le même pourcentage d'identité, ainsi que les isolats avec des pourcentages d'identités différents appartenant à des espèces différentes. Nous avons ainsi sélectionné 22 souches sur les 40 isolées du site Ezzemoul, 32 sur les 42 du site Tinsilt et 17 parmi les 22 obtenues du site Djendli.

4.1. Etude macroscopique

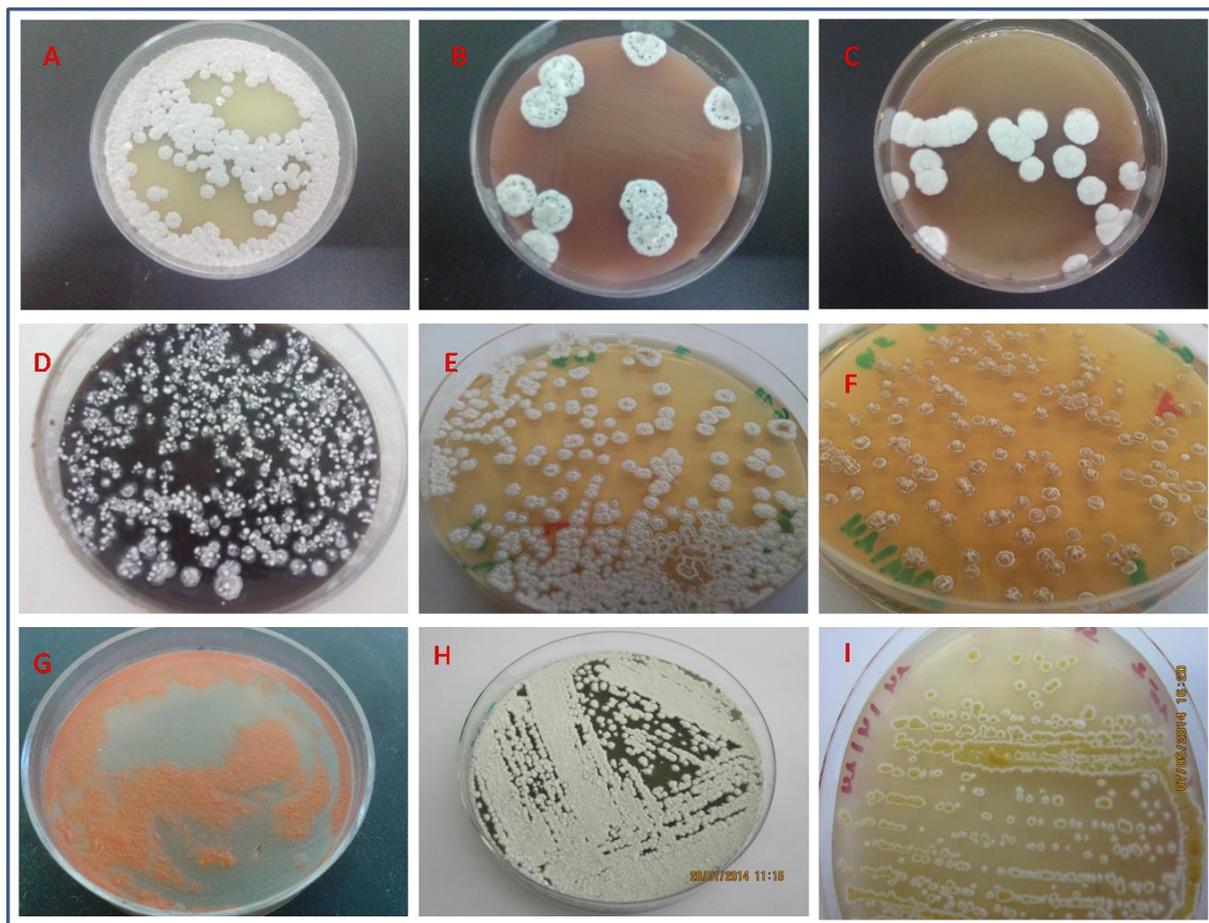


Figure 21 : Aspect des colonies de quelques isolats sur les milieux de culture ISP2 (A, B, C et D) et ISP5 (E, F, G, et H). (A) : isolat DK14 ; (B) : isolat DH24 ; (C) : isolat : TJ4 ; (D) : TF5 ; (E) : isolat TG12 ; (F) : isolat TG3 ; (G) : isolat ES72 ; (H) : isolat EO10 et (I) : isolat ED2.

D'une manière générale, toutes les souches des trois sites d'étude (Ezzemoul, Tinsilt et Djendli) se développent bien sur les deux milieux de culture ISP5 et ISP2 (figure 21).

La vitesse moyenne de croissance à la quelle apparaissent la majorité des actinobactéries sélectionnées, est de 3 à 7 jours. Cependant, les isolats EC13 et EC15 (affiliés à *Nocardiopsis lucentensis*, du site Ezzemoul) croissent très rapidement, au bout de 24 heures. La croissance est plus lente, de 9 à 14 jours chez certains isolats du site Tinsilt, comme : TG92 (*Nocardiopsis aegyptica*), TG1, TG22 (proches de *Streptomyces xantholiticus*), TG10 (rattaché à *Streptomyces iakyrus*) et TF292 (proche de *Actinopolyspora erythraea*).

Les premiers signes de croissance se traduisent par l'apparition de colonies pâteuses, qui adhèrent fortement à la gélose. Ensuite, après deux semaines d'incubation la majorité des colonies sporulent en donnant l'aspect poudreux ou cotonneux pour quelques isolats (EO12, EO17, EC13, proches de *Nocardiopsis lucentensis*, du site Ezzemoul, sur ISP5). Il y a une absence de sporulation (sur le milieu ISP5), présentant un aspect lisse, chez une minorité d'isolats (TG18 et TG26, du site Tinsilt), et (DH10, DH14 et DH4, du site Djendli).

Les colonies de l'isolat ES72 (proche de *Rhodococcus corynebacterioides*) ne sont pas incrustées dans la gélose, ne sporulent pas et sont colorées en rouge-orange.

Les mycéliums aériens se caractérisent par différentes couleurs : blanche, verte, grise, rose, jaune ou marron. Après observation du revers des colonies, le mycélium du substrat est coloré en jaune, marron foncé, noir, vert olive, beige, orange claire et rouge.

La taille moyenne de la plus part des colonies est comprise entre 1 et 6 mm. Certaines se présentent avec des tailles plus grandes de 10 à 13 mm, sur le milieu ISP5, il s'agit des colonies des isolats EO6, EO5 et EO1 du site Ezzemoul.

Les pigments diffusibles sont produits chez seulement, huit isolats du site Ezzemoul. Il s'agit de pigments marrons, sur ISP2 pour ED46 et ED14, pour l'isolat EC15 il est de couleur vert olive, sur ISP2. Tandis que pour les isolats EO6, EO1, EO10, EO3 ils produisent des pigments verts claires et foncés, sur ISP5. En fin l'isolat ED32, il produit un pigment noir, sur ISP2. Chez les isolats du site Djendli, huit produisent des pigments diffusibles. Les isolats DH14 et DH12 sont la source de pigments verts, sur ISP2. DK12 produit un pigment rouge, sur ISP2. Concernant l'isolat DK2 le pigment est de couleur orange claire sur ISP2, pour DK16 il est marron sur ISP5. Les isolats DH7, DK23, DK11 produisent des pigments jaunes, sur ISP2. En ce qui concerne le site Tinsilt quatre isolats produisent ce type de pigment : TF5 secrète un pigment noir, sur ISP2, tandis que TG20, TG26 des pigments jaunes sur ISP2 alors que TJ4 un pigment rouge sur ISP2.

4.2. Etude physiologique

La croissance des souches sélectionnées a été testée sur la gélose ISP5 avec : 0 à 15% de NaCl, températures comprises entre 5 et 55 °C et le pH allant de 2 à 12. Les résultats de l'étude physiologique sont rassemblés dans les tableaux 26, 27 et 28.

A l'exception de l'isolat TF292 (proche de l'espèce *Actinopolyspora erythraea*, du site Tinsilt) qui ne peut croître sur le milieu de culture ISP5 exempt de sel (0 % de NaCl), tout le reste des isolats d'actinobactéries, des trois sites (Ezzemoul, Tinsil et Djendli), le peuvent. Par conséquent, en se basant sur la classification de Kushner et Kamekura, (1988) nous pouvons qualifier l'isolat TF292 d'halophile modéré, car il a été isolé à une concentration de 10 % et tolère jusqu'à 15 % de NaCl. Toutes les autres actinobactéries sont alors des halotolérantes. Parmi ces dernières, trois du site Ezzemoul : EC15, EC13 proches de *Nocardiopsis lucentensis* et ES72 proche de *Rhodococcus corynebacterioides*. Les six isolats du site Tinsilt (TF6, TF5, TS2, TG92, TS31) proches de *Nocardiopsis aegyptica*, l'isolat TJ21 attaché à *Nocardiopsis alba* et une seule du site Djendli DH14 affiliée à *Nocardiopsis aegyptica*, tolèrent jusqu'à 15 % de NaCl. Toutes les autres, tolèrent une concentration inférieure à 10% de sel.

Les températures de 5 et 55 °C, inhibent la croissance de tous les isolats des trois sites d'étude. La température optimale de croissance de tous les isolats, est de 30 °C (celle de l'isolement). Les isolats ED32, EO16 et ES42 assignés à *Nocardiopsis dassonvillei*, *Nocardiopsis lucentensis* et *Streptomyces cavourensis*, respectivement isolés du site Ezzemoul, croissent dans un intervalle de 20 à 37 °C. Seul l'isolat ES72 proche de *Rhodococcus corynebacterioides* peut croître à la température de 45 °C. Les isolats du site Tinsilt TS31 assigné à *Nocardiopsis aegyptica* et TG19 affilié à *Streptomyces xinghaiensis* ainsi que TG10 et TJ3 proches de *Streptomyces iakyrus* et l'isolat DK21 du site Djendli proche de *Streptomyces philanthi*, tolèrent tous des variations de températures de 20 à 45 °C. La plupart des isolats croissent dans la gamme 20-45 °C. Il s'agit donc, d'actinobactéries mésophiles pour la majorité et de thermophiles pour les isolats ES72 (site Ezzemoul), TS31, TJ21, TG19, TG18, TG10, TJ3, TF292 (site Tinsilt) et DK21 (site Djendli), qui peuvent croître à 45°C.

Le pH de 2, ne permet la croissance d'aucuns isolats des trois sites d'étude. Les isolats EO14, EC15, EC13, EO4, EO1, EO10, TF6 et TG29 peuvent être classés comme neutrophiles. Ils n'ont pu se développer que sur le pH du milieu de l'isolement (pH 7-7,4). Cependant, 13,63 % des isolats du site Ezzemoul, 59,73 % du site Tinsilt et 94,11 % du site Djendli sont capables de pousser dans un intervalle de pH important de 4 à 12. Ce sont donc des actinobactéries acido-alkali-tolérantes.

Selon les résultats de la caractérisation physiologique, les souches des trois sites, peuvent tolérer des variations impressionnantes de salinité, de température et de

pH pour leur croissance, ce qui pourrait les rendre très intéressantes dans le domaine de biotechnologie.

4.3. Etude métabolique

Les tests enzymatiques ont été menés essentiellement, pour déterminer la capacité précieuse des actinobactéries, à dégrader une variété de composés organiques, et qui peut être utilisée dans différents domaines d'applications.

Les résultats de l'étude métabolique sont présentés dans les tableaux 29 à 31. Ces derniers montrent qu'aucune actinobactérie des trois sites d'étude, ne produit de pigments mélanoïdes sur le milieu ISP7. Aucune souche également, n'est capable d'hydrolyser la gélatine sur la gélose nutritive additionnée de 0,4 % de gélatine. Il en est de même pour la dégradation des pesticides cypémetrine et glyphosate.

La figure 22 représente un exemple d'activités hydrolytiques et d'action sur lait écrémé de quelques isolats.

L'étude a montré que la plupart des isolats sélectionnés 77,22% et 70,59%, et presque la moitié d'entre eux des sites Ezzemoul, Djendli et Tinsilt, respectivement, produisent de l'amylase. La majorité des souches possèdent une activité cellulolytique avec 77,22%, 84,37% et 88,23% dans les sites Ezzemoul, Tinsilt et Djendli, respectivement.

Tableau 26 : Croissance des isolats d'actinobactéries de la sebkha d'Ezzemoul, à différentes concentrations de NaCl, à différentes valeurs de température et de pH.

Isolats	NaCl (p/v) (%)					Température (°C)						pH					
	0	3	5	10	15	5	20	30	37	45	55	2	4	6	8	10	12
ED46	+++	nd	nd	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	++	++	+++
ED10	+++	nd	nd	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	++	++	+++
ED6	+++	nd	nd	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	++	+	+
ED32	+++	nd	nd	+++	-	-	++	+++	++	-	-	-	-	-	+++	+++	+++
ED14	+++	nd	nd	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+
ED30	+++	nd	nd	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	++	++	+++
ED43	+++	nd	nd	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	+	++	+
ED23	++	nd	nd	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	++	++	+++
EO14	+++	+++	+++	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EC15	+++	nd	+++	+++	+++	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EO12	+++	+++	+++	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
EC13	+++	nd	+++	+++	++	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EO16	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+	+++
EO4	+++	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
EO17	+++	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++	++	+++
EO5	+++	+++	+++	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++
EO6	++	+++	+++	+++	-	-	+	+++	-	-	-	-	-	-	+	+	+++
EO1	+++	+++	+++	+++	-	-	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EO10	++	+++	+++	+++	-	-	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EO3	+++	+++	+++	+++	-	-	+	+++	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++
ES72	+++	nd	+++	+++	+	-	-	+++	++	+	-	-	+++	+++	+++	+++	-
ES42	+++	nd	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	++	+	+	+	+++

(-) Absence de croissance ; (+) Croissance faible ; (++) Croissance modérée ; (+++) Croissance abondante ; (nd) Non déterminée.

Tableau 27: Croissance des isolats d'actinobactéries du chott de Tinsilt, à différentes concentrations de NaCl, à différentes valeurs de température et de pH.

Isolats	NaCl (p/v) (%)					Température (°C)						pH					
	0	3	5	10	15	5	20	30	37	45	55	2	4	6	8	10	12
TF6	+++	nd	nd	+++	+	-	+	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
TF21	+	nd	nd	+++	-	-	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
TF5	+++	nd	nd	+++	+	-	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
TS2	++	nd	nd	nd	++	-	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
TG92	+	nd	+++	+++	+	-	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
TS31	++	nd	nd	nd	++	-	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
TJ21	+++	+++	+++	+++	+	-	-	+++	++	+	-	-	+	++	+++	+++	+++
TG12	+++	nd	+++	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	++	++	+++
TJ15	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	+	+++	+++	+++	+++
TJ13	+++	+++	+++	++	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++
TJ30	+++	+++	+++	++	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	-	+	+	+	+++
TJ12	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++
TG22	+++	nd	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++
TG1	+++	nd	+++	+	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++
TG33	+++	nd	+++	+++	-	-	++	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++	++	+++
TG19	+++	nd	+++	++	-	-	++	+++	+++	+	-	-	-	++	+++	+++	+++
TG18	+++	nd	+++	++	-	-	-	+++	++	+	-	-	-	++	+++	+++	+++

(-) Absence de croissance ; (+) Croissance faible ; (++) Croissance modérée ; (+++) Croissance abondante ; (nd) Non déterminée.

Tableau 27 : Croissance des isolats d'actinobactéries du chott de Tinsilt, à différentes concentrations de NaCl, à différentes valeurs de température et de pH (suite).

Isolats	NaCl (p/v) (%)					Température (°C)						pH					
	0	3	5	10	15	5	20	30	37	45	55	2	4	6	8	10	12
TG20	+++	nd	+++	+++	-	-	-	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
TG26	+++	nd	+++	+++	-	-	++	+++	++	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
TJ4	+++	+++	+++	+++	-	-	++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
TG13	+++	nd	+++	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	++	-	-	-
TG10	+++	nd	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
TG61	+++	nd	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	-	+	+	+++	+++
TJ3	+++	+++	+++	++	-	-	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
TG3	+++	nd	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
TG201	+++	nd	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
TJ27	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
TJ1	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
TG29	+++	nd	+++	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TG30	+++	nd	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
TF292	-	nd	nd	+++	+++	-	-	+++	+++	++	-	-	++	++	+++	+++	++
TG27	+++	nd	+++	++	-	-	+++	+++	++	-	-	-	-	+++	+++	+++	nd

(-) Absence de croissance ; (+) Croissance faible ; (++) Croissance modérée ; (+++) Croissance abondante ; (nd) Non déterminée.

Tableau 28 : Croissance des isolats d'actinobactéries isolées de la sebkha de Djendli, à différentes concentrations de NaCl, à différentes valeurs de température et de pH.

Isolats	NaCl (p/v) (%)					Température (°C)						pH					
	0	3	5	10	15	5	20	30	37	45	55	2	4	6	8	10	12
DH10	+++	nd	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
DH14	+++	nd	+++	+++	+	-	+++	+++	-	-	-	-	-	-	+++	++	+++
DK7	+++	+++	+++	+	-	-	+++	+++	++	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
DK12	+++	+++	+++	+++	-	-	++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
DK16	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	+++		-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
DK13	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
DK14	+++	+++	+++	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
DK17	+++	+++	+++	+	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
DK21	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	+	-	-	-	+	+++	+++	+++
DH24	+++	nd	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
DH12	+++	nd	+++	+++	+	-	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
DH4	+++	nd	+++	+++	-	-	+++	+++	++	-	-	-	+++	++	+++	+++	+++
DH13	+++	nd	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
DH7	+++	nd	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
DK2	+++	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	-	-	-	++	+++	++	++	+++
DK23	+++	nd	+++	+++	-	-	++	+++	+++	-	-	-	++	+++	++	++	+++
DK11	+++	nd	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	++	++	+++

(-) Absence de croissance ; (+) Croissance faible ; (++) Croissance modérée ; (+++) Croissance abondante ; (nd) Non déterminée.

L'hydrolyse de la pectine est observée uniquement chez huit isolats du site Tinsilt : TS2, TG92, TG12, TG33, TG26, TG61, TJ1 et TG30. Quatre isolats du site Djendli DK7, DK12, DK17 et DH4 sont également dotés d'une activité pectinolytique.

L'activité lipolytique par hydrolyse du Tween 80 a été détectée chez 40,90%, 53,12% et 94,11% des isolats d'Ezzemoul, de Tinsil et de Djendli, respectivement. De plus, ils montrent un métabolisme protéique important, car tous les isolats (100% du site Tinsilt) ou presque tous (95,45 et 94,12% du site Ezzemoul et Djendli, respectivement) hydrolysent la caséine. Cependant, seulement 45,45% (site Ezzemoul), 46,87% (site Tinsilt) et 47,05% (site Djendli) ont une action sur le lait écrémé par coagulation ; et aussi 36,36% (site Ezzemoul), 28,12% (site Tinsilt) et 23,52% (site Djendli) sont capables de peptoniser le lait écrémé.

Certaines souches peuvent agir à large spectre en sécrétant plusieurs enzymes à la fois (amylase, cellulase, pectinase, lipase et protéase), nous pouvons citer, dans la sebkha d'Ezzemoul les isolats ED46, ED10, ED6, ED32, ED14, ED30, ED23 et ES42. Dans le chott Tinsilt il s'agit des souches TG92, TG26, TG10, TG61, TJ1 et TG30. Pour la sebkha de Djendli nous pouvons citer DH10, DK12, DK13, DH12, DH4, DH7, DK2, DK23 et DK11.

Dans cette recherche, la majorité des souches productrices d'enzymes extracellulaires hydrolytiques, appartiennent aux genres *Streptomyces* et *Nocardiopsis*. Plusieurs études ont rapporté la production de protéases à partir de ces genres (Wietzorrek et Bibb, 1997). Celles de *Streptomyces* peuvent être utilisées dans le traitement de différents déchets agroalimentaires (Bentley *et al.*, 2002). Les protéases produites par *Nocardiopsis* peuvent être largement utilisées dans l'industrie du cuir, de la boulangerie, du textile, des détergents et du fromage (Gohel et Singh, 2012). Les espèces *Streptomyces exfoliates* et *Nocardiopsis alba* produisent des lipases (Gandhimathi *et al.*, 2009), qui peuvent servir pour le traitement des huiles et des graisses (Ninawe *et al.*, 2006). Les pectinases sont surtout produites par les streptomycètes tels que *Streptomyces lydicus* (Jacob *et al.*, 2008), qui sont exploitées dans l'industrie alimentaires (Janaki *et al.*, 2016). Des cellulases et des amylases utilisées dans l'industrie papetière, de la pharmacie, de la boulangerie et du textile ont été produites par de nombreuses espèces de *Streptomyces* et *Nocardiopsis* (Chakraborty

et al., 2014 ; Bettache *et al.*, 2013 ; Saratale et Oh, 2011 ; El-Sersy *et al.*, 2010 ; Kar et Ray, 2008).

L'isolat ES72 (proche de *Rhodococcus corynebacterioides*, du site Ezzemoul) produit une cellulase et coagule le lait écrémé. Dans la littérature, une souche de *Rhodococcus* UKMP-M5 a été signalée pour sa production de lipase (Nagarajan *et al.*, 2014). Cependant, ce genre est surtout connu pour sa capacité à dégrader une large gamme de polluants grâce aux enzymes qu'il produit (Bell *et al.*, 1998).

L'isolat TF292 (rattaché à *Actinopolyspora erythraea*, du site Tinsilt), génère trois enzymes hydrolytiques (amylase, lipase et protéase). La littérature a rapporté qu'une autre espèce halophile du genre *Actinopolyspora* (*A. halophila*) était capable de synthétiser des enzymes extracellulaires telles que : l' α -amylase, la cellulase, les protéases et une xylanase (Johnson *et al.*, 1986).

La souche TG27 (proche de *Brevibacterium permense*, du site Tinsilt), montre une activité protéasique (elle est caséinase positive et coagule le lait écrémé). D'autres études confirment ce résultat, car la plupart de leurs souches étaient protéolytiques, métabolisant la caséine et coagulaient le lait (Wauters *et al.*, 2003 ; Keddie et Jones, 1981).

Cette partie de l'étude indique que les actinobactéries issues de sebkhas et de chott, possèdent le potentiel de sécréter une large gamme d'enzymes qui peuvent être valorisées par leur utilisation dans le domaine industriel.

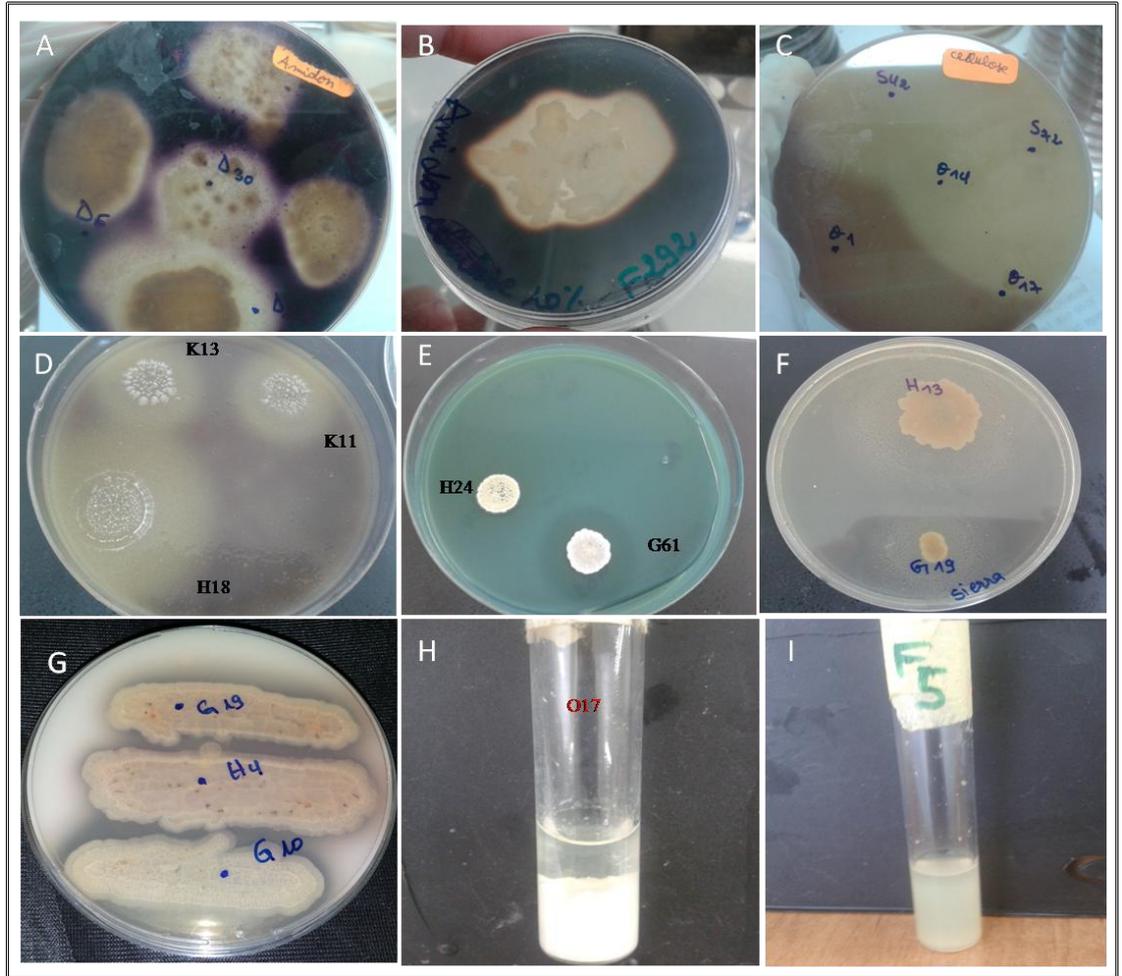


Figure 22: Mise en évidence des activités hydrolytiques et action sur lait écrémé, de quelques isolats. A et B : hydrolyse de l'amidon, C et D : hydrolyse de la cellulose, E : hydrolyse de la pectine, F : hydrolyse du Tween 80, G : hydrolyse de la caséine, H : coagulation du lait écrémé, I : peptonisation du lait écrémé.

Tableau 29 : Biodiversité métabolique des isolats d'actinobactéries de la sebkhia d'Ezzemoul.

Isolats	Pigments mélanoides	Amylase	Cellulase	Pectinase	Hydrolyse du Tween 80	Gélatinase	Caséinase	Coagulation du lait écrémé	Peptonisation du lait écrémé	Dégradation du glyphosate	Dégradation du cypémétrine
ED46	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
ED10	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-
ED6	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
ED32	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
ED14	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
ED30	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
ED43	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-

Tableau 29 : Biodiversité métabolique des isolats d'actinobactéries de la sebka d'Ezzemoul (suite).

Isolats	Pigments mélanoides	Amylase	Cellulase	Pectinase	Hydrolyse du Tween 80	Gélatinase	Caséinase	Coagulation du lait écrémé	Peptonisation du lait écrémé	Dégradation du glyphosate	Dégradation du cypémétrine
ED23	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-
EO14	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-
EC15	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
EO12	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
EC13	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
EO16	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
EO4	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
EO17	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
EO5	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
EO6	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
EO1	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
EO10	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
EO3	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-
ES72	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
ES42	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-

(+) Test positif ; (-) Test négatif.

Tableau 30 : Biodiversité métabolique des isolats d'actinobactéries du chott de Tinsilt.

Isolats	Pigments mélanoides	Amylase	Cellulase	Pectinase	Hydrolyse du Tween 80	Gélatinase	Caséinase	Coagulation du lait écrémé	Peptonisation du lait écrémé	Dégradation du glyphosate	Dégradation du cypémétrine
TF6	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
TF21	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-
TF5	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
TS2	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
TG92	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
TS31	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-
TJ21	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
TG12	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
TJ15	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-
TJ13	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-
TJ30	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
TJ12	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
TG22	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
TG1	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
TG33	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-

Tableau 30 : Biodiversité métabolique des isolats d'actinobactéries du chott de Tinsilt (suite).

Isolats	Pigments mélanoides	Amylase	Cellulase	Pectinase	Hydrolyse du Tween 80	Gélatinase	Caséinase	Coagulation du lait écrémé	Peptonisation du lait écrémé	Dégradation du glyphosate	Dégradation du cypémétrine
TG19	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
TG18	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
TG20	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
TG26	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
TJ4	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-
TG13	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-
TG10	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-
TG61	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
TJ3	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
TG3	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
TG201	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-
TJ27	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-
TJ1	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
TG29	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
TG30	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
TF292	-	+	nd	-	+	-	+	+	-	-	-
TG27	-	-	nd	-	nd	-	+	+	-	-	-

(+) Test positif ; (-) Test négatif, (nd) Non déterminé.

Tableau 31 : Biodiversité métabolique des isolats d'actinobactéries de la sebkhha de Djendli.

Isolats	Pigments mélanoides	Amylase	Cellulase	Pectinase	Hydrolyse du Tween 80	Gélatinase	Caséinase	Coagulation du lait écrémé	Peptonisation du lait écrémé	Dégradation du glyphosate	Dégradation du cypémétrine
DH10	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
DH14	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-
DK7	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
DK12	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
DK16	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
DK13	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
DK14	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
DK17	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
DK21	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-
DH24	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-
DH12	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-
DH4	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-

Tableau 31 : Biodiversité métabolique des isolats d'actinobactéries de la sebkha de Djendli (suite).

Isolats	Pigments mélanoides	Amylase	Cellulase	Pectinase	Hydrolyse du Tween 80	Gélatinase	Caséinase	Coagulation du lait écrémé	Peptonisation du lait écrémé	Dégradation du glyphosate	Dégradation du cypémétine
DH13	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-
DH7	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-
DK2	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
DK23	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
DK11	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-

(+) Test positif ; (-) Test négatif.

4.4. Activité antimicrobienne des isolats d'actinobactéries

L'émergence accrue d'organismes multirésistants rend difficile le traitement de nombreuses maladies infectieuses. Par conséquent, le développement de nouveaux médicaments efficaces contre ces organismes est nécessaire. Pour cela, dans notre étude, nous avons exploré trois écosystèmes inexploités et extrêmes (la sebkha de d'Ezzemoul, le chott Tinsilt et la sebkha de Djendli), qui nous ont permis d'obtenir un nombre important d'actinobactéries, avec une grande probabilité de nouvelles espèces qui peuvent donc produire, de nouveaux composés bioactifs. Ces sebkhas sont caractérisées principalement par leur salinité très élevée, leur pH alcalin et leur taux d'humidité faible.

Récemment, plusieurs chercheurs ont montré le potentiel des habitats extrêmes comme réservoirs de production de composés antimicrobiens prometteurs par les actinobactéries (Shaik *et al.*, 2017; Rashad *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2014).

Sur les 104 isolats d'actinobactéries, 71 ont été sélectionnées. Leur activité contre des bactéries et des champignons pathogènes pour l'homme, a été mise en évidence sur le milieu ISP2 gélosé, par la technique des cylindres d'agar. Plusieurs travaux ont permis de sélectionner ce milieu, ainsi que cette technique comme étant les meilleurs pour la production d'antibiotiques chez les actinomycètes (Gasmi, 2017; Belyagoubi, 2014; Bouras *et al.*, 2013 ; Kitouni, 2007).

Les résultats de ce test sont rassemblés dans les tableaux (32 à 36). La figure 23 représente un exemple de zones d'inhibition formées par la méthode des cylindres

d'agar de quelques souches d'actinobactéries contre les bactéries à coloration de Gram positive et les champignons.

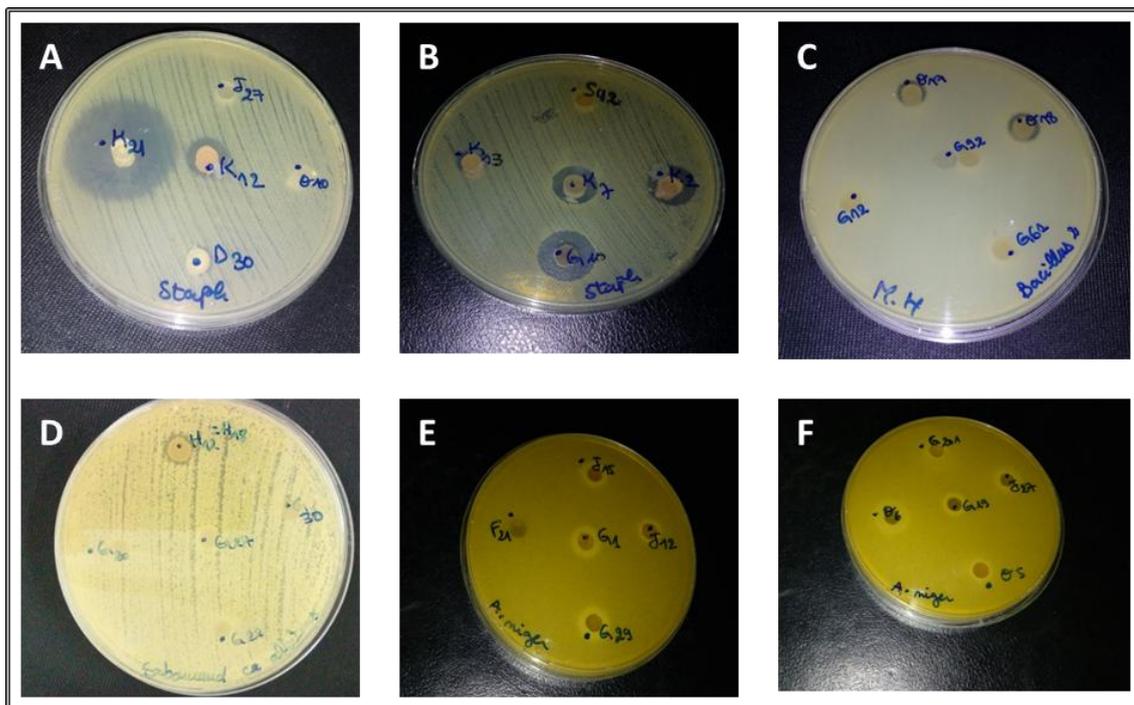


Figure 23 : Test d'activité antimicrobienne de quelques isolats contre : (A et B) *Staphylococcus aureus* ; (C) *Bacillus subtilis* ; (D) *Candida albicans* et (E et F) *Aspergillus niger*.

Tableau 32 : Nombre d'actinobactéries actives provenant de divers sites.

Sites d'étude	Nombre de souches testées	Nombres de souches actives
Ezzemoul	22	12
Tinsilt	32	29
Djendli	17	17

La totalité des actinobactéries testées (100 %) provenant du site Djendli, la majorité (90,62 %) du site Tinsilt et un peu plus que la moitié d'entre elles (54,54 %) du site Ezzemoul, sont actives contre un ou plusieurs germes cibles (tableaux 32, 34, 35 et 36). 9,38 % et 45,46 % des actinobactéries des sites Tinsilt et Ezzemoul respectivement, ne présentent aucune activité antagoniste. Ceci pourrait être due aux conditions et au milieu de culture ; car la nature des composants du milieu de culture peuvent influencer remarquablement la capacité et la quantité de métabolites secondaires produites par les microorganismes (Nakashima *et al.*, 2017). D'après Saker, (2015), il faut réexaminer la capacité des bactéries inactives à produire des métabolites secondaires, en recherchant par PCR, les gènes qui codent pour les PKS (polyketides

synthases) et les NRPS (non-ribosomal peptide synthetases). Si ces gènes existent chez ces bactéries inactives, il faudrait alors optimiser les paramètres culturels, afin de permettre l'expression de ces gènes et ainsi la production de molécules bioactives.

Le nombre de souches d'actinobactéries actives contre chaque microorganisme-test, provenant des trois sites d'étude, sont indiqués dans le tableau 33.

Tableau 33 : Nombre en (%) des isolats d'actinobactéries actives contre chaque microorganisme-cible, provenant des trois sites d'étude.

Sites d'étude	Nombre (%) des actinobactéries actives contre:					
	<i>S. aureus</i> ATCC25923	<i>B. subtilis</i> ATCC6633	<i>E. coli</i> ATCC10231	<i>P. aeruginosa</i> ATCC9027	<i>C. albicans</i> ATCC10231	<i>A. niger</i> CIP1431
Ezzemoul	11 (50)	8 (36,36)	0	0	0	12 (54,54)
Tinsilt	22 (68,75)	14 (43,75)	0	0	3 (9,37)	26 (81,25)
Djendli	15 (88,23)	13 (76,47)	0	0	8 (47,06)	16 (94,12)

Dix (45,45%) isolats d'actinobactéries testées du site Ezzemoul, 23 (71,87%) du site Tinsilt et 15 (88,23%) du site Djendli, montrent une activité antibactérienne contre au moins une des bactéries-tests à Gram positif (*S. aureus* et *B. subtilis*) (tableaux 33, 34, 35 et 36). Dans les trois sites d'étude, aucune actinobactérie ne produit de métabolites ayant une activité inhibitrice contre les bactéries-tests à Gram négatif (*E. coli* et *P. aeruginosa*). Les bactéries-tests à Gram négatif sont beaucoup plus résistantes aux composés antibactériens produits par nos souches. Cette résistance a déjà été notée par d'autres auteurs dans des études similaires à la nôtre (Rabia-Boukhalfa *et al.*, 2017 ; Oskay *et al.*, 2004 ; Pandey *et al.*, 2004). La différence morphologique entre ces deux types de bactéries pourrait être la raison de leur différence de résistance. Effectivement, plusieurs études ont montré que la membrane cellulaire externe chez les bactéries à Gram négatif (membranes doubles) contient de nombreux mécanismes de protection contre les composés toxiques, y compris les antibiotiques (Miller 2016).

Les plus fortes zones d'inhibition de 20, 22, 30 et 32 mm de diamètre ont été observées respectivement, chez les isolats : DH14 (proche de *Nocardiopsis aegyptica*, site Djendli), TG33 (proche de *Streptomyces xantholiticus*, site Tinsilt), DK21 (proche

de *Streptomyces philanthi*, site Djendli) et DK14 (proche de *Streptomyces xantholiticus*, site Djendli) contre *Staphylococcus aureus*.

Concernant le potentiel antifongique, 12 (54,54 %) des isolats testés issus du site Ezzemoul, la majorité de 26 (81,25 %) et de 16 (94,11 %) de ceux provenant des sites Tinsilt et Djendli, respectivement, sont efficaces contre les champignons, et principalement contre la moisissure *Aspergillus niger*. Nos résultats sont supérieurs à ceux évoqués par d'autres auteurs, qui ont rapporté des pourcentages d'activités antifongiques de 22 % et 46,1 % (Meklat *et al.*, 2011 ; Augustine *et al.*, 2005). Aucun isolat du site Ezzemoul n'est actif contre la levure *Candida albicans*. Les trois isolats TG26, TJ4 et TG13 (site Tinsilt) et huit autres : DK21, DH12, DH4, DH13, DH7, DK2, DK23 et DK11 (site Djendli) présentent une activité aussi bien contre la levure que la moisissure.

Les zones maximales d'inhibition de 20 et 22 mm de diamètre, ont été observées chez les isolats DH12 (site Djendli) et TG20 (le site Tinsilt) respectivement. Ils montrent une action significative contre l'espèce *A. niger*. Ces deux isolats font partis du genre *Streptomyces*. La zone d'inhibition la plus faible est de 7 mm de diamètre. Elle a été produite par les isolats des trois sites : ED46, TS2, TG92, TJ4, TG3, TG201, DH10 et DH7 contre les deux champignons.

Parmi les 17 actinobactéries testées provenant de la sebkha de Djendli, sept d'entre elles (nommées DK21, DH4, DH13, DH7, DK2, DK23 et DK11) présentent des activités antimicrobiennes à large spectre contre quatre microorganismes-cibles à la fois (deux bactéries à Gram positif, une levure et un champignon filamenteux). Le tableau 35 montre que les diamètres des zones d'inhibition varient de 7 à 30 mm pour ces actinobactéries, qui appartiennent toutes au genre *Streptomyces*.

Il est remarquable de noter, que presque toutes les souches (du site Djendli) et la plupart de celles du site Tinsilt (77,27 %) sont assignées au genre *Streptomyces*. L'activité est également présente chez la majorité (75 %) des souches de *Nocardiosis* provenant du site Tinsilt et chez les deux isolats DH10 et DH14, du site Djendli. La moitié des souches actives du site Ezzemoul sont affiliées au genre *Nocardiosis* avec un diamètre d'inhibition maximal de 16 mm, observé chez les isolats EC5 (proche de *N. lucentensis*) et EO1 (proche de *N. aegyptica*), contre *Staphylococcus aureus*.

L'isolat ES72 (proche de *Rhodococcus corynebacterioides*, site Ezzemoul) présente une activité assez faible contre la bactérie *S. aureus* et le champignon *A. niger* (avec 8 et 13 mm de diamètre d'inhibition, respectivement), il en est de même pour l'isolat TG27 (proche de *Brevibacterium permense*, site Tinsilt) présentant un diamètre de 8 mm contre seulement, *S. aureus*. La souche TF292 (rattachée à *Actinopolyspora erythraea*, site Tinsilt) montre une activité appréciable (diamètres d'inhibition de 15 et 20 mm) contre les bactéries à Gram positif.

Les membres des streptomycètes sont une source bien connue d'antibiotiques (De Lima Procópio *et al.*, 2012). Valli *et al.*, (2012), ont montré une bonne activité des *Streptomyces* contre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*. De nombreuses espèces de *Streptomyces* sont enregistrées pour sécréter des antibiotiques contre les bactéries et les champignons, même dans des conditions de salinité élevée et de pH alcalin (Basilio *et al.*, 2003). Parmi les métabolites à effet antibactérien (contre les Gram positives) isolés des *Streptomyces*, nous pouvons citer : les « benastatines A et B » (Xu *et al.*, 2007), les « baumycines A1 et A2 » (Komiyama *et al.*, 1977) et les « surugamides A » (octapeptides cycliques, obtenus à partir de *Streptomyces* marin au Japon) (Takada *et al.*, 2013). L'espèce *Streptomyces cavourensis* NA4 (isolée de sédiments marins en Chine), a permis d'isoler de nouveaux antifongiques « bafilomycines B1 et C1 » (Pan *et al.*, 2015).

Les souches de *Nocardiopsis* sont également connues pour leur potentiel à produire des composés antimicrobiens, tels que : le « nocardiopyrone B » (un polycétide isolé de *N. alkaliphila* YIM-80379 et actif contre *S. aureus*, *C. albicans*, *P. aeruginosa* et *E. coli*) (Wang *et al.*, 2013), les « griseusines F et G » (polycétides isolés de *Nocardiopsis* sp. YIM DT266 et actifs contre *S. aureus* et *B. subtilis*) et le dérivé de phénazine N-(2-hydroxyphényl)-2-phénazinamine (isolé de *N. dassonvillei* BM-17 et actif contre *C. albicans*). Des études algériennes réalisées par (Saker 2015; Meklat *et al.*, 2011), sur les actinobactéries des sols sahariens, ont montré une production intéressante d'antibiotiques, étant actifs chez la totalité des isolats du genre *Nocardiopsis* (une activité dirigée contre les bactéries à Gram positif et les champignons).

Certains résultats d'une activité antibactérienne (anti-Gram positif) intéressante du genre *Actinopolyspora* ont été rapportés par (Saker, 2015 ; Meklat *et al.*, 2011).

D'autres auteurs Chen *et al.*, (2014) ont signalé la production de l'érythromycine par l'actinobactérie halophile *A. erytraea*.

Les propriétés antagonistes de *Brevibacterium* sont très rarement mentionnées dans la littérature. Cependant, certaines études, ont signalé la production des antibiotiques linocine A et linenscine OC2 provenant de *Brevibacterium linens*. Ils ont une activité contre des pathogènes d'origine alimentaire (tels que *staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes*) (Valdes-Stauber et Scherer, 1994). L'actinobactérie marine *Brevibacterium aureum* a été utilisée par Kiran *et al.*, (2010), pour la production de biosurfactants.

Les actinobactéries du genre *Rhodococcus*, ont également été considérés comme des producteurs de grandes variétés de métabolites secondaires, y compris des antibiotiques (Borisova 2011). Chiba *et al.*, (1999) ont décrits cinq tétrapeptides cycliques (rhodopeptines C1, C2, C3, C4 et B5), isolés de *Rhodococcus sp.* Mer-N1033, à activité antifongique (contre *C. albicans*) et sans activité antibactérienne. Quatre composés d'aurachines (antibiotiques de type quinoléines) isolés de (*Rhodococcus sp.* Acta 2259), ont des activités inhibitrices contre de nombreuses bactéries Gram positives, telles que *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* et *Propionibacterium acnes* (Nachtigall *et al.* 2010). Lee *et al.*, (2012) ont extrait des dérivés d'indole à partir de *Rhodococcus sp.* BFI 332, qui ont la capacité de réduire la formation de biofilm d'*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*.

Compte tenu des résultats de l'investigation sur l'activité antimicrobienne, nous concluons que les isolats des différents genres d'actinobactéries, provenant des sols hypersalés de sebkhas et de chott (Ezzemoul, Djendli et Tinsilt), semblent être une source prometteuse de métabolites naturels bioactifs, antibactériens (anti-Gram positif) et antifongiques d'intérêt pharmaceutique et médicale. Cependant, des recherches supplémentaires seront nécessaires pour déterminer les structures de ces métabolites.

Tableau 34 : Activité antimicrobienne des isolats d'actinobactéries de la sebka d'Ezzemoul.

Genres	Isolats	Microorganismes-tests					
		<i>S. aureus</i> ATCC25923	<i>B. subtilis</i> ATCC6633	<i>E. coli</i> ATCC10231	<i>P. aeruginosa</i> ATCC9027	<i>C. albicans</i> ATCC10231	<i>A. niger</i> CIP1431
<i>Nocardiosis</i>	ED46	-	-	-	-	-	+ (7)
	ED10	-	-	-	-	-	-
	ED6	-	-	-	-	-	-
	ED32	-	-	-	-	-	-
	ED14	-	-	-	-	-	-
	ED30	-	-	-	-	-	-
	ED43	-	-	-	-	-	-
	ED23	-	-	-	-	-	-
	EO14	+ (14)	+ (12)	-	-	-	+ (09)
	EC15	+ (16)	-	-	-	-	+ (08)
	EO12	+ (10)	+ (12)	-	-	-	+ (11)
	EC13	+ (11)	+ (13)	-	-	-	+ (12)
	EO16	+ (10)	+ (17)	-	-	-	+ (11)
	EO4	+ (09)	+ (15)	-	-	-	+ (10)
	EO17	+ (13)	+ (10)	-	-	-	+ (14)
	EO5	+ (7)	-	-	-	-	+ (08)
	EO6	+ (15)	+ (07)	-	-	-	+ (15)
	EO1	+ (16)	+ (09)	-	-	-	+ (12)
	EO10	-	-	-	-	-	-
	EO3	-	-	-	-	-	-
<i>Rhodococcus</i>	ES72	+ (08)	-	-	-	-	+ (13)
<i>Streptomyces</i>	ES42	-	-	-	-	-	-

(+) Activité positive (diamètre d'inhibition > 06 mm) ; (-) Activité négative (diamètre d'inhibition = 06 mm).

Tableau 35 : Activité antimicrobienne des isolats d'actinobactéries du chott de Tinsilt.

Genres	Isolats	Microorganismes-tests					
		<i>S. aureus</i> ATCC25923	<i>B. subtilis</i> ATCC6633	<i>E. coli</i> ATCC10231	<i>P. aeruginosa</i> ATCC9027	<i>C. albicans</i> ATCC10231	<i>A. niger</i> CIP1431
<i>Nocardioopsis</i>	TF6	+ (12)	+ (09)	-	-	-	+ (10)
	TF21	-	-	-	-	-	-
	TF5	+ (10)	+ (08)	-	-	-	+ (08)
	TS2	+ (11)	+ (07)	-	-	-	+ (07)
	TG92	+ (09)	-	-	-	-	+ (07)
	TS31	+ (11)	+ (10)	-	-	-	+ (10)
	TJ21	+ (10)	-	-	-	-	-
	TG12	-	-	-	-	-	-
<i>Streptomyces</i>	TJ15	+ (14)	+ (08)	-	-	-	+ (10)
	TJ13	+ (11)	+ (07)	-	-	-	+ (09)
	TJ30	+ (13)	+ (07)	-	-	-	+ (12)
	TJ12	+ (13)	+ (07)	-	-	-	+ (09)
	TG22	-	-	-	-	-	+ (11)
	TG1	-	-	-	-	-	+ (12)
	TG33	+ (22)	+ (11)	-	-	-	+ (14)
	TG19	-	-	-	-	-	+ (11)
	TG18	-	-	-	-	-	+ (13)
	TG20	+ (10)	-	-	-	-	+ (22)
	TG26	+ (10)	-	-	-	+ (9)	+ (14)
	TJ4	+ (14)	-	-	-	+ (11)	+ (07)
	TG13	-	+ (09)	-	-	+ (7)	+ (09)
	TG10	+ (16)	+ (07)	-	-	-	+ (12)
	TG61	+ (09)	-	-	-	-	+ (08)
	TJ3	+ (07)	+ (08)	-	-	-	+ (10)
	TG3	-	-	-	-	-	+ (07)
	TG201	+ (08)	-	-	-	-	+ (07)
	TJ27	-	-	-	-	-	+ (13)
	TJ1	+ (09)	-	-	-	-	+ (09)
TG29	+ (13)	+ (07)	-	-	-	+ (11)	
TG30	-	-	-	-	-	-	
<i>Actinopolyspora</i>	TF292	+ (20)	+ (15)	-	-	-	-
<i>Brevibacterium</i>	TG27	+ (08)	-	-	-	-	-

(+) Activité positive (diamètre d'inhibition > 06 mm) ; (-) Activité négative (diamètre d'inhibition = 06 mm).

Tableau 36 : Activité antimicrobienne des isolats d'actinobactéries de la sebkhha de Djendli.

Genres	Isolats	Microorganismes-tests					
		<i>S. aureus</i> ATCC25923	<i>B. subtilis</i> ATCC6633	<i>E. coli</i> ATCC10231	<i>P. aeruginosa</i> ATCC9027	<i>C. albicans</i> ATCC10231	<i>A. niger</i> CIP1431
<i>Nocardiopsis</i>	DH10	+ (14)	+ (12)	-	-	nd	+ (07)
	DH14	+ (20)	+ (17)	-	-	-	+ (09)
<i>Streptomyces</i>	DK7	+ (13)	-	nd	-	-	+ (12)
	DK12	+ (12)	+ (10)	-	-	-	-
	DK16	+ (17)	+ (11)	-	-	-	+ (12)
	DK13	+ (09)	-	-	-	-	+ (08)
	DK14	+ (32)	+ (12)	-	-	-	+ (13)
	DK17	+ (13)	+ (13)	-	-	-	+ (08)
	DK21	+ (30)	+ (19)	-	-	+ (15)	+ (12)
	DH24	-	-	-	-	-	+ (13)
	DH12	-	-	-	-	+ (08)	+ (20)
	DH4	+ (13)	+ (07)	-	-	+ (11)	+ (09)
	DH13	+ (15)	+ (12)	nd	nd	+ (14)	+ (10)
	DH7	+ (08)	+ (07)	-	-	+ (07)	+ (10)
	DK2	+ (14)	+ (09)	-	-	+ (08)	+ (08)
	DK23	+ (14)	+ (10)	-	-	+ (12)	+ (14)
	DK11	+ (08)	+ (13)	-	-	+ (09)	+ (11)

(+) Activité positive (diamètre d'inhibition > 06 mm) ; (-) Activité négative (diamètre d'inhibition = 06 mm), nd : non déterminée.

5. Approche métagénomique par clonage moléculaire

Afin de mieux connaître la diversité des actinobactéries dans les sebkhhas d'Ezzemoul et de Djendli ainsi que du chott Tinsilt, nous nous sommes orientés vers une autre méthode, qui est l'approche métagénomique. Nous avons extrait l'ADN génomique directement du sol, sans passer par une étape de culture. Nous avons choisis de réaliser l'expérience uniquement sur les échantillons E1 (prélevés de la zone de la rhizosphère) de chaque site, car dans la méthode culturale, se sont ces échantillons, qui nous ont permis d'obtenir le plus grand nombre d'actinobactéries. Après purification, nous avons ensuite amplifié l'ADNr 16S des actinobactéries, en utilisant des amorces spécifiques. Les amplicons ainsi produits sont purifiés et ensuite clonés, par une première méthode (M1), à l'aide du kit pGEM-T et pGEM-T Easy Vector (Promega), en utilisant le vecteur pGEM®-T et les cellules chimiques-compétentes

d'*Escherichia.coli* JM109 High Efficiency. Les amplicons sont encore clonés, par une deuxième méthode (M2), grâce au TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Life Technologies), avec les cellules compétentes d'*E. coli* (One Shot® DH5α™-T1^R).

Le but du clonage est d'isoler et de séparer de nombreuses copies identiques d'un fragment de gène d'intérêt (Etienne et Clauser, 2001). Tous les clones ont été sélectionnés et examinés par PCR sur colonie en utilisant les amorces spécifiques aux vecteurs. Les produits PCR obtenus sont purifiés (voir les photos des gels dans l'annexe 6) et séquencés. Les séquences sont analysées par les outils bioinformatiques déjà décrits précédemment, et la présence de séquences chimériques a été vérifiée par le logiciel DECIPHER-FindChimeras. Les chimères sont des séquences d'artefacts formées par deux ou plusieurs séquences biologiques incorrectement jointes. Cela se produit souvent pendant les réactions de PCR en utilisant des matrices mixtes (c'est-à-dire des échantillons environnementaux non cultivés). Des représentations précises de la diversité biologique ne sont pas possibles avec des données contenant des chimères, c'est pour cela qu'elles doivent être éliminées de l'étude.

L'extraction de l'ADN génomique a été effectuée, en premier lieu, selon le protocole de Griffiths *et al.*, (2000) habituellement utilisé pour les sols. Cette méthode est longue à réaliser. Elle ne nous a pas permis d'extraire l'ADN à partir des échantillons de sols salés, alors que dans d'autres recherches telles que celle de Maintinguer *et al.*, (2015), cette méthode a donné de bons résultats sur les sédiments. En deuxième lieu, l'extraction a été réussite en utilisant le Kit FastDNA™ SPIN Kit for soil (MP biomedical). Cette méthode est très rapide et efficace.

L'amplification par le couple d'amorces Act 1159R/Eub 338F (Blackwood *et al.*, 2005) n'a pas réussi. Nous avons donc dû l'abandonner et nous avons continué le travail avec le deuxième couple d'amorces S-C-Act-878-a-A-19/ S-C-Act-235-a-S-20 (Stach *et al.*, 2003) qui a donné un très bon résultat.

5.1. Analyse phylogénétique des clones d'actinobactéries

La première méthode de clonage (M1) (pGEM®-T et pGEM®-T Easy Vector Systems), ne nous a permis d'obtenir que 12 clones à partir des trois sites (5 du site Ezzemoul, 7 du site Djendli et 0 du site Tinsilt). En raison d'un nombre insuffisant de colonies recombinantes, nous avons utilisé une deuxième méthode de clonage (M2) (TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing). Cette dernière nous a permis d'avoir un

nombre de clones plus important, (48) : 37 clones du site Ezzemoul, 11 du site Djendli et toujours 0 pour le site Tinsilt. Aucune des deux précédentes méthodes, n'a donné de résultats pour le site Tinsilt, cela pourrait être dû à un problème dans la réaction de ligation.

Un total de 60 clones a été séquencé et soumis à une analyse phylogénétique, basée sur l'ADNr 16S. vingt et une séquences chimériques ont été retirées de l'étude. Toutes les séquences pourraient être regroupées en sept familles d'actinobactéries : *Demequinaceae*, *Streptomycetaceae*, *Micromonosporaceae*, *Jiangellaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Propionibacteriaceae*, *Nocardioideaceae* ; un groupe d'actinobactéries non classifiées et deux clusters composés de membres n'appartenant pas à la classe *Actinobacteria* (Figure 24).

Tableau 37 : Identification moléculaire et affiliation des clones d'actinobactéries du site Ezzemoul.

Code des clones	Méthode de clonage	Numéros d'accession	Taille en (pb)	Espèce type ou clone les plus proches	Numéros d'accession	Identité (%)
EZ32	M2	MG601200	664	<i>Demequina activa</i> BS-12M(T)	KM591918	95,02
EZ7	M2	MG601185	652			95,48
EZ27	M2	MG601197	649			97,07
EZ9	M2	MG601187	643			97,51
EZ6	M2	MG601182	643			97,67
EZ20	M2	MG601195	644			97,67
EZ33	M2	MG061183	643			97,67
EZ2	M1	MG601205	644			97,67
EZ29	M2	MG601199	644			97,82
EZ12	M2	MG601189	644			97,98
EZ8	M2	MG601186	643			97,98
EZ19	M2	MG601194	646			97,98
EZ55	M2	MG601184	643			97,98
EZ15	M2	MG601190	643			97,98
EZ28	M2	MG601198	643	98,44		
EZ18	M2	MG601193	643	<i>Friedmanniella luteola</i> DSM 21741(T)	LT629749	99,38
				<i>Friedmanniella lacustris</i> EL-17A(T)	AJ132943	
EZ333	M2	MG601201	643	<i>Mycobacterium</i> sp.1274761	LZMC0100 0106	98,76
EZ1	M1	MG601204	652	Clone TX1A_103	FJ152655	97,84
EZ16	M2	MG601191	657			93,16
EZ10	M2	MG601188	657			94,12

Tableau 37 : Identification moléculaire et affiliation des clones d'actinobactéries du site Ezzemoul (suite).

Code des clones	Méthode de clonage	Numéros d'accession	Taille en (pb)	Espèce type ou clone les plus proches	Numéros d'accession	Identité (%)
EZ17	M2	MG601192	640	Clone EK_Ca811	JN038311	99,22
EZ34	M2	MG601202	640			99,06
EZ23	M2	MG601196	641			99,06
EZ35	M2	MG601203	639	Clone ANTLV2_H11	DQ521532	95,77
				Clone TX4CB_71	FJ152940	

Les 24 clones dérivés du sol du site Ezzemoul (EZ) (tableau 37 et figure 24), sont affiliés à des clones non cultivables (20,83%) et aux quatre genres suivants : *Demequina* (dominant avec 62,5%), *Friedmanniella* (4,16%), *Mycobacterium* (4,16%) et *Plantactinospora* avec 12,5% qui correspond aux clones EZ1, EZ10 et EZ16 qui sont apparentés au clone obtenu à partir du sol alcalin salin du lac Texcoco au Mexique (Valenzuela-Encinas *et al.*, 2009). Ces genres appartiennent respectivement aux différentes familles : *Demequinaceae*, *Propionibacteriaceae*, *Micromonosporaceae* et *Mycobacteriaceae*. 16,16% ne font pas partis de la classe des *Actinobacteria* (cluster I et II). Un genre pourrait être défini par des espèces avec une similitude de séquence de 95% (Ludwig *et al.*, 1998).

Le genre *Demequina* a déjà été trouvé, par des méthodes culturales, dans : les environnements marins de la Corée du Sud (Park *et al.*, 2016) et du Japon (Hamada *et al.*, 2013), le sol salé de la mangrove du Japon (Matsumoto *et al.*, 2010), une plante du marais salant du Portugal (Fidalgo *et al.*, 2016) et même dans le permafrost de l'extrême arctique de Norvège (Finster *et al.*, 2009).

Les espèces du genre *Plantactinospora* ont été principalement isolées des plantes de Chine (Guo *et al.*, 2016 ; Ma *et al.*, 2015).

Le genre *Friedmanniella* a été isolé en chine à partir du sol non salé (Zhang *et al.*, 2013a) et de divers habitats dans le monde comme : les plantes (Tuo *et al.*, 2016), la mousse de boue activée (Maszenan *et al.*, 1999), le grès (Schumann *et al.*, 1997), l'air (Kim *et al.*, 2016), l'eau de lac hypersalin (Lawson *et al.*, 2000) ainsi que les araignées et leur toiles (Iwai *et al.*, 2010).

Le genre *Mycobacterium* est connu pour sa pathogénicité chez l'homme et l'animal. Il est surtout isolé de spécimens cliniques (Vasireddy *et al.*, 2016), certains sont isolés du sol et de l'eau (Peeters *et al.*, 2016). L'espèce *M. algericum* a été découverte pour la première fois en Algérie dans les lésions pulmonaires de chèvre (Sahraoui *et al.*, 2011).

Tableau 38 : Identification moléculaire et affiliation des clones d'actinobactéries du site Djendli.

Code des clones	Méthode de clonage	Numéros d'accension	Taille en (pb)	Espèce type ou clone les plus proches	Numéros d'accension	Identité (%)
DJ111	M2	MG601216	644	<i>Streptomyces glaucus</i> LMG 19902(T)	AJ781332	99,22
DJ66	M2	MG601211	643	<i>Marmoricola pocheonensis</i> Gsoil 818(T)	GQ339906	99,38
DJ2	M1	MG601217	644			98,91
DJ55	M2	MG601210	670	<i>Phytoactinopolyspora alkaliphila</i> EGI 80629(T)	KU042078	96,59
DJ77	M2	MG601212	645	Clone MLS76	JX240815	96,43
DJ33	M2	MG601208	640	Clone PS3410	FN667475	98,44
DJ100	M2	MG601215	640			98,44
DJ5	M1	MG601219	641			98,28
DJ3	M1	MG601218	642			97,81
DJ88	M2	MG601213	640	Clone AKIW874	DQ129383	98,59
DJ6	M1	MG601220	640			97,50
DJ44	M2	MG601209	639	Clone SEV1CA041	JQ407953	96,69
DJ99	M2	MG601214	641	Clone delph2C11	FM209170	95,62
DJ22	M2	MG601207	640	Clone 101-29	EF157225	99,53
DJ11	M2	MG601206	642			

Concernant le sol du site Djendli (DJ), et à partir de 15 clones (tableau 38 et figure 24), trois genres ont été détectés : *Marmoricola* (13,33%), *Phytoactinopolyspora* (6,66%) et *Streptomyces* (6,66%). Ils appartiennent respectivement aux familles : *Nocardioideae*, *Jiangellaceae* et *Streptomycetaceae*. Le clone DJ77 (6,66%) est une actinobactérie non classifiée. Ces résultats et en particulier ceux des genres, sont très différents de ceux trouvés dans le site d'Ezzemoul. Contrairement à ce dernier, plus que la moitié des clones (66,66%) du site Djendli n'appartient pas à la classe *Actinobacteria* (cluster I et II). La majorité d'entre eux (73,33%) est reliée à des clones non cultivables.

Le genre *Marmoricola* provient de plusieurs endroits dans le monde, tels que : le sol agricole (comme l'espèce *M. pocheonensis*) et forestier (Lee *et al.*, 2016) ;

Dastager *et al.*, 2008), l'environnement marin (Menezes *et al.*, 2010), le marbre (Urzi *et al.*, 2000) et les cendres volcaniques (Lee *et al.*, 2011).

Le genre *Phytoactinopolyspora* a été découvert récemment en Chine, les espèces connues sont halotolérantes isolées des sols salins (Ji *et al.*, 2017 ; Zhang *et al.*, 2016) et des plantes (Li *et al.*, 2015).

Plusieurs espèces du genre *Streptomyces* ont été détectées par la méthode culturale et une seule par le clonage moléculaire.

Dans leur habitat naturel, la plupart des micro-organismes existent sous forme non cultivable. Il s'agit soit de micro-organismes méconnus qui ne peuvent croître sur les milieux de culture disponibles dans les laboratoires, soit de micro-organismes connus (habituellement cultivables) dans un état de dormance difficilement réversible. Le nombre de cellules cultivables dans le sol représente souvent environ 1% du nombre total de cellules présentes.

Le cluster I représente une classe phylotype qui n'a pas encore de nom valide. Ghai *et al.*, (2013) ont proposé une nouvelle sous classe « *Candidatus Actinomarinidae* » avec l'ordre *Actinomarinales*, regroupant les actinobactéries marines non cultivées à faible GC%. Cependant, cette division n'existe toujours pas dans la classification. Le cluster II représente des membres non classifiés de la famille *Iamiaceae* de la classe *Acidimicrobiia* appartenant au phylum *Actinobacteria* (Norris 2012).

Les membres liés à ces deux clusters ne font pas partis de la classe *Actinobacteria* alors que les amorces utilisées dans cette étude sont censées être spécifiques à cette classe (Stach *et al.*, 2003). Cela pourrait s'expliquer par le manque de spécificité de ces amorces. Ce point a déjà été signalé par (Song *et al.*, 2009), tandis que d'autres chercheurs (Piao *et al.*, 2008) ont constaté l'efficacité de ces amorces.

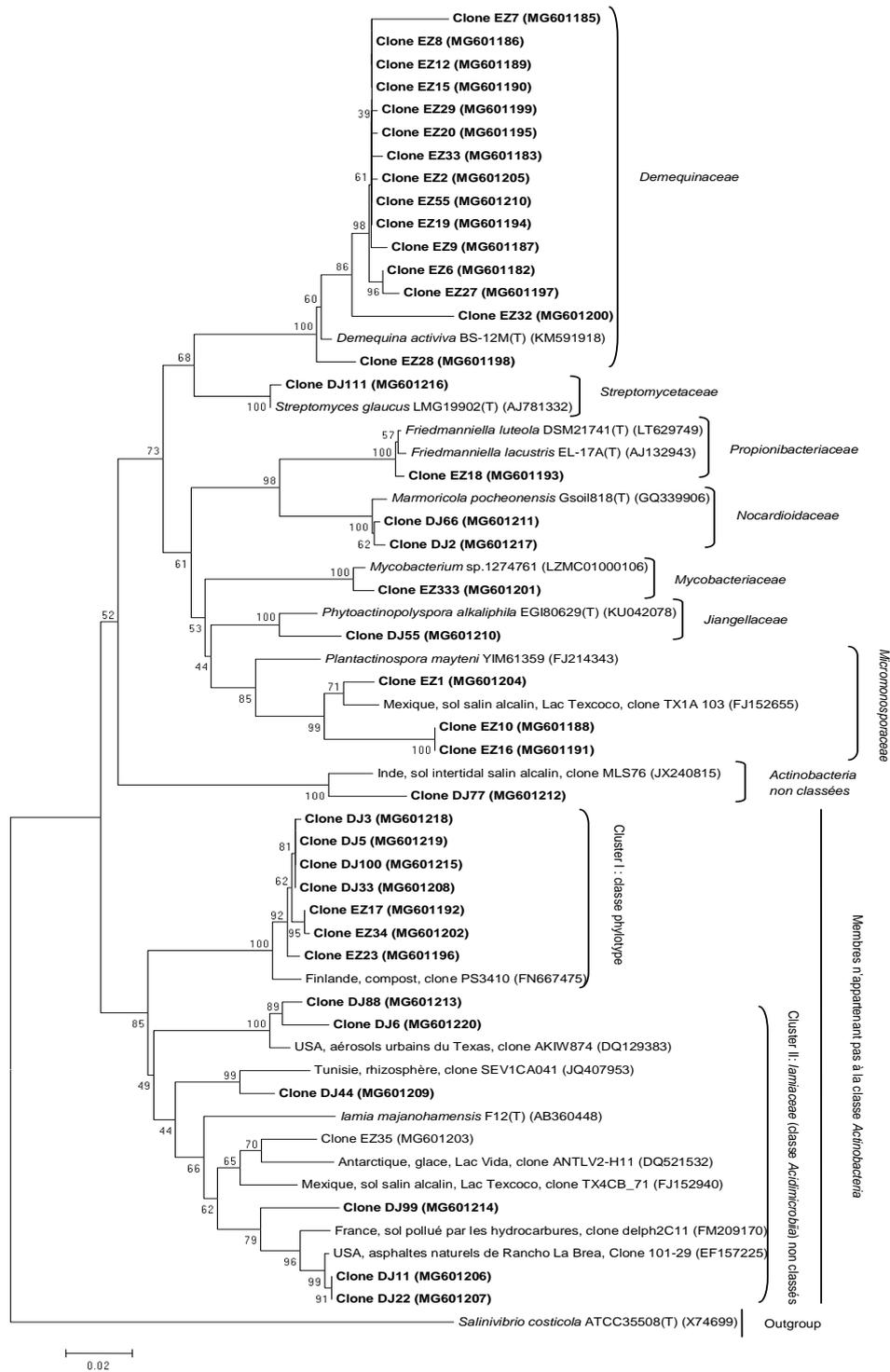


Figure 24 : Arbre phylogénétique enraciné construit par la méthode de Neighbor-Joining, montrant les relations phylogénétiques des séquences du gène ADNr 16S partiel des clones du site Ezzemoul (EZ) et ceux du site Djendli (DJ), avec les séquences les plus proches de la base de données EzBioCloud. Les valeurs de bootstrap supérieures à 50% (pour 1000 répliquions) sont affichées sur les nœuds. M1 et M2 représentent, respectivement la 1^{ère} et la 2^{ème} méthode de clonage. *Salinivibrio costicola* ATCC 35508^T est utilisé comme outgroup. L'échelle 0,02 représente le nombre de substitution par position de nucléotide et estime la divergence des séquences.

6. Comparaison entre la méthode culturale et la méthode non culturale (métagénomique)

Tableau 39 : Genres d'actinobactéries retrouvés dans les sebkhas d'Ezzemoul et de Djendli par la méthode culturale et non culturale.

	Genres d'actinobactéries	
	Méthode culturale	Méthode non culturale
Site Ezzemoul	<i>Nocardiopsis</i>	<i>Demequina</i>
	<i>Streptomyces</i>	<i>Plantactinospora</i>
	<i>Rhodococcus</i>	<i>Friedmanniella</i>
		<i>Mycobacterium</i>
Site Djendli	<i>Nocardiopsis</i>	<i>Marmoricola</i>
	<i>Streptomyces</i>	<i>Phytoactinopolyspora</i>
		<i>Streptomyces</i>

Après analyse de l'ADNr 16S, les résultats obtenus par la méthode culturale (en utilisant le milieu de culture ISP5 complété par quatre concentrations de NaCl) sont nettement différents de ceux obtenus par la méthode non culturale (métagénomique par clonage moléculaire) dans les deux sites d'étude Ezzemoul et Djendli (en faisant abstraction du site Tinsilt, car aucun résultat n'a été obtenu par la méthode non culturale) (tableau 39). Par la méthode indépendante de la culture, nous avons pu confirmer la présence d'autres genres qu'on n'a pas pu isoler par la méthode culturale, dans les deux sites d'étude. À l'exception du genre *Streptomyces* qui a été signalé simultanément par les deux méthodes, dans le site Djendli. En outre, La méthode par clonage moléculaire nous a permis d'observer un grand nombre d'actinobactéries inconnues, qui ne peuvent être isolées du sol et dont les fonctions sont inaccessibles.

Par conséquent, dans cette étude, la méthode culturale est complémentaire de la méthode non culturale, et leur combinaison peut donner une bonne description de la diversité des actinobactéries dans les sols salés de sebkhas. En se basant sur la comparaison des deux méthodes, nos résultats peuvent être en concordance avec ceux d'autres chercheurs (Borsodi *et al.*, 2013; Makhdoumi-Kakhki *et al.*, 2012) qui ont étudié la diversité des bactéries et des archées dans les environnements salins.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'objectif principal de ce travail de thèse était, d'explorer la diversité des actinobactéries halophiles et halotolérantes dans les sols de trois écosystèmes extrêmes : la sebkha d'Ezzemoul, la sebkha de Djendli et le chott de Tinsilt (situés dans le Nord-Est de l'Algérie), en utilisant des méthodes culturales et moléculaires, et notamment la métagénomique par clonage. Pour atteindre cet objectif, plusieurs points ont été élaborés :

Tout d'abord, une étude physico-chimique (Mesure du pH, détermination de la conductivité électrique et de la salinité, pourcentage d'humidité, taux de la matière organique et la granulométrie) des échantillons de sol a été réalisée et a révélé des résultats assez similaires, dans les trois sites d'études. Ces sites étaient alcalins, extrêmement salés, avec des taux faibles d'humidité et de matière organique ainsi que de nature limoneuse-argileuse-sableuse. Une petite différence a été observée dans le site Tinsilt, concernant le taux de matière organique et la texture qui étaient modérés et de type limoneux-argileux, respectivement. Ces caractéristiques du sol ont la capacité de modifier et d'influencer le nombre et la diversité des actinobactéries.

Ensuite, et afin d'élucider la diversité dans les sols des trois écosystèmes étudiés, une approche culturale associée au séquençage de l'ADNr 16S ont été adoptés. Ainsi, en se basant sur le protocole d'isolement choisi, nous avons pu constater que les milieux de culture Olson et ISP5 étaient les meilleurs pour isoler les actinobactéries halophiles. De plus, dans notre cas, les prétraitements thermique et chimique effectués sur les échantillons de sol n'ont pas été très efficaces, et ce en ne favorisant pas la croissance des actinobactéries, lors de leur isolement sur milieu ISP5 additionné de 2 % de NaCl. Nous avons pu obtenir 104 isolats halophiles et/ou halotolérants (42 dans le site Tinsilt, 40 dans le site Ezzemoul et 22 dans le site Djendli) sur le milieu ISP5 additionné de 2, 5, 10 et 15 % de NaCl. L'extraction de l'ADN génomique en utilisant la méthode de lyse cellulaire par choc thermique a été satisfaisante, contrairement à celle de la lyse chimique alcaline qui n'a donné aucun résultat. Après amplification, séquençage et analyse phylogénétique du gène de l'ARN 16S, nous avons pu classer tous ces isolats dans les cinq genres suivants : *Streptomyces* (dominant dans le chott Tinsilt et la sebkha de Djendli), *Nocardiopsis* (dominant dans la sebkha d'Ezzemoul), *Rhodococcus*, *Actinoplyspora* et *Brevibacterium*. Parmi ces genres, beaucoup d'actinobactéries avaient une position taxonomique incertaine et d'autres pourraient fortement représenter de nouvelles espèces. La variation des concentrations de NaCl

ajoutées au milieu de culture ISP5, a hautement contribué à la diversification des genres et des espèces trouvés dans ces sols.

En Outre, parmi tous nos isolats, 71 ont été sélectionnés pour des études macroscopiques, physiologiques et métaboliques, pour une meilleure caractérisation. De façon générale, les souches sélectionnées présentaient des aspects connus et propres aux actinobactéries sur les milieux ISP5 et ISP2, sauf pour l'isolat proche de *Rhodococcus corynebacterioides* qui n'adhérait pas à la gélose et qui ne sporulait pas. À l'exception de la souche TF292 rattachée à *Actinopolyspora erythraea* qui était halophile modérée, toutes les autres étaient halotolérantes et certaines d'entre elles toléraient jusqu'à 15% de NaCl. La plupart des souches (87,32%) étaient mésophiles, d'autres (12,68%) étaient thermophiles et la majorité d'entre elles (69,01%) étaient acido-alcali-tolérantes avec certaines souches (11,27%) neutrophiles. Plusieurs isolats d'actinobactéries avaient la capacité d'hydrolyser une variété de polymères, en produisant les enzymes extracellulaires suivantes : la cellulase (83,1%), l'amylase (61,97%), la lipase (60,56%) et les protéases (principalement la caséinase avec 97,18%). Quelques isolats (16,90%) des sites Tinsilt et Djendli produisaient la pectinase. De nombreux isolats fournissent également des métabolites biactifs contre les bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus* avec 67,6% et *Bacillus subtilis* avec 49,29%), et contre les champignons (*Candida albicans* avec 15,49% et *Aspergillus niger* avec 76,06%). Nos souches peuvent donc, tolérer des variations extraordinaires de salinité, de température et de pH pour leur croissance, en plus d'avoir un pouvoir de production impressionnant de molécules diverses. Elles peuvent par conséquent, être valorisées par leur utilisation dans différentes industries.

Dans un deuxième temps, une approche indépendante de la culture qui est la métagénomique par clonage moléculaire a été effectuée, pour mieux connaître la diversité des actinobactéries et notamment celles qui sont incultivables, dans les sols des sebkhas et chott étudiés. L'extraction du métagénome à partir de ces sols, en utilisant le kit FastDNA™ SPIN Kit for soil (MP biomedical), a donné de bons résultats par rapport à celle de (Griffiths *et al.*, 2000), qui était sans succès. Après amplification de l'ADNr 16S des actinobactéries par des amorces spécifiques, nous avons réalisé le clonage en utilisant deux méthodes, la M1 (pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems) et la M2 (TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing). Ces dernières n'ont pas donné de résultats dans le sol du chott Tinsilt, probablement à cause de certains biais de

la technique de clonage. A partir des sols des sebkhas d'Ezzemoul et de Djendli, un total de 60 clones a été séquencé et soumis à une analyse phylogénétique, parmi lesquelles 21 séquences chimériques ont été éliminées. Toutes les séquences restantes pourraient être rassemblées en sept genres : *Demequina*, *Friedmanniella*, *Mycobacterium*, *Plantactinospora*, *Marmoricola*, *Phytoactinopolyspora* et *Streptomyces* ; un groupe d'actinobactéries non classifiées et deux clusters constitués de membres qui n'appartiennent pas à la classe *Actinobacteria*, parmi lesquels se trouvent de nombreux incultivables.

La méthode culturale et l'analyse de l'ADNr 16S, nous a permis d'accéder à une partie de la diversité des sols des trois sites (Ezzemoul, Djendli et Tinsilt), et de construire une collection de souches halophiles et halotolérantes. Ces actinobactéries avaient la capacité de produire des molécules possédant des activités antimicrobiennes, en plus de la sécrétion d'enzymes extracellulaires hydrolytiques, très intéressantes pour de futures applications biotechnologiques dans les domaines pharmaceutique, médicale et industriel.

La métagénomique par le clonage du gène de l'ADNr 16S nous a donné l'occasion de concevoir une banque de clones des deux sites Ezzemoul et Djendli. Elle nous a renseigné sur un autre aspect de la diversité dans ces sites, qui est assez différent et complémentaire de celui de l'approche culturale.

En plus de la diversité florale et faunistique rapportée par la littérature dans les trois zones humides étudiées (le chott Tinsilt, les sebkhas d'Ezzemoul et de Djendli), et celle de certains microorganismes halophiles tels que les archéobactéries dans le site Ezzemoul, nos données primaires ont également indiqués une riche diversité phylogénétique, physiologique et métabolique concernant les actinobactéries halotolérantes et halophiles dans les sols de ces mêmes sites. Cependant, nous estimons que ce travail mérite d'être poursuivi par d'autres investigations et ainsi plusieurs perspectives peuvent être envisagées :

- ✓ Affirmer la position taxonomique exacte des souches incertaines et confirmer leur appartenance à de nouvelles espèces par l'hybridation ADN/ADN et/ou le séquençage de plusieurs gènes de ménage tels que : *rpoA*, *rpoB*, *lepA*, *ftsZ*, *gyrB*, *recA*...etc.

- ✓ Optimiser des conditions de cultures pour la production des enzymes extracellulaires, et ensuite les purifier et les caractériser.
- ✓ Extraire, purifier et caractériser les molécules bioactives des souches qui représentent une activité antimicrobienne, et particulièrement de celles qui agissent à large spectre, en employant différentes analyses chimiques, telles que les techniques : HPLC-MS (chromatographie en phase liquide à haute performance-spectrométrie de masse), FTIR (spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier) et RMN (spectroscopie à résonance magnétique nucléaire).
- ✓ Compléter les données sur la biodiversité des actinobactéries dans les sites étudiés, par l'utilisation d'autres techniques d'isolement et notamment d'autres milieux de cultures, ainsi que l'application du pyroséquençage qui permet d'obtenir des milliers de séquences à partir de l'ADN métagénome ; et l'analyse de ces dernières par des logiciels de bioinformatiques et de statistiques performants (comme MOTHUR).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aberkane M (2014) Ecologie de la Sarcelle marbrée *Marmaronetta angustirostris* dans les zones humides de l'Est algérien. Thèse de Doctorat Biologie Animale, Diversité, Evolution et Ecologie de la Santé, Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie
- Adjal M, Mouici S (2004b) Cartographie de la végétation et écoéthologie des Tadornes de Belon *Tadorna tadorna* dans la sebkha de Djendli. Mémoire d'Ingénieur d'Etat, Université de Batna, Algérie
- Alain K, Querellou J (2009) Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges. *Extremophiles* 13:583–594
- Aliat T, Kaabeche M, Khomri H, *et al* (2016) A Pedological Characterisation of Some Inland Wetlands and Ramsar Sites in Algeria. *Land Degrad Dev* 27:693–705. <https://doi.org/10.1002/ldr.2467>
- Al-Mueini R, Al-Dalali M, Al-Amri IS, Patzelt H (2007) Hydrocarbon degradation at high salinity by a novel extremely halophilic actinomycete. *Environ Chem* 4:5–7
- Altschul SF, Gish W, Miller W, *et al* (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410
- Al-Zarban SS, Al-Musallam AA, Abbas I, *et al* (2002) *Saccharomonospora halophila* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from marsh soil in Kuwait. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:555–558
- Asolkar RN, Kirkland TN, Jensen PR, Fenical W (2010) Arenimycin, an antibiotic effective against rifampin- and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. *J Antibiot (Tokyo)* 63:37–39. <https://doi.org/10.1038/ja.2009.114>
- Aubert G (1976) Les sols sodiques en Afrique du Nord. *Ann L'Institut Natl Agron - El Harrach Alger* 7:185–196
- Aubert G (1978) Méthodes d'analyses des sols, Centre Régional de Documentation Pédologique. Marseilles
- Augustine SK, Bhavsar SP, Kapadnis BP (2005) A non-polyene antifungal antibiotic from *Streptomyces albidoflavus* PU 23. *J Biosci* 30:201–211
- Baker GC, Smith JJ, Cowan DA (2003) Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Methods* 55:541–555. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.08.009>
- Balla A (2012) Synthèse écologique sur les zones humides algériennes d'importance internationale "Sites Ramsar." Mémoire d'Ingénieur d'Etat, Université de Batna, Algérie

- Barakate M, Ouhdouch Y, Oufdou KH, Beaulieu C (2002) Characterization of rhizospheric soil Streptomyces from Moroccan habitats and their antimicrobial activities. *World J Microb Biotechnol* 18:49–54
- Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, *et al* (2016) Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 80:1–43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15>
- Barnaud G (1998) Conservation des zones humides : concepts et méthodes appliqués à leur caractérisation. Collection Patrimoines naturels, 34, Paris, France, SPN/IEGB/MNHN.
- Basilio A, González I, Vicente MF, *et al* (2003) Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. *J Appl Microbiol* 95:814–823. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02049.x>
- Bastide A, De Méo M, Andriantsoa M, *et al* (1986) Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques de structure non-polyénique. *MIRCEN J Appl Microbiol Biotechnol* 2:453–466
- Baussand J, Carbone A (2006) Métagénomique bactérienne et virale. *Technique et Sciences Informatiques*
- Bedford BL, Walbridge MR, Aldous A (1999) Patterns in Nutrient Availability and Plant Diversity of Temperate North American Wetlands. *Ecology* 80:2151–2169. <https://doi.org/10.2307/176900>
- Bell, Philp, Aw, Christofi (1998) The genus *Rhodococcus*. *J Appl Microbiol* 85:195–210. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00525.x>
- Bellagoune S (2015) Hivernage du Tadorne de Belon *Tadorna tadorna* (Anatidés) dans la sebkha de Djendli (Batna, Est algérien). Thèse de Doctorat Biologie Animale., Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie
- Belyagoubi L (2014) Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels algériens. Thèse de Doctorat Biologie, Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen, Algérie
- Bennur T, Ravi Kumar A, Zinjarde SS, Javdekar V (2016) *Nocardioopsis* species: a potential source of bioactive compounds. *J Appl Microbiol* 120:1–16. <https://doi.org/10.1111/jam.12950>
- Bentley SD, Chater KF, Cerdeño-Tárraga A-M, *et al* (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417:141–147. <https://doi.org/10.1038/417141a>
- Berdoulay M (2008) Analyses physico-chimiques et microbiologique de façades en pierre exposées aux embruns marins du Golfe de Gascogne. Thèse de Doctorat Ecologie Microbienne, Université de Pau et des Pays de l'Adour, France

- Bertrand J-C, Caumette P, Lebaron P, *et al* (2012) *Écologie microbienne: microbiologie des milieux naturels et anthropisés*. Presses universitaires de Pau et des Pays de l'Adour, Pau, France
- Bettache A, Messiss A, Copinet E, *et al* (2013) Optimization and partial characterization of endoglucanase produced by *Streptomyces* sp. B-PNG23. *Arch Biol Sci* 65:549–558. <https://doi.org/10.2298/ABS1302549A>
- Blackwood CB, Oaks A, Buyer JS (2005a) Phylum- and Class-Specific PCR Primers for General Microbial Community Analysis. *Appl Environ Microbiol* 71:6193–6198. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.10.6193-6198.2005>
- Boisset S (2008) Outils diagnostiques moléculaires. Laboratoire de Bactériologie, Centre de Biologie et de Pathologie Est, Lyon, France
- Borisova RB (2011) Isolation of a *Rhodococcus* Soil Bacterium that Produces a Strong Antibacterial Compound. Master of Science in Biology, East Tennessee State University, USA
- Borsodi AK, Felföldi T, Máthé I, *et al* (2013) Phylogenetic diversity of bacterial and archaeal communities inhabiting the saline Lake Red located in Sovata, Romania. *Extremophiles* 17:87–98. <https://doi.org/10.1007/s00792-012-0496-2>
- Boughachiche F, Rachedi K, Duran R, *et al* (2016) Optimization of alkaline protease production by *Streptomyces* sp. strain isolated from saltpan environment. *Afr J Biotechnol* 15:1401–1412
- Boumezbeur M, Khalfallah y (2005) Fiche descriptive sur les zones humides Ramsar (FDR). Chott Tinsilt
- Bouras N, Atika M, Omrane T, *et al* (2013) Bioactive potential of a new strain of *Streptomyces* sp. PP14 isolated from Canadian soil. *Afr J Microbiol Res* 7:3199–3208. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.767>
- Breed RS (1953) The *Brevibacteriaceae* fam. nov. of order *Eubacteriales*. *Rias Commun VI Congr Int Microbiol Roma* 1:13–14
- Bursy J, Kuhlmann AU, Pittelkow M, *et al* (2008) Synthesis and Uptake of the Compatible Solutes Ectoine and 5-Hydroxyectoine by *Streptomyces coelicolor* A3(2) in Response to Salt and Heat Stresses. *Appl Environ Microbiol* 74:7286–7296. <https://doi.org/10.1128/AEM.00768-08>
- Cai M, Tang S-K, Chen Y-G, *et al* (2009a) *Streptomonospora amylolytica* sp. nov. and *Streptomonospora flavalba* sp. nov., two novel halophilic actinomycetes isolated from a salt lake. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:2471–2475. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.007682-0>
- Cai Y, Xue Q, Chen Z, Zhang R (2009b) Classification and salt-tolerance of actinomycetes in the Qinghai lake water and lakeside saline soil. *J Sustain Dev* 2:107–110

- Calcott PH, Postgate JR (1972) On substrate-accelerated death in *Klebsiella aerogenes*. *Microbiology* 70:115–122
- Cavalla M, Eberlin T (1994) Isolement des streptomycètes du sol. L'opéron XIX:13–17
- Chakraborty S, Jana S, Gandhi A, *et al* (2014) Gellan gum micro-spheres containing a novel alpha-amylase from marine *Nocardiopsis* sp. strain B2 for immobilization. 70:292–9. *Int J Biol Macromol* 70:292–9
- Chaphalkar SR, Dey S (1996) Computer assisted identification of *Streptomyces* species with high extra-cellular protease activity. *Actinomycetes* 7:47–54
- Chen D, Feng J, Huang L, *et al* (2014) Identification and Characterization of a New Erythromycin Biosynthetic Gene Cluster in *Actinopolyspora erythraea* YIM90600, a Novel Erythronolide-Producing Halophilic Actinomycete Isolated from Salt Field. *PLoS ONE* 9: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108129>
- Chen K, Pachter L (2005) Bioinformatics for whole-genome shotgun sequencing of microbial communities. *PLoS Comput Biol* 1:e24. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0010024>
- Chen Y-G, Tang S-K, Zhang Y-Q, *et al* (2009a) *Arthrobacter halodurans* sp. nov., a new halotolerant bacterium isolated from sea water. *Antonie Van Leeuwenhoek* 96:63–70. <https://doi.org/10.1007/s10482-009-9336-5>
- Chen Y-G, Tang S-K, Zhang Y-Q, *et al* (2010) *Zhihengliuella salsuginis* sp. nov., a moderately halophilic actinobacterium from a subterranean brine. *Extremophiles* 14:397–402. <https://doi.org/10.1007/s00792-010-0317-4>
- Chen Y-G, Wang Y-X, Zhang Y-Q, *et al* (2009b) *Nocardiopsis litoralis* sp. nov., a halophilic marine actinomycete isolated from a sea anemone. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:2708–2713. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.009704-0>
- Chenchouni H (2009) Place des argiles dans la caractérisation écopédologique du Chott de Djendli (Batna, Algérie) et mise en évidence de la relation salinité-répartition des halophytes. In: *Proceedings of the 3rd Maghreb Symposium on Clays 'SMA*. pp 23–25
- Chiba H, Agematu H, Kaneto R, *et al* (1999) I. Taxonomy, Fermentation, Isolation, Physico-chemical Properties. *J Antibiot (Tokyo)* 52:695–699
- Chun J, Seong C-N, Bae KS, *et al* (1998) *Nocardia flavorosea* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 48:901–905. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-3-901>
- Collins MD, Lawson PA, Labrenz M, *et al* (2002) *Nesterenkonia lacusekhoensis* sp. nov., isolated from hypersaline Ekho Lake, East Antarctica, and emended description of the genus *Nesterenkonia*. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:1145–1150. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-4-1145>
- Corre E (2000) Approches moléculaires de la diversité microbienne de deux environnements extrêmes: les sources hydrothermales profondes et les réservoirs

- pétroliers. Thèse de Doctorat Microbiologie, Université de Bretagne Occidentale, France
- Cross T, Goodfellow M (1973) Taxonomy and classification of the actinomycetes. Soc Appl Bacteriol Symp Ser 2:11–112
- Daniel R (2005) The metagenomics of soil. Nat Rev Microbiol 3:470–478. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1160>
- DasSarma S, Arora P (2001) Halophiles. In: Encyclopedia of life sciences (pp. 1–9). London: Nature Publishing Group
- Dastager SG, Lee J-C, Ju Y-J, *et al* (2008) *Marmoricola bigeumensis* sp. nov., a member of the family *Nocardioideaceae*. Int J Syst Evol Microbiol 58:1060–1063. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65576-0>
- De Lima Procópio RE, da Silva IR, Martins MK, *et al* (2012) Antibiotics produced by *Streptomyces*. Braz J Infect Dis 16:466–471. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.08.014>
- Demnati F, Samraoui B, Allache F, *et al* (2017) A literature review of Algerian salt lakes: values, threats and implications. Environ Earth Sci 76:. <https://doi.org/10.1007/s12665-017-6443-x>
- Djaballah CE (2010) Biodiversité des actinomycètes halophiles et halotolérants isolés de la sebkha de Ain M'lila. Mémoire de Magister Microbiologie, Université Mentouri Constantine, Algérie
- Djaballah CE, Kitouni M, Raoult D, Khelaifia S (2018) “ *Streptomyces massialgeriensis* ” sp. nov., a new bacterial species isolated from an extremely saline soil collected from the dry lake of Ank el Djamel in Algeria. New Microbes New Infect 21:18–19. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2017.10.003>
- Dobzhansky T, Hecht MK, Steere W (1968) On some fundamental concepts of evolutionary biology. Evol Biol 2:1–34
- Dodia MS, Joshi RH, Patel RK, Singh SP (2006) Characterization and stability of extracellular alkaline proteases from halophilic and alkaliphilic bacteria isolated from saline habitat of coastal Gujarat, India. Braz J Microbiol 37:276–282
- Dubost D (2002) Ecologie, aménagement et développement agricole des oasis algériennes. CRSTRA, Biskra
- Dupain R, Lanchon R, Saint-Arroman JC (2000) Granulats, sols, ciments et bétons: caractérisation des matériaux de génie civil par les essais de laboratoire. Paris: Casteilla
- Ebihara H, Takada A, Kobasa D, *et al* (2006) Molecular Determinants of Ebola Virus Virulence in Mice. PLOS Pathog 2:e73. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020073>

- El Fahime E, Ennaji MM (2007) Évolution des techniques de séquençage. *Technol Lab* 2:4–12
- El-Sersy NA, Abd-Elnaby H, Abou-Elela GM, *et al* (2010) Optimization, economization and characterization of cellulase produced by marine *Streptomyces ruber*. *Afr J Biotechnol* 9:6355–6364
- Empadinhas N, Mendes V, Simões C, *et al* (2007) Organic solutes in *Rubrobacter xylanophilus*: the first example of di-myo-inositol-phosphate in a thermophile. *Extremophiles* 11:667–673. <https://doi.org/10.1007/s00792-007-0084-z>
- Essghaier B, Rouaissi M, Boudabous A, *et al* (2010) Production and partial characterization of chitinase from a halotolerant *Planococcus rifitoensis* strain M2-26. *World J Microbiol Biotechnol* 26:977–984
- Eswaran H, Rice T, Ahrens R, Stewart BA (2002) Soil classification: a global desk reference. Boca Raton: CRC Press
- Etienne J, Clauser E (2001) Principaux outils de la biologie moléculaire. In: Biochimie génétique-Biologie moléculaire, 7^{ème} Ed. Paris: Masson
- Fathepure BZ (2014) Recent studies in microbial degradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments. *Front Microbiol* 5:173
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783–791
- Fidalgo C, Henriques I, Rocha J, *et al* (2016) Culturable endophytic bacteria from the salt marsh plant *Halimione portulacoides*: phylogenetic diversity, functional characterization, and influence of metal(loid) contamination. *Environ Sci Pollut Res* 23:10200–10214. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6208-1>
- Finster KW, Herbert RA, Kjeldsen KU, *et al* (2009) *Demequina lutea* sp. nov., isolated from a high Arctic permafrost soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:649–653. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.004929-0>
- Florea N, Al-Joumaa K (1998) Genesis and classification of gypsiferous soils of the Middle Euphrates Floodplain, Syria. *Geoderma* 87:67–85
- Fu P, Yang C, Wang Y, *et al* (2012) Streptocarbazoles A and B, two novel indolocarbazoles from the marine-derived actinomycete strain *Streptomyces* sp. FMA. *Org Lett* 14:2422–2425
- Gad AH (2017) Phylogenetic Diversity and Anti-MRSA Activity of Halotolerant Actinobacteria from sediments in Great Salt Plains, Oklahoma. <https://doi.org/10.1101/112649>
- Gagnard J, Hugué C, Ryser J-P (1988) L'analyse du sol et du végétal dans la conduite de la fertilisation. Le contrôle de la qualité des fruits
- Gandhimathi R, Seghal Kiran G, Hema TA, *et al* (2009) Production and characterization of lipopeptide biosurfactant by a sponge-associated marine

- actinomycetes *Nocardiopsis alba* MSA10. *Bioprocess Biosyst Eng* 32:825–835. <https://doi.org/10.1007/s00449-009-0309-x>
- Gao B, Gupa RS (2005) Conserved indels in protein sequences that are characteristic of the phylum Actinobacteria. *International J Syst Evol Microbiol* 55:2401–2412. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63785-0>
- Gao X, Lu Y, Xing Y, *et al* (2012) A novel anticancer and antifungus phenazine derivative from a marine actinomycete BM-17. *Microbiol Res* 167:616–622
- Garrity GM, Holt JG (2001) The road map to the manual. In: C Boone (Ed) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2^{ème} Ed (pp. 119–155). New York:Springer
- Gasmi M (2017) Isolement, identification et criblage d'actinomycètes à activité chitinolytique à partir du sol de la région de Laghouat. Optimisation de la production de chitinase par *Streptomyces griseorubens* C9 par la méthode des surfaces de réponse. Thèse de doctorat en Biotechnologies et biochimie, Université des Frères Mentouri Constantine, Algérie
- Gasmi M, Kitouni M (2017) Optimization of chitinase production by a new *Streptomyces griseorubens* C9 isolate using response surface methodology. *Ann Microbiol* 67:175–183. <https://doi.org/10.1007/s13213-016-1249-8>
- Geraldine MS, Klaus PS (1981) A Numerical Taxonomic Study of Members of the *Actinomycetaceae* and Related Taxa. *Microbiology* 127:237–259. <https://doi.org/10.1099/00221287-127-2-237>
- Ghai R, Mizuno CM, Picazo A, *et al* (2013) Metagenomics uncovers a new group of low GC and ultra-small marine Actinobacteria. *Sci Rep* 3:2471. <https://doi.org/10.1038/srep02471>
- Gobat J-M, Aragno M, Matthey W (2010) La vie en action. In: *Le sol vivant : Bases de pédologie-Biologie des sols*, 3^{ème} Ed (pp. 87–162). Suisse:Presses polytechniques et universitaires romandes
- Gochnauer MB, Leppard GG, Komaratat P, *et al* (1975) Isolation and characterization of *Actinopolyspora halophila*, gen. et sp. nov., an extremely halophilic actinomycete. *Can J Microbiol* 21:1500–1511. <https://doi.org/10.1139/m75-222>
- Gohel SD, Singh SP (2012) Purification strategies, characteristics and thermodynamic analysis of a highly thermostable alkaline protease from a salt-tolerant alkaliphilic actinomycete, *Nocardiopsis alba* OK-5. *J Chromatogr B* 889–890:61–68. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.01.031>
- Goodfellow M (2015) Actinobacteria phyl. nov. In: WB Whitman, F Rainey, P Kämpfer, *et al.* (Eds), *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1–2). Chichester, UK:John Wiley & Sons
- Gordon RE, Smith MM (1953) RAPIDLY GROWING, ACID FAST BACTERIA I.: Species' Descriptions of *Mycobacterium phlei* and *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* 66:41

- Griffiths RI, Whiteley AS, O'Donnell AG, Bailey MJ (2000) Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA-and rRNA-based microbial community composition. *Appl Environ Microbiol* 66:5488–5491
- Grkovic T, Abdelmohsen UR, Othman EM, *et al* (2014) Two new antioxidant actinosporin analogues from the calcium alginate beads culture of sponge-associated *Actinokineospora* sp. strain EG49. *Bioorg Med Chem Lett* 24:5089–5092
- Guan T-W, Wu N, Xia Z-F, *et al* (2011) *Saccharopolyspora lacisalsi* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from a salt lake in Xinjiang, China. *Extremophiles* 15:373. <https://doi.org/10.1007/s00792-011-0369-0>
- Guan T-W, Xia Z-F, Tang S-K, *et al* (2012) *Amycolatopsis salitolerans* sp. nov., a filamentous actinomycete isolated from a hypersaline habitat. *Int J Syst Evol Microbiol* 62:23–27
- Guo X, Guan X, Liu C, *et al* (2016) *Plantactinosporasoyae* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from soybean root [*Glycine max* (L.) Merr]. *Int J Syst Evol Microbiol* 66:2578–2584. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001088>
- Hamada M, Tamura T, Yamamura H, *et al* (2013) *Demequina flava* sp. nov. and *Demequina sediminicola* sp. nov., isolated from sea sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:249–253. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.039297-0>
- Hamdy A (1999) Saline irrigation and management for a sustainable use. In: advanced short course on saline irrigation proceeding. Agadir. 152-227
- Hamedi J, Mohammadipanah F, Panahi HKS (2015) Biotechnological Exploitation of Actinobacterial Members. In: DK Maheshwari, M Saraf (Eds.), *Halophiles, Sustainable Development and Biodiversity* (p 70). Switzerland:Springer International Publishing
- Hamedi J, Mohammadipanah F, Ventosa A (2013) Systematic and biotechnological aspects of halophilic and halotolerant actinomycetes. *Extremophiles* 17:1–13. <https://doi.org/10.1007/s00792-012-0493-5>
- Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, *et al* (1998) Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem Biol* 5:R245–R249
- Harir M, Bellahcene M, Fortas Z, *et al* (2017) Isolation and Characterization of Actinobacteria from Algerian Sahara Soils with Antimicrobial Activities. *Int J Mol Cell Med* 6:109–120. <https://doi.org/10.22088/acadpub.BUMS.6.2.5>
- Hillis DM, Bull JJ (1993) An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst Biol* 42:182–192
- Hocinat A, Boudemagh A (2015) Biodegradation of commercial Ortiva fungicide by isolated actinomycetes from the activated sludge. *Desalination Water Treat* 57:6091–6097. <https://doi.org/10.1080/19443994.2015.1022799>

- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, *et al* (1994) Bergey's manual of determinative bacteriology, 9^{ème} Ed. Baltimore: Williams and Wilkins
- Houhamdi M, Maazi MC, Seddik S, *et al* (2009) Statut et écologie de l'Érismature à tête blanche (*Oxyura leucocephala*) dans les hauts plateaux de l'Est de l'Algérie. *Aves* 46:129–148
- Hozzein WN (2015) Biodiversity of Halophilic and Halotolerant Actinobacteria. In:DK Maheshwari, M Saraf (Eds.), *Halophiles, Sustainable Development and Biodiversity* (pp. 1–28). Switzerland:Springer International Publishing
- Imada C, Simidu U (1988) Isolation and characterization of an alpha-amylase inhibitor producing actinomycete from marine environment. *Nippon Suisan Gakkaishi* 54:1839–1845
- Iwai K, Aisaka K, Suzuki M (2010) *Friedmanniella luteola* sp. nov., *Friedmanniella lucida* sp. nov., *Friedmanniella okinawensis* sp. nov. and *Friedmanniella sagamiharensis* sp. nov., isolated from spiders. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:113–120. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.007815-0>
- Jacob N, Ashapoorna C, Prema P (2008a) Purification and partial characterization of polygalacturonase from *Streptomyces lydicus*. *Bioresour Technol* 99:6697–6701. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.10.002>
- Jacob N, Niladevi KN, Anisha GS, Prema P (2008b) Hydrolysis of pectin: An enzymatic approach and its application in banana fiber processing. *Microbiol Res* 163:538–544. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.07.016>
- Janaki T, Nayak B, Ganesan T (2016) Antifungal activity of soil actinomycetes from the mangrove *Avicennia marina*. 4:05–08
- Jellison R, Williams WD, Timms B, *et al* (2008) Salt lakes: values, threats and future. In: Polunin NVC (Eds.), *Aquatic ecosystems: trends and global perspectives* (pp. 94–110). Cambridge:Cambridge University Press
- Ji Y, Chunyu W-X, Li E-Y, *et al* (2017) *Phytoactinopolyspora halotolerans* sp. nov., a halotolerant actinobacterium isolated from a saline soil in Xinjiang, northwest of China. *Antonie Van Leeuwenhoek* 111:27–34. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0923-6>
- Johnson KG, Lanthier PH, Gochnauer MB (1986a) Studies of two strains of *Actinopolyspora halophila*, an extremely halophilic actinomycete. *Arch Microbiol* 143:370–378. <https://doi.org/10.1007/BF00412805>
- Jose PA, Jebakumar SRD (2013) Phylogenetic appraisal of antagonistic, slow growing actinomycetes isolated from hypersaline inland solar salterns at Sambhar salt Lake, India. *Front Microbiol* 4:190. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00190>
- Kar S, Ray RC (2008) Statistical Optimization of alpha-Amylase Production by *Streptomyces erumpens* MTCC 7317 Cells in Calcium Alginate Beads Using Response Surface Methodology. *Pol J Microbiol* 57:49–57

- Kämpfer P (2010) Actinobacteria. Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology Part 19
- Kanekar PP, Kanekar SP, Kelkar AS, Dhakephalkar PK (2012) Halophiles—Taxonomy, diversity, physiology and applications. In: T Satyanarayana, BN Johri, A Prakash (Eds.), Microorganisms in environmental management: microbes and environment. Dordrecht: Springer
- Keddie RM, Jones D (1981) The genus *Brochothrix* (formerly *Microbacterium thermosphactum*, McLean and Sulzbacher). In: The Prokaryotes: a Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria (edited by Starr, Stolp, Trüper, Balows and Schlegel). New York: Springer
- Kemp PF, Aller JY (2004) Estimating prokaryotic diversity: when are 16S rDNA libraries large enough? *Limnol Oceanogr Methods* 2:114–125
- Kharroub K (2007) Identification et étude moléculaire des bactéries et des archéobactéries aérobies halophiles de la sebkha Ezzemoul (Ain M'Lila). Thèse de Doctorat Microbiologie et Biologie Moléculaire, Université Mentouri, Constantine, Algérie
- Khopade A, Ren B, Liu X-Y, *et al* (2012) Production and characterization of biosurfactant from marine *Streptomyces* species B3. *J Colloid Interface Sci* 367:311–318
- Kim SB, Nedashkovskaya OI, Mikhailov VV, *et al* (2004) *Kocuria marina* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from marine sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:1617–1620. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.02742-0>
- Kim S-J, Hamada M, Ahn J-H, *et al* (2016) *Friedmanniella aerolata* sp. nov., isolated from air. *Int J Syst Evol Microbiol* 66:1970–1975. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000973>
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:111–120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>
- Kiran GS, Thomas TA, Selvin J, *et al* (2010) Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in solid state culture. *Bioresour Technol* 101:2389–2396. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.023>
- Kitouni M (2007) Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse de Doctorat Microbiologie Appliquée, Université de Mentouri-Constantine, Algérie
- Kitouni M, Boudemagh A, Oulmi L, *et al* (2005) Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north-east of Algeria. *J Mycol Médicale Journal Med Mycol* 15:45–51

- Komiyama T, Matsuzawa Y, Oki T, *et al* (1977) Baumycins, new antitumor antibiotics related to daunomycin. *J Antibiot* 30:619–621
- Kowalchuk GA, Bodelier PL, Heilig GHJ, *et al* (1998) Community analysis of ammonia-oxidising bacteria, in relation to oxygen availability in soils and root-oxygenated sediments, using PCR, DGGE and oligonucleotide probe hybridisation. *FEMS Microbiol Ecol* 27:339–350
- Kushner D, Kamekura M (1988) Physiology of halophilic eubacteria. In: F Rodriguez-Valera (Eds.), *Halophilic bacteria*, vol 1. Boca Raton: CRC Press
- Ladjal M (1995) Le chott Tinsilt : Contribution à l'étude du milieu et approche bioécologique de son avifaune. Mémoire d'Ingénieur d'Etat, Université de Batna, Algérie
- Lahoum A, Verheecke-Vaessen C, Bouras N, *et al* (2017) Taxonomy of mycelial actinobacteria isolated from Saharan soils and their efficiency to reduce aflatoxin B1 content in a solid-based medium. *Ann Microbiol* 67:231–237. <https://doi.org/10.1007/s13213-017-1253-7>
- Lane DJ (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: E Stackebrandt, M Goodfellow, (Eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. New York: John Wiley and Sons
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, *et al* (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947–2948. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>
- Larpen JP, Larpen-Gourgaud M (1970) *Microbiologie pratique*. Paris: Hermann
- Lawson PA, Collins MD, Schumann P, *et al* (2000) New LL-diaminopimelic acid-containing actinomycetes from hypersaline, heliothermal and meromictic Antarctic Ekho Lake: *Nocardioides aquaticus* sp. nov. and *Friedmanniella* [correction of *Friedmanniella*] *lacustris* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* 23:219–229
- Lechevalier HA, Lechevalier MP (1965) Classification des actinomycètes aérobies basée sur leur morphologie et leur composition chimique. *Ann Inst Pasteur* 108:662–673
- Lee H, Lee S-A, Lee I-K, *et al* (2010) *Mycobacterium paraterrae* sp. nov. recovered from a clinical specimen: novel chromogenic slow growing mycobacteria related to *Mycobacterium terrae* complex. *Microbiol Immunol* 54:46–53. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2009.00184.x>
- Lee J-G, Yoo I-D, Kim W-G (2007) Differential antiviral activity of benzastatin C and its dechlorinated derivative from *Streptomyces nitrosporeus*. *Biol Pharm Bull* 30:795–797
- Lee J-H, Kim Y-G, Kim C-J, *et al* (2012) Indole-3-acetaldehyde from *Rhodococcus* sp. BFI 332 inhibits *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formation. *Appl Microbiol Biotechnol* 96:1071–1078. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-3881-y>

- Lee JY, Hwang BK (2002) Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Can J Microbiol* 48:407–417. <https://doi.org/10.1139/w02-025>
- Lee SD, Lee DW, Ko Y-H (2011) *Marmoricola korecus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:1628–1631. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.025460-0>
- Lee S-Y, Im W-T, Kang M-S, *et al* (2016) *Marmoricola ginsengisoli* sp. nov. and *Marmoricola pocheonensis* sp. nov. isolated from a ginseng-cultivating field. *Int J Syst Evol Microbiol* 66:1996–2001. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000977>
- Legendre L, Legendre P (1984) *Ecologie numérique : le traitement multiple des données écologiques*, 2^{ème} Ed. Paris: Masson
- Lemriss S, Laurent F, Couble A, *et al* (2003) Screening of nonpolyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes. *Can J Microbiol* 49:669–674. <https://doi.org/10.1139/w03-088>
- Li L, Ma J-B, Abdalla Mohamad O, *et al* (2015) *Phytoactinopolyspora endophytica* gen. nov., sp. nov., a halotolerant filamentous actinomycete isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* F. *Int J Syst Evol Microbiol* 65:2671–2677. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000322>
- Locci R, Schaal KP (1980) Apical growth in facultative anaerobic actinomycetes as determined by immunofluorescent labeling. *Zentralbl Bakteriol A* 246:112–118
- Ludwig W, Klenk H-P (2005) Overview: A Phylogenetic Backbone and Taxonomic Framework for Prokaryotic Systematics. In: DJ Brenner, NR Krieg, JR Staley, G Garrity (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology, The proteobacteria, Part A, Introductory essays, vol 2*, 2^{ème} Ed (pp. 49–65). New York: Springer
- Ludwig W, Strunk O, Klugbauer S, *et al* (1998) Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis* 19:554–568
- Lv ZhT, Zhang LP, Li Y, *et al* (2006) Biodiversity of halophilic actinomycetes of Cangzhou salty environments. , 26(1):1-6. *J Hebei Univ Nat Sci Ed* 26:1–6
- Ma Z, Liu C, Fan J, *et al* (2015) *Plantactinospora sonchi* sp. nov., an actinobacterium isolated from the leaves of common sowthistle (*Sonchus oleraceus* L.). *Int J Syst Evol Microbiol* 65:4895–4901. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000668>
- Maazi MC (2009) *Eco-éthologie des Anatidés hivernants dans l'étang de Timerganine (Ain Zitoune, Wilaya d'Oum El-Bouaghi)*. Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar, Algérie
- Maheshwari DK, Saraf M (2015) *Halophiles: Sustainable Development and Biodiversity*. Switzerland: Springer International Publishing
- Maintinguer SI, Sakamoto IK, T. Adorno MA, A. Varesche MB (2015) Bacterial diversity from environmental sample applied to bio-hydrogen production. *Int J Hydrog Energy* 40:3180–3190. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.12.118>

- Makhdoumi-Kakhki A, Amoozegar MA, Kazemi B, *et al* (2012) Prokaryotic Diversity in Aran-Bidgol Salt Lake, the Largest Hypersaline Playa in Iran. *Microbes Environ* 27:87–93. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME11267>
- Maloney KN, MacMillan JB, Kauffman CA, *et al* (2009) Lodopyridone, a structurally unprecedented alkaloid from a marine actinomycete. *Org Lett* 11:5422–5424
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1992) *Molecular Cloning*. CSH press
- Maskey RP, Helmke E, Kayser O, *et al* (2004) Anti-cancer and antibacterial trioxacarcins with high anti-malaria activity from a marine streptomycete and their absolute stereochemistry. *J Antibiot (Tokyo)* 57:771–779
- Maskey RP, Li FC, Qin S, *et al* (2003) Chandrananimycins A-C: Production of Novel Anticancer Antibiotics from a Marine *Actinomadura* sp. Isolate M048 by Variation of Medium Composition and Growth Conditions. *J Antibiot (Tokyo)* 56:622–629. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.56.622>
- Maszenan AM, Seviour RJ, Patel BK, *et al* (1999) *Friedmanniella spumicola* sp. nov. and *Friedmanniella capsulata* sp. nov. from activated sludge foam: gram-positive cocci that grow in aggregates of repeating groups of cocci. *Int J Syst Bacteriol* 49 Pt 4:1667–1680. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-4-1667>
- Matsumoto A, Nakai K, Morisaki K, *et al* (2010) *Demequina salsinemoris* sp. nov., isolated on agar media supplemented with ascorbic acid or rutin. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:1206–1209. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.012617-0>
- Mead DA, Pey NK, Herrnstadt C, *et al* (1991) A universal method for the direct cloning of PCR amplified nucleic acid. *Nat Biotechnol* 9:657
- Meklat A, Bouras N, Zitouni A, *et al* (2013a) *Actinopolyspora mزابensis* sp. nov., a halophilic actinomycete isolated from an Algerian Saharan soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:3787–3792. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.046649-0>
- Meklat A, Bouras N, Zitouni A, *et al* (2013b) *Actinopolyspora righensis* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from Saharan soil in Algeria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 104:301–307. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-9948-7>
- Meklat A, Sabaou N, Zitouni A, *et al* (2011) Isolation, Taxonomy, and Antagonistic Properties of Halophilic Actinomycetes in Saharan Soils of Algeria. *Appl Environ Microbiol* 77:6710–6714. <https://doi.org/10.1128/AEM.00326-11>
- Menezes CBA, Bonugli-Santos RC, Miqueletto PB, *et al* (2010) Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. *Microbiol Res* 165:466–482. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2009.09.005>
- Messaoui S, Besouli C (2004) Cartographie de la végétation et écologie de l'avifaune aquatique du chott Tinsilt. Mémoire d'Ingénieur d'Etat, Université de Batna, Algérie
- Meyer J (1976) *Nocardiopsis*, a New Genus of the Order Actinomycetales. 26:487–493

- Miller DN (2001) Evaluation of gel filtration resins for the removal of PCR-inhibitory substances from soils and sediments. *J Microbiol Methods* 44:49–58. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00228-1](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00228-1)
- Miller SI (2016) Antibiotic Resistance and Regulation of the Gram-Negative Bacterial Outer Membrane Barrier by Host Innate Immune Molecules. *mBio* 7:e01541-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01541-16>
- Moali A, Remichi Z (2009) Fiche descriptive sur les zones humides Ramsar (FDR). version 2006-2008. Sebket Ezzemoul
- Mukamolova GV, Kaprelyants AS, Young DI, *et al* (1998) A bacterial cytokine. *Proc Natl Acad Sci* 95:8916–8921
- Mukhtar S, Ishaq A, Hassan S, *et al* (2017) Comparison of microbial communities associated with halophyte (*Salsola stocksii*) and non-halophyte (*Triticum aestivum*) using culture-independent approaches. *Pol J Microbiol* 66:353–364
- Mwirichia R, Muigai AW, Tindall B, *et al* (2010) Isolation and characterisation of bacteria from the haloalkaline Lake Elmenteita, Kenya. *Extremophiles* 14:339–348. <https://doi.org/10.1007/s00792-010-0311-x>
- Nachtigall J, Schneider K, Nicholson G, *et al* (2010) Two new aurachins from *Rhodococcus* sp. *Acta 2259. J Antibiot (Tokyo)* 63:567–569. <https://doi.org/10.1038/ja.2010.79>
- Nagarajan J, Nawawi N, Ibrahim A (2014) *Rhodococcus* UKMP-5M, an endogenous lipase producing actinomycete from Peninsular Malaysia. *Biologia (Bratisl)* 69:123–132. <https://doi.org/10.2478/s11756-013-0308-x>
- Naikpatil SV, Rathod JL (2011) Selective isolation and antimicrobial activity of rare actinomycetes from mangrove sediment of Karwar. *J Ecobiotechnology* 3:48–53
- Nakashima T, Takahashi Y, Ōmura S (2017) Search for new compounds from Kitasato microbial library by physicochemical screening. *Biochem Pharmacol* 134:42–55. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.09.026>
- Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini MT, *et al* (2017) Microbial diversity and soil functions. *Eur J Soil Sci* 68:12–26. https://doi.org/10.1111/ejss.4_12398
- Neffar S, Chenchouni H, Si Bachir A (2016) Floristic composition and analysis of spontaneous vegetation of Sabkha Djendli in north-east Algeria. *Plant Biosyst - Int J Deal Asp Plant Biol* 150:396–403. <https://doi.org/10.1080/11263504.2013.810181>
- Nicolas M (2012) Métagénomique : différences fondamentales avec la génomique. In: *Bioinfo-Frnet*. <https://bioinfo-fr.net/metagenomique-differences-fondamentales-avec-la-genomique>. Consulté le 30 juillet 2018
- Niladevi KN, Prema P (2005) Mangrove actinomycetes as the source of ligninolytic enzymes. *Actinomycetologica* 19:40–47

- Ninawe S, Lal R, Kuhad RC (2006) Isolation of Three Xylanase-Producing Strains of Actinomycetes and Their Identification Using Molecular Methods. *Curr Microbiol* 53:178–182. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-0285-6>
- Ningthoujam DS, Kshetri P, Sanasam S, Nimaichand S (2009) Screening, identification of best producers and optimization of extracellular proteases from moderately halophilic alkalithermotolerant indigenous actinomycetes. *World Appl Sci J* 7:907–916
- Norris PR (2012) Class *Acidimicrobiia*. In: M Goodfellow, P Kämpfer, HJ Busse, ME Trujillo, K Suzuki, W Ludwig, WB Whitman (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2^{ème} Ed (pp.1968-1969). New York: Springer
- Okoro CK, Brown R, Jones A, *et al* (2009) Diversity of culturable actinomycetes in hyper-arid soils of the Atacama Desert, Chile. *Antonie Van Leeuwenhoek* 95:121–133. <https://doi.org/10.1007/s10482-008-9295-2>
- Oskay M, Tamer AU, Azeri C, *et al* (2004) International Conference on the Great Himalayas: Climate, Health, Ecology, Management and Conservation, Kathmandu, Organized by Kathmandu University and the Aquatic Ecosystem Health and Management Society, Canada. *Afr J Biotechnol* 3:441–446
- Oulmi L, Gorlas A, Gimenez G, *et al* (2012) Draft genome sequence of *Tsukamurella* sp. strain 1534. *J Bacteriol* 194:5482
- Pace NR, Stahl DA, Lane DJ, Olsen GJ (1985) Analyzing natural microbial populations by rRNA sequences. *ASM News* 51:4–12
- Pan H-Q, Yu S-Y, Song C-F, *et al* (2015) Identification and Characterization of the Antifungal Substances of a Novel *Streptomyces cavourensis* NA4. *J Microbiol Biotechnol* 25:353–357. <https://doi.org/10.4014/jmb.1407.07025>
- Pandey B, Ghimire P, Agrawal VP (2004) International Conference on the Great Himalayas: Climate, Health, Ecology, Management and Conservation, Kathmandu, Organized by Kathmandu University and the Aquatic Ecosystem Health and Management Society, Canada.
- Park S, Jung YT, Won SM, Yoon JH (2016) *Demequina litorisediminis* sp. nov., isolated from a tidal flat, and emended description of the genus *Demequina*. *Int J Syst Evol Microbiol* 66:4197–4203. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001335>
- Pastor JM, Salvador M, Argandoña M, *et al* (2010) Ectoines in cell stress protection: Uses and biotechnological production. *Biotechnol Adv* 28:782–801. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.06.005>
- Peeters C, Depoorter E, Praet J, Vandamme P (2016) Extensive cultivation of soil and water samples yields various pathogens in patients with cystic fibrosis but not Burkholderia multivorans. *J Cyst Fibros* 15:769–775. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2016.02.014>
- Pham VHT, Kim J (2012) Cultivation of unculturable soil bacteria. *Trends Biotechnol* 30:475–484. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.05.007>

- Philip JC, Bamforth SM, Singleton I, Atlas RM (2005) Environmental pollution and restoration: a role for bioremediation. In: RM Atlas, J Philip (Eds.), *Bioremediation: Applied Microbial Solutions for Real World Environmental Cleanup* (pp. 1–48). Washington: DC: ASM Press
- Piao Z, Yang L, Zhao L, Yin S (2008) Actinobacterial Community Structure in Soils Receiving Long-Term Organic and Inorganic Amendments. *Appl Environ Microbiol* 74:526–530. <https://doi.org/10.1128/AEM.00843-07>
- Pochon J, Tardieux P (1962) *Techniques d'analyse en microbiologie du sol*
- Prescott LM, Harley JP, Klein DA, *et al* (2010) La diversité du monde microbien, Les bactéries: les Gram-positives riches en GC. In: *Microbiologie*, 3^{ème} Ed (pp. 589–591). Bruxelles: De Boeck Supérieur
- Prieur D (2014) *Les bactéries de l'extrême*, 1ère Ed. De Boeck Supérieur
- Queipo-Ortuño MI, Colmenero JDD, Macias M, *et al* (2008) Preparation of Bacterial DNA Template by Boiling and Effect of Immunoglobulin G as an Inhibitor in Real-Time PCR for Serum Samples from Patients with Brucellosis. *Clinical and Vaccine Immunology* 15:293–296. <https://doi.org/doi:10.1128/CVI.00270-07>
- Rabia-Boukhalfa YH, Eveno Y, Karama S, *et al* (2017) Isolation, purification and chemical characterization of a new angucyclinone compound produced by a new halotolerant *Nocardiosis* sp. HR-4 strain. *World J Microbiol Biotechnol* 33:126. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2292-8>
- Rambukkana A (2001) *M. leprae* genome sequence. *Trends Microbiol* 9:157. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02021-2](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02021-2)
- Ramsar (1994) *Convention relative aux zones humides d'importance internationale particulièrement comme habitats des oiseaux d'eau*
- Ramsar (2006) *Le manuel de la convention de Ramsar: Guide de la convention sur les zones humides (Ramsar, Iran, 1971)*, 4^{ème} édition. Secrétariat de la Convention de Ramsar, Gland, Suisse
- Ramsar (2017) *The List of Wetlands of International Importance*
- Rashad FM, Fathy HM, El-Zayat AS, Elghonaimy AM (2015) Isolation and characterization of multifunctional *Streptomyces* species with antimicrobial, nematicidal and phytohormone activities from marine environments in Egypt. *Microbiol Res* 175:34–47. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.03.002>
- Raveh A, Delekta PC, Dobry CJ, *et al* (2013) Discovery of Potent Broad Spectrum Antivirals Derived from Marine Actinobacteria. *PLoS ONE* 8:e82318. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082318>
- Rebuffat S, Zirah S (2018) Biodiversité et EDD: Biodiversité et rôles des bactéries du sol. <http://edu.mnhn.fr/mod/page/view.php?id=1269>. Consulté le 8 Juillet 2018

- Reller LB, Weinstein MP, Petti CA (2007) Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clin Infect Dis* 44:1108–1114
- Remya M, Vijayakumar R (2008) Isolation and characterization of marine antagonistic actinomycetes from west coast of India. *Med Biol* 15:13–19
- Rengasamy P (2006) World salinization with emphasis on Australia. *Journal of Experimental Botany*. 57:1017–1023. <https://doi.org/DOI:10.1093/jxb/erj108>.
- Renner MK, Shen Y-C, Cheng X-C, *et al* (1999) Cyclomarins A–C, New Antiinflammatory Cyclic Peptides Produced by a Marine Bacterium (*Streptomyces* sp.). *J Am Chem Soc* 121:11273–11276. <https://doi.org/10.1021/ja992482o>
- Richards LA (1954) Diagnostic and improvement of saline and alkaline soils. U.S Department of agriculture, Washington D.C
- Roberts MF (2005) Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Syst* 1:5. <https://doi.org/10.1186/1746-1448-1-5>
- Rosen M (1994) The importance of groundwater in playas: a review of playa classifications and the sedimentology and hydrology of playas. *Geol Soc Am Spec Pap* 289:1–18. <https://doi.org/10.1130/SPE289>
- Roux KH (1995) Optimization and troubleshooting in PCR. In : CW Dieffenbach, G S Dveksler (Eds.), *PCR Primer: a Laboratory Manual*. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sabree ZL, Rondon MR, Handelsman J (2009) Metagenomics. In: *Encyclopedia of Microbiology*, 3^{ème} Ed (pp.622–632). Oxford: Elsevier
- Sahraoui N, Ballif M, Zelleg S, *et al* (2011) *Mycobacterium algericum* sp. nov., a novel rapidly growing species related to the *Mycobacterium terrae* complex and associated with goat lung lesions. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:1870–1874. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.024851-0>
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Saker R (2015) Recherche de nouveaux taxons d'actinobactéries halophiles des sols sahariens et potentialités antagonistes. Thèse de doctorat Microbiologie, Université Ferhat Abbas Sétif 1, Algérie
- Saker R, Bouras N, Meklat A, *et al* (2015a) *Prauserella isguenensis* sp. nov., a halophilic actinomycete isolated from desert soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 65:1598–1603. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000145>
- Saker R, Bouras N, Meklat A, *et al* (2015b) *Actinopolyspora biskrensis* sp. nov., a Novel Halophilic Actinomycete Isolated from Northern Sahara. *Curr Microbiol* 70:423–428. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0740-3>

- Saker R, Bouras N, Zitouni A, *et al* (2014) *Mzabimyces algeriensis* gen. nov., sp. nov., a halophilic filamentous actinobacterium isolated from a Saharan soil, and proposal of Mzabimycetaceae fam. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek* 106:1021–1030. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0271-8>
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 74:5463–5467
- Saratale GD, Oh SE (2011) Production of thermotolerant and alkalotolerant cellulolytic enzymes by isolated *Nocardiopsis* sp. KNU. *Biodegradation* 22:905–919. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9450-0>
- Saulnier O (2015) Le clonage moléculaire. http://ol.saulnier.free.fr/espace_travail/clonage.html. Consulté le 8 Août 2018
- Schmidt TM, DeLong EF, Pace NR (1991) Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *J Bacteriol* 173:4371–4378
- Schumann P, Prauser H, Rainey FA, *et al* (1997) *Friedmanniella antarctica* gen. nov., sp. nov., an LL-diaminopimelic acid-containing actinomycete from Antarctic sandstone. *Int J Syst Bacteriol* 47:278–283. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-2-278>
- Shafiei M, Ziaee A-A, Amoozegar MA (2011) Purification and characterization of an organic-solvent-tolerant halophilic α -amylase from the moderately halophilic *Nesterenkonia* sp. strain F. *J Ind Microbiol Biotechnol* 38:275–281
- Shaik M, Sankar GG, Iswarya M, Rajitha P (2017) Isolation and characterization of bioactive metabolites producing marine *Streptomyces parvulus* strain sankarensis-A10. *J Genet Eng Biotechnol* 15:87–94. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.02.004>
- Shearer MC (1997) Methods for the isolation of non-streptomycetes actinomycetes. *J. Ind. Microbiol.* (1997) 28: 91-98. *J Ind Microbiol* 28:
- Shirling EB, Gottlieb D (1966) Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol* 16:313–340
- Shivanand P, Mugeraya G, Kumar A (2013) Utilization of renewable agricultural residues for the production of extracellular halostable cellulase from newly isolated *Halomonas* sp. strain PS47. *Ann Microbiol* 63:1257–1263
- Siegwald L (2017) Solutions d'amélioration des études de métagénomique ciblée. Thèse de doctorat Génétique, génomique, bioinformatique, Université du Droit et de la Santé- Lille II, France
- Sierra G (1957) A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie Van Leeuwenhoek* 23:15–22. <https://doi.org/10.1007/BF02545855>

- Singh LS, Sharma H, Talukdar NC (2014) Production of potent antimicrobial agent by actinomycete, *Streptomyces sannanensis* strain SU118 isolated from phoomdi in Loktak Lake of Manipur, India. *BMC Microbiol* 14:278. <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0278-3>
- Singleton P (1999) *Bacteria in biology, biotechnology, and medicine*. John Wiley
- Skerman VBD, McGOWAN V, Sneath PHA (1980) Approved Lists of Bacterial Names. *Int J Syst Bacteriol* 30:225–420. <https://doi.org/10.1099/00207713-30-1-225>
- Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, *et al* (1986) Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 321:674
- Song Z, Zhi X, Li W, *et al* (2009) Actinobacterial Diversity in Hot Springs in Tengchong (China), Kamchatka (Russia), and Nevada (USA). *Geomicrobiol J* 26:256–263. <https://doi.org/10.1080/01490450902892373>
- Stach JEM, Maldonado LA, Ward AC, *et al* (2003) New primers for the class *Actinobacteria*: application to marine and terrestrial environments. *Environ Microbiol* 5:828–841. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00483.x>
- Stackebrandt E, Ebers J (2006) Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol Today* 33:152–5
- Stackebrandt E, Goebel BM (1994) Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* 44:846–849. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-4-846>
- Stackebrandt E, Rainey FA, Ward-Rainey NL (1997) Proposal for a New Hierarchic Classification System, *Actinobacteria* classis nov. *Int J Syst Bacteriol* 47:479–491. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-2-479>
- Stein JL, Marsh TL, Wu KY, *et al* (1996) Characterization of uncultivated prokaryotes: isolation and analysis of a 40-kilobase-pair genome fragment from a planktonic marine archaeon. *J Bacteriol* 178:591–599
- Subramani R, Aalbersberg W (2012) Marine actinomycetes: an ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiol Res* 167:571–580
- Sudnitsyn II (2009) Specificity of actinomycetes in salt-affected soils. *Eurasian Soil Sci* 42:235–236. <https://doi.org/10.1134/S106422930902015X>
- Takada K, Ninomiya A, Naruse M, *et al* (2013) Surugamides A–E, Cyclic Octapeptides with Four d-Amino Acid Residues, from a Marine *Streptomyces* sp.: LC–MS-Aided Inspection of Partial Hydrolysates for the Distinction of d- and l-Amino Acid Residues in the Sequence. *J Org Chem* 78:6746–6750. <https://doi.org/10.1021/jo400708u>
- Takizawa M, Colwell RR, Hill RT (1993) Isolation and Diversity of Actinomycetes in the Chesapeake Bay. *Appl Environ Microbiol* 59:997–1002

- Táncsics A, Máthé I, Benedek T, *et al* (2017) *Rhodococcus sovatisensis* sp. nov., an actinomycete isolated from the hypersaline and heliothermal Lake Ursu. *Int J Syst Evol Microbiol* 67:190–196. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001514>
- Tang S-K, Li W-J, Dong W, *et al* (2003) Studies of the Biological Characteristics of Some Halophilic and Halotolerant Actinomycetes Isolated from Saline and Alkaline Soils. *Actinomycetologica* 17:6–10. https://doi.org/10.3209/saj.17_6
- Tang S-K, Wang Y, Schumann P, *et al* (2008) *Brevibacterium album* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from a saline soil in China. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:574–577. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.65183-0>
- Theodorakopoulos N (2013) Analyse de la biodiversité bactérienne d'un sol contaminé de la zone d'exclusion de Tchernobyl et caractérisation de l'interaction engagée par une souche de *Microbacterium* avec l'uranium. Thèse de Doctorat Microbiologie, Aix-Marseille
- Tiner RW (2003) Geographically isolated wetlands of the united states. *Wetlands* 23:494–516. [https://doi.org/10.1672/0277-5212\(2003\)023\[0494:GIWOTU\] 2.0.CO;2](https://doi.org/10.1672/0277-5212(2003)023[0494:GIWOTU] 2.0.CO;2)
- Trujillo ME, Goodfellow M (2015) *Brevibacterium*. In: WB Whitman, F Rainey, P Kämpfer, *et al.* (Eds.), *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1–22). Chichester, UK: John Wiley & Sons
- Tuo L, Pan Z, Li F-N, *et al* (2016) *Friedmanniella endophytica* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from bark of *Kandelia candel*. *Int J Syst Evol Microbiol* 66:3057–3062. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001146>
- Tyson GW, Banfield JF (2005) Cultivating the uncultivated: a community genomics perspective. *Trends Microbiol* 13:411–415
- Ue H, Matsuo Y, Kasai H, Yokota A (2011) *Demequina globuliformis* sp. nov., *Demequina oxidasica* sp. nov. and *Demequina aurantiaca* sp. nov., actinobacteria isolated from marine environments, and proposal of *Demequinaceae* fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:1322–1329. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.024299-0>
- Urzi C, Salamone P, Schumann P, Stackebrandt E (2000) *Marmoricola aurantiacus* gen. nov., sp. nov., a coccoid member of the family *Nocardioidaceae* isolated from a marble statue. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:529–536
- Valdes-Stauber N, Scherer S (1994) Isolation and Characterization of Linocin M18, a Bacteriocin Produced by *Brevibacterium linens*. *APPL Env MICROBIOL* 60:3809–3814
- Valenzuela-Encinas C, Neria-González I, Alcántara-Hernández RJ, *et al* (2009) Changes in the bacterial populations of the highly alkaline saline soil of the former lake Texcoco (Mexico) following flooding. *Extremophiles* 13:609–621. <https://doi.org/10.1007/s00792-009-0244-4>

- Valli S, Suvathi SS, Aysha O, *et al* (2012) Antimicrobial potential of Actinomycetes species isolated from marine environment. *Asian Pac J Trop Biomed* 2:469–473. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60078-1](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60078-1)
- Van de Peer Y, Chapelle S, De Wachter R (1996) A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucleic Acids Res* 24:3381–3391. <https://doi.org/10.1093/nar/24.17.3381>
- Vartoukian SR, Palmer RM, Wade WG (2010) Strategies for culture of ‘unculturable’ bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 309:1–7
- Vasireddy R, Vasireddy S, Brown-Elliott BA, *et al* (2016) *Mycobacterium arupense*, *Mycobacterium heraklionense*, and a Newly Proposed Species, “*Mycobacterium virginienne*” sp. nov., but Not *Mycobacterium nonchromogenicum*, as Species of the *Mycobacterium terrae* Complex Causing Tenosynovitis and Osteomyelitis. *J Clin Microbiol* 54:1340–1351. <https://doi.org/10.1128/JCM.00198-16>
- Ventosa A, Mellado E, Sanchez-Porro C, Marquez MC (2008) Halophilic and halotolerant microorganisms from soils. In: P Dion, CS Nautiyal (Eds.) *Microbiology of extreme soils, Soil biology*, vol 13 (pp. 87–115). Berlin: Springer
- Ventosa A, Nieto JJ, Oren A (1998) Biology of Moderately Halophilic Aerobic Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:504–544
- Ventura M, Canchaya C, Tauch A, *et al* (2007) Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol Mol Biol Rev* 71:495–548
- Wada T, Hijikata M, Maeda S, *et al* (2017) Complete Genome Sequence of a *Mycobacterium tuberculosis* Strain Belonging to the East African-Indian Family in the Indo-Oceanic Lineage, Isolated in Hanoi, Vietnam. *Genome Announc* 5:e00509–17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00509-17>
- Wagner A (2007) Disk Diffusion Test and Gradient Methodologies. In: R Schwalbe, L Steele-Moore, AC Goodwin (Eds.), *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols* (pp. 53-72). Boca Raton: CRC Press Taylor and Francis Group
- Wang Z, Fu P, Liu P, *et al* (2013) New Pyran-2-ones from Alkaliphilic Actinomycete, *Nocardiopsis alkaliphila* sp. Nov. YIM-80379. *Chem Biodivers* 10:281–287. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201200086>
- Wauters G, Avesani V, Laffineur K, *et al* (2003) *Brevibacterium lutescens* sp. nov., from human and environmental samples. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:1321–1325. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02513-0>
- Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, *et al* (1987) Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Evol Microbiol* 37:463–464
- Whipps CM, Tortoli E, Matsumoto CK, *et al* (2015) *Mycobacterium saopaulense* sp. nov., a rapidly growing mycobacterium closely related to members of the

- Mycobacterium chelonae*–*Mycobacterium abscessus* group. *Int J Syst Evol Microbiol* 65:4403–4409. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000590>
- Wietzorrek A, Bibb M (1997) A novel family of proteins that regulates antibiotic production in Streptomyces appears to contain an OmpR-like DNA-binding fold. *Mol Microbiol* 25:1181–1184. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.5461902.x>
- Williams ST, Goodfellow M, Alderson G (1989) Genus *Streptomyces*. In: Bergey's manual of systematic bacteriology (pp. 2452–2492). Baltimore: Williams and Wilkins
- Woese CR (1987) Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51:221
- Won S-M, Lee J-S, Park S, *et al* (2015) *Demequina activiva* sp. nov., isolated from a tidal flat. *Int J Syst Evol Microbiol* 65:2042–2047. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000217>
- Wright ES, Yilmaz LS, Noguera DR (2012) DECIPHER, a Search-Based Approach to Chimera Identification for 16S rRNA Sequences. *Appl Environ Microbiol* 78:717–725. <https://doi.org/10.1128/AEM.06516-11>
- Xu Z, Schenk A, Hertweck C (2007) Molecular Analysis of the Benastatin Biosynthetic Pathway and Genetic Engineering of Altered Fatty Acid–Polyketide Hybrids. *J Am Chem Soc* 129:6022–6030. <https://doi.org/10.1021/ja069045b>
- Yoon S-H, Ha S-M, Kwon S, *et al* (2017) Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol* 67:1613–1617. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>
- Yoshida M, Matsubara K, Kudo T, Horikoshi K (1991) *Actinopolyspora mortivallis* sp. nov., a Moderately Halophilic Actinomycete. *Int J Syst Evol Microbiol* 41:15–20. <https://doi.org/10.1099/00207713-41-1-15>
- Yu L, Lai Q, Yi Z, *et al* (2013) *Microbacterium sediminis* sp. nov., a psychrotolerant, thermotolerant, halotolerant and alkalitolerant actinomycete isolated from deep-sea sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:25–30. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.029652-0>
- Zemouchi N, Ounissi Y (2004) Cartographie de la végétation et étude du dynamisme végétale de la mare Timerganine (Oum El-Bouaghi). Mémoire d'Ingénieur d'Etat, Université d'Oum El-Bouaghi, Algérie
- Zhang X, Zhang J, Zhang Y, *et al* (2013a) *Friedmanniella flava* sp. nov., a soil actinomycete. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:1771–1775. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.043984-0>
- Zhang Y-G, Lu X-H, Ding Y-B, *et al* (2016) *Phytoactinopolyspora alkaliphila* sp. nov., an alkaliphilic actinomycete isolated from a saline-alkaline soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 66:2058–2063. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000992>

- Zhang Y-J, Zhang W-D, Qin S, *et al* (2013b) *Saccharopolyspora dendranthema* sp. nov. a halotolerant endophytic actinomycete isolated from a coastal salt marsh plant in Jiangsu, China. *Antonie Van Leeuwenhoek* 103:1369–1376. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-9917-1>
- Zhi X-Y, Li W-J, Stackebrandt E (2009) An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:589–608. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65780-0>
- Zimmerman W (1980) Degradation of lignin by bacteria. 13:199–130. *J Biotechnol* 13:130–199
- Zitouni A, Boudjella H, Lamari L, *et al* (2005) *Nocardiopsis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: Isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. *Res Microbiol* 156:984–993. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.05.006>
- Zopf W (1891) Über Ausscheidung von Fettfarbstoffen (Lipochromen) seitens gewisser Spaltpilze. *Berichte Dtsch Bot Ges* 9:22–28
- Zvyagintseva IS, Poglazova MN, Gotoeva MT, Belyaev SS (2001) Effect on the medium salinity on oil degradation by nocardioform bacteria. *Microbiology* 70:652–656

ANNEXES

Annexe 1. Milieux de culture.**Milieu ISP2**

Extrait de levure	4 g
Extrait de malt	10 g
Glucose	4 g
Agar	20 g
Eau distillée qsp	1000 ml

pH = 7,3

Milieu ISP5

Glycérol	10 g
L-Asparagine	1 g
K ₂ HPO ₄	1 g
Solution saline ¹	1 ml
Agar	20 g
Eau distillée qsp	1000 ml

pH = 7-7,4

Milieu ISP7

Glycérol	15 g
L-asparagine	1 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
NaCl	0,5 g
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,01 g
Agar	20 g
Eau distillée qsp	1000 ml

pH = 7,2-7,4

Milieu Olson

Sodium caseinates	2 g
L-asparagine	0,1 g
Sodium propionates	4 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
Mg SO ₄	0,1 g
F ₂ SO ₄	1 mg
Glycérol 0,5 %	5 g
Agar	15 g
Eau distillée qsp	1000 ml

pH = 8,1-8,2

Milieu Glucose-Asparagine

Glucose	10 g
L-asparagine	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
Agar	15 g
Eau distillée qsp	1000 ml

pH = 6,8

Gélose nutritive + amidon 1%

Extrait de viande	1 g
Extrait de levure	2,5 g
Peptone	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Amidon (1%)	10 g
Agar	15 g
Eau distillée qsp	1000 ml

pH=7,0

Milieu ISP9 + cellulose 1%

(NH ₄) ₂ SO ₄	2,64 g
KH ₂ PO ₄	2,38 g
K ₂ HPO ₄	5,65 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	1 g
Solution saline ²	1 ml
Cellulose	10 g

Agar	20 g
Eau distillée qsp	1000 ml

pH = 6,8-7,0

Milieu pectine agar

Pectine	5 g
Extrait de levure	5 g
Agar	20 g
Eau distillée qsp	1000 ml

pH = 7,0

Milieu de Sierra

Peptone	10 g
NaCl	5 g
CaCl ₂ H ₂ O	0,1 g
Tween 80	10 ml
Agar	20 g
Eau distillée qsp	1000 ml

pH = 7

Suite de l'annexe 1.

Gélose nutritive + gélatine 0,4%

Gélatine	4 g
Peptone	5 g
Extrait de viande	3 g
Agar	15 g
Eau distillée qsp	1000 ml

pH = 7,0

Milieu Mueller-Hinton

Infusion de viande	300 g
Hydrolysate de caséine	17,5 g
Amidon	1,5 g
Agar	17 g
Eau distillée qsp	1000 ml

pH = 7,4

Milieu de base (sans source de carbone)

KNO ₃	13,76 g
KH ₂ PO ₄	1,78 g
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	4,66 g
Na ₂ SO ₄	9,68 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,8 g
EDTA	10 mg
FeSO ₄ 7H ₂ O	5 mg
MnCl ₂ 4H ₂ O	1,22 mg
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,25 mg
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,2 mg
CaCl ₂ 2H ₂ O	1 mg
Na ₂ MoO ₄ H ₂ O	0,2 mg
Agar	18 g
Eau distillée qsp	1000 ml

pH = 7,2 - 7,4

Milieu Sabouraud

Glucose	40 g
Peptone	10 g
Agar	15 g
Eau distillée qsp	1000 ml

pH = 7,0

Milieu LB (Luria Bertani)

Tryptone	10 g
Extrait de levure	5 g
Chlorure de sodium	10 g
Agar	15 g
Eau distillée qsp	1000 ml

pH = 7,2

Milieu Trypticase Soja Agar

Peptone de caséine	15 g
Peptone de soja	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar	15 g
Eau distillée qsp	1000 ml

pH = 7,3

Milieu S.O.C (liquide)

Tryptone	20 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	0,584 g
KCl	0,186 g
MgCl ₂	1,2 g
MgSO ₄	1,2 g
Glucose (solution 20%)	20 ml
Eau distillée qsp	1000 ml

pH = 7,5

Annexe 2. Solutions.

Solution saline¹

FeSO ₄ 7 H ₂ O	0,1 g
MnCl ₂ 7 H ₂ O	0,1 g
Zn SO ₄ 7 H ₂ O	0,1 g
Eau distillée qsp	100 ml

Solution saline²

CuSO ₄ 5H ₂ O	0,64 g
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,11 g
MnCl ₂ 4H ₂ O	0,79 g
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,15 g
Eau distillée qsp	100 ml

Solution de lugol

Iodine	1 g
Iodure de potassium	2 ml
Eau distillée qsp	100 ml

Solution de chlorure mercurique

HgCl ₂	15 g
HCl concentré	20 ml
Eau distillée qsp	100 ml

Solution 0,5 Mc Farland

Solution de BaCl ₂ 2H ₂ O (1%)	0,6 ml
Solution de H ₂ SO ₄ (1%)	99,4 ml

**Conservation : à l'obscurité, à température 20-25°C pendant 6 mois*

Solution 1 (100 ml)

Glucose	0,9 g
Tris.Cl (1,9 M) (pH 8.0)	1,31 ml
EDTA (0,5M) (pH 8.0)	2 ml
H ₂ O	96,5 ml

**Pour un stockage long, autoclaver la solution*

Solution 2 (1 ml)

NaOH (10 N)	20 µl
SDS 20%	50 µl
H ₂ O	930 µl

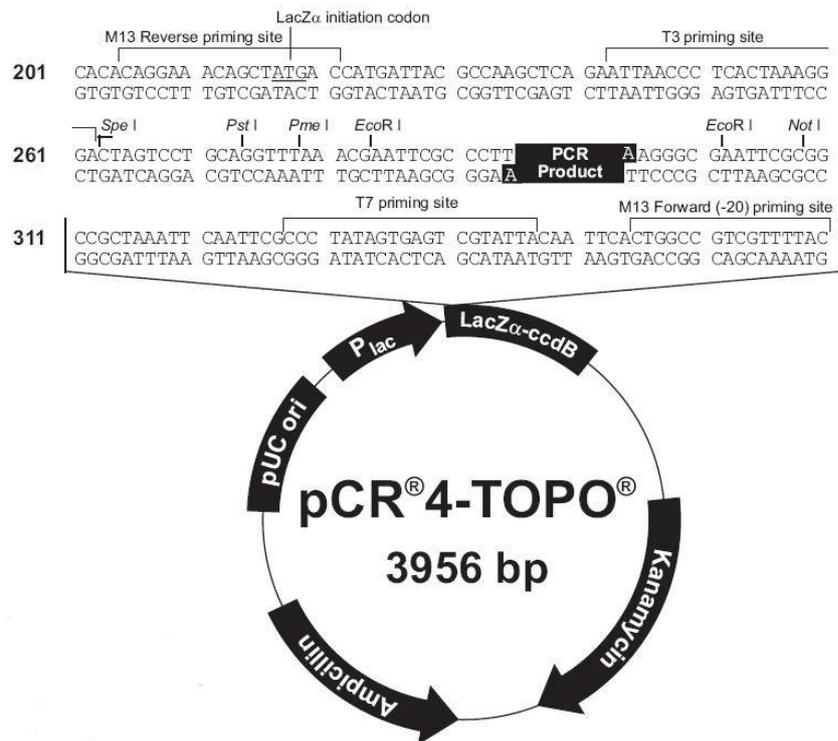
Solution 3 (100 ml)

Acétate de Potassium (5M)	29,45 g
Acide acétique Glacial	11,5 ml
H ₂ O	88,5 ml

Tampon de ligation rapide

Tris-HCl	60 mM (pH 7,8)
MgCl ₂	20 mM
DTT (dithiothréitol)	20 mM
ATP (Adénosine triphosphate)	2 mM
PEG-8000 (Polyéthylène glycol)	10 %

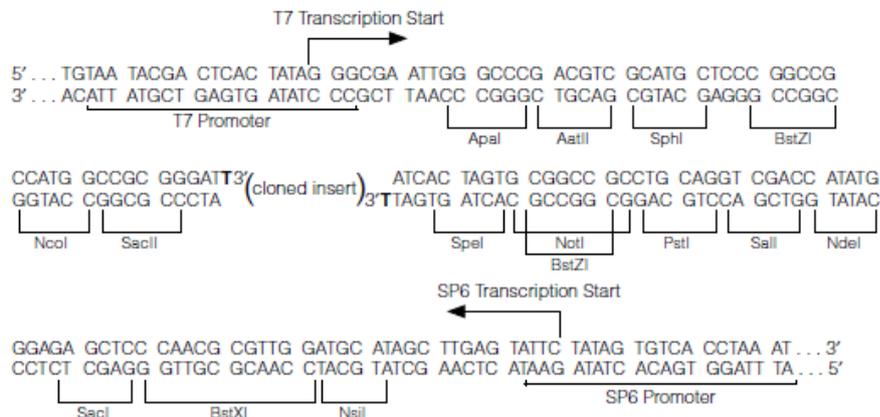
Annexe 3. Séquences et cartes des vecteurs de clonage.



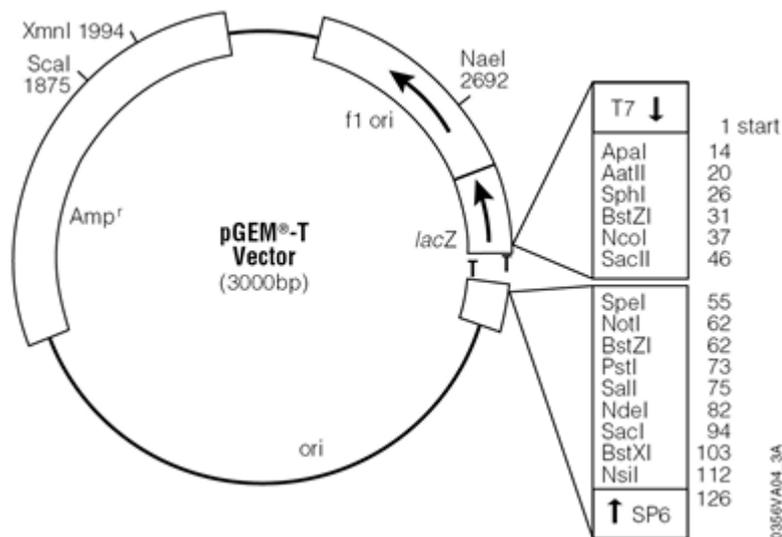
Carte du vecteur pCR[®] 4Blunt-TOPO[®] constitué de 3956 nucléotides :

Région du promoteur *lac* : bases 2-216 ; site de liaison CAP : bases 95-132 ; site de liaison de l'ARN polymérase : bases 133-178 ; Site du répresseur Lac : bases :179-199 ; début de la transcription : base 179 ; site de l'amorce M13 antisens : bases 205-221 ; fusion du gène *LacZα-ccdB* : bases 217-810 ; partie de fusion de *LacZα* : bases 217-497 ; partie de fusion de *ccdB* : bases 508-810 ; site de l'amorce T3 : bases 243-262 ; site de clonage TOPO[®] : bases : 294-295 ; site de l'amorce T7 : bases 328-347 ; site de l'amorce M13 sens (-20): bases 355-370 ; promoteur de la kanamycine : bases 1021-1070 ; gène de résistance à la kanamycine : bases 1159-1953 ; gène de résistance à l'ampicilline (*bla*) : bases 2203-3063; promoteur de l'ampicilline (*bla*) : bases 3064-3160 ; origine de pUC : bases 3161-3834

Suite de l'annexe 3.



Le promoteur et la séquence de clonage multiple du vecteur pGEM®-T. Le brin supérieur correspond à l'ARN synthétisé par l'ARN polymérase T7. Le brin inférieur correspond à l'ARN synthétisé par l'ARN polymérase SP6



Points de référence de la carte vectorielle et de la séquence pGEM®-T :

Site d'initiation de la transcription de l'ARN polymérase T7 (1) ; région de clonage multiple (10-113) ; Promoteur de l'ARN polymérase SP6 (-17 à +3) (124-143) ; Site d'initiation de la transcription de l'ARN polymérase SP6 (126) ; site de liaison de l'amorce antisens pUC/M13 de séquençage (161-177) ; codon d'initiation *LacZ* (165); opérateur *lac* (185–201) ; Région codante de β -lactamase (1322–2182) ; région du phage f1 (2365–2820) ; séquences d'opéron *lac* (2821–2981, 151–380) ; site de liaison de l'amorce sens pUC/M13 de séquençage (2941–2957) ; Promoteur de l'ARN polymérase T7 (-17 à +3) (2984-3)

Annexe 4. Tableaux détaillés des propriétés physicochimiques des échantillons de sol.

Echantillons Propriétés		Sebkha d'Ezemmoul			Chott Tinsilt			Sebkha de Djendli		
		EE ₁	EE ₂	EE ₃	TE ₁	TE ₂	TE ₃	DE ₁	DE ₂	DE ₃
pH	X ₁	8,63	8,74	8,38	8,13	8,7	8,85	8,14	8	7,98
	X ₂	8,49	8,76	8,45	8,10	8,76	8,81	8,12	7,98	7,95
	X ₃	8,51	8,7	8,41	8,37	8,63	8,82	8,17	7,99	7,96
CE (dS/m)	X ₁	8,09	11,35	31,4	3,2	39,8	13,78	5,33	11,94	15,92
	T (°C)	27,1	26,7	26,8	26,6	26,4	26,6	27,5	27,7	27,6
	X ₂	13,43	9,83	23,6	1,73	34	14,55	4,92	12,76	15,72
	T (°C)	27	27,3	26,6	29,2	29,7	29,7	29,3	29,3	29,2
	X ₃	11,81	12,48	24,3	2,48	16,1	13,57	5,56	15,06	16,78
	T (°C)	29,7	29,9	30,5	30,9	30,7	30,5	30,5	30,6	30,7
Salinité (méq/100g)	X ₁	40,45	56,75	157	16	199	68,9	26,65	59,7	79,6
	X ₂	67,15	49,15	118	8,65	170	72,75	24,6	63,8	78,6
	X ₃	59,05	62,40	121,5	12,4	80,5	67,85	27,8	75,3	84,9
H (%)	X ₁	9,67	4,06	4,72	4,03	3,41	3,33	5,58	6,96	6,42
	X ₂	6,54	3,9	4,86	3,1	3,7	3,05	4,86	6,5	5,84
	X ₃	9,61	4,96	5,76	4,04	4,31	3,31	5,55	7,03	6,76
M.O (%)	X ₁	5,49	5,36	10,18	8,96	12,05	6,59	6,01	7,8	7,59
	X ₂	7,17	3,5	8	6,88	10,64	6,82	5,09	7,31	7,11
	X ₃	4,29	4,31	6,3	11,15	9,54	4,94	3,34	3,89	4,3

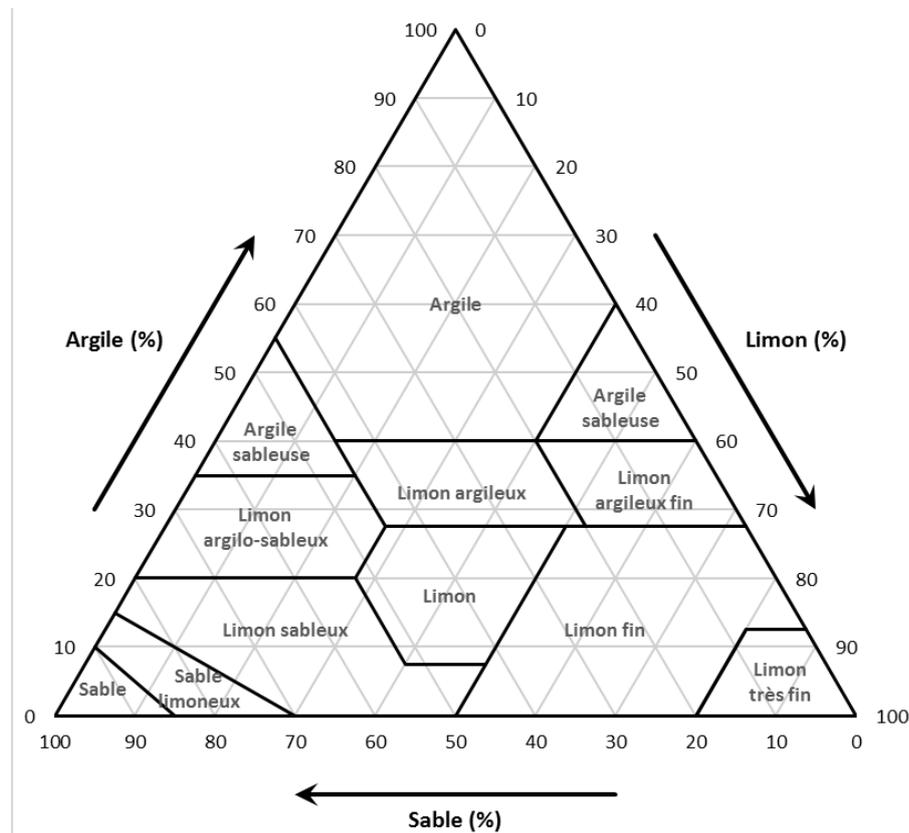
E : sebkha d'Ezemmoul, T : chott Tinsilt, D : sebkha de Djendli, E₁ : Echantillon n°1 prélevé de la partie du site contenant la végétation (rhizosphère), E₂ : Echantillon n°2 prélevé de la partie du site où il y a moins de végétation, E₃ : Echantillon n°3 prélevé de la partie du site où il n'y a pas de végétation.

* Chacun des échantillons E₁, E₂, E₃ est prélevé trois fois (X₁, X₂, X₃) à une distance de 5 m entre X₁, X₂, X₃.

Suite de l'annexe 4.

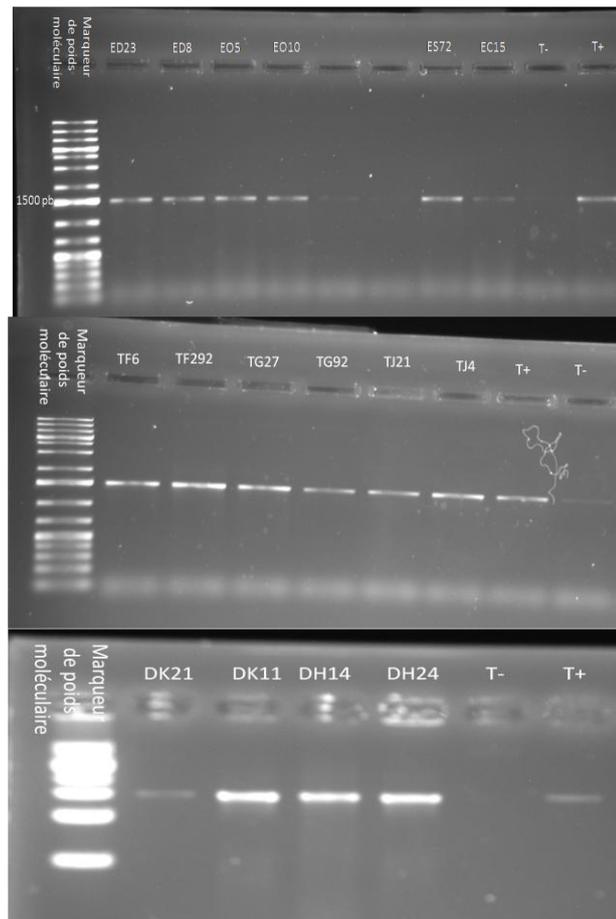
Sites	Echantillons	Granulométrie					
		Gravier %	Gros sable %	Sable fin %	Total des sables %	Limons %	Argile %
Sebkha d'Ezemmoul	EE ₁	7,49	31,84	33,05	64,89	13,07	14,52
	EE ₂	4,67	17,79	27,10	44,89	23,89	26,53
	EE ₃	1,33	10,86	30,47	41,33	27,15	30,16
	Moyenne	4,5	20,16	30,20	50,37	21,37	23,73
Chott Tinsilt	TE ₁	1,29	8,43	25,67	34,1	30,59	33,99
	TE ₂	0,13	3,28	35,08	38,36	29,13	32,36
	TE ₃	0,31	6,44	40,46	46,9	24,98	27,76
	Moyenne	0,58	6,05	33,73	39,78	28,23	31,37
Sebkha de Djendli	DE ₁	1,04	5,94	26,64	32,58	31,44	34,94
	DE ₂	0	5,12	24,22	29,34	33,46	37,17
	DE ₃	0,18	5,43	25,18	30,61	32,77	36,41
	Moyenne	0,41	5,49	25,34	30,83	32,55	36,17

Annexe 5. Triangle des textures minérales (Eswaran *et al.*, 2002).



Chaque échantillon y est situé en fonction de sa teneur pondérale en sables, limons et argiles, la somme des trois étant ramenée à 100 %. Pour chaque pourcentage d'argile, de limon et de sable, tracer une parallèle à l'axe précédent. L'intersection des trois droites désigne la texture de l'échantillon.

Annexe 6. Photos des gels de l'amplification des ADNr 16S de quelques isolats et clones.



Photos des gels de quelques isolats

Suite de l'annexe 6.

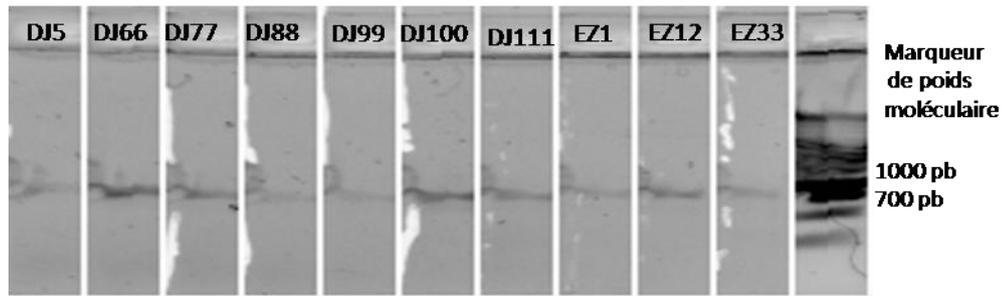


Photo d'un E-gel de quelques clones

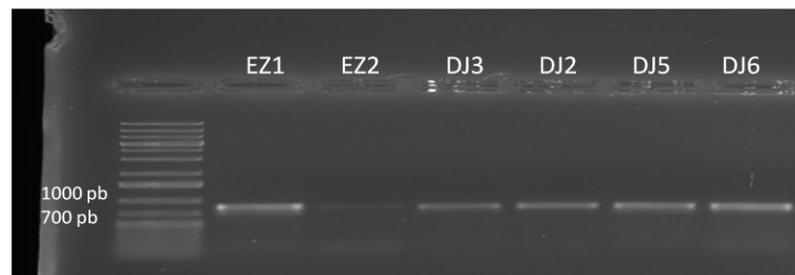


Photo d'un gel de quelques clones

Annexe7. Arbres phylogénétiques détaillés des isolats qui pourraient représenter de nouvelles espèces du site Djendli.

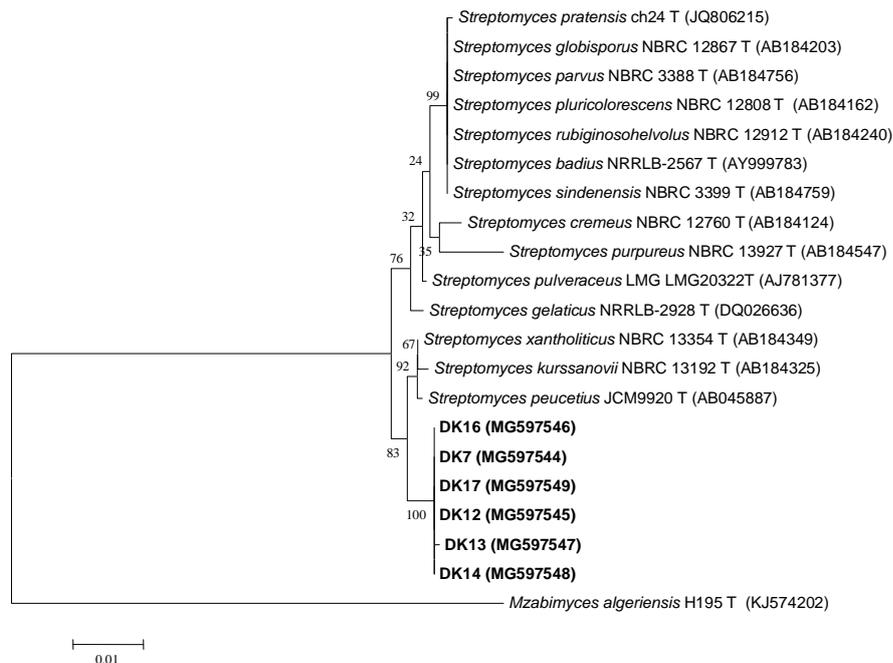


Figure 1: Arbre phylogénétique enraciné construit par la méthode de Neighbor-Joining, montrant la relation des isolats DK16, DK7, DK17, DK12, DK13 et DK14 du site Djendli avec les espèces les plus proches du genre *Streptomyces*. Les valeurs de Bootstrap aux nœuds représentent le pourcentage après 1000 réplifications. Les numéros d'accèsion de chaque séquence sont représentés entre parenthèses. *Mzabimycetes Algeriensis* H195^T est utilisée comme outgroup. L'échelle 0,01 représente le nombre de substitution par position de nucléotide et estime la divergence des séquences

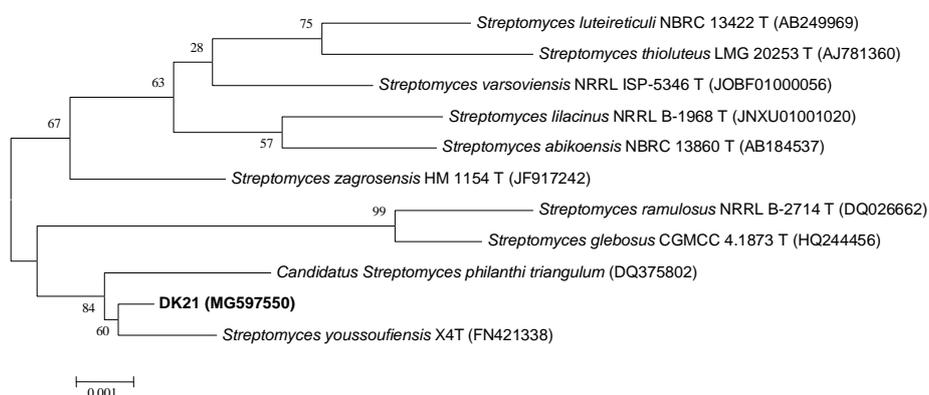


Figure 2 : Arbre phylogénétique non enraciné construit par la méthode de Neighbor-Joining, montrant la relation de l'isolat DK21 du site Djendli avec les espèces les plus proches du genre *Streptomyces*. Les valeurs de Bootstrap supérieures à 50% (après 1000 réplifications) sont représentées sur les noeuds. Les numéros d'accèsion de chaque séquence sont représentés entre parenthèses. L'échelle 0,001 représente le nombre de substitution par position de nucléotide et estime la divergence des séquences

Suite de l'annexe 7.

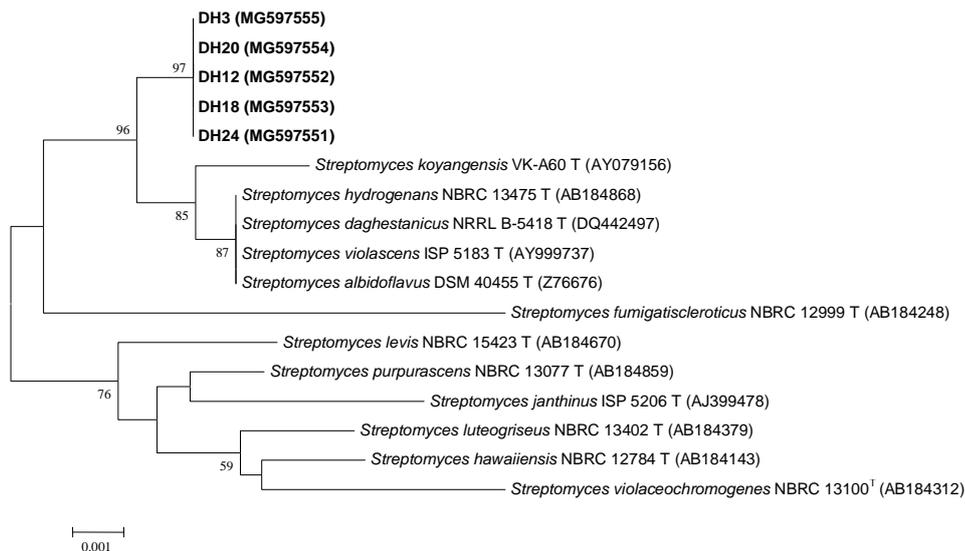


Figure 3 : Arbre phylogénétique non enraciné construit par la méthode de Neighbor-Joining, montrant la relation des isolats DH3, DH20, DH12, DH18 et DH24 du site Djendli avec les espèces les plus proches du genre *Streptomyces*. Les valeurs de Bootstrap supérieures à 50% (après 1000 réplifications) sont représentées sur les noeuds. Les numéros d'accèsion de chaque séquence sont représentés entre parenthèses. L'échelle 0,001 représente le nombre de substitution par position de nucléotide et estime la divergence des séquences.

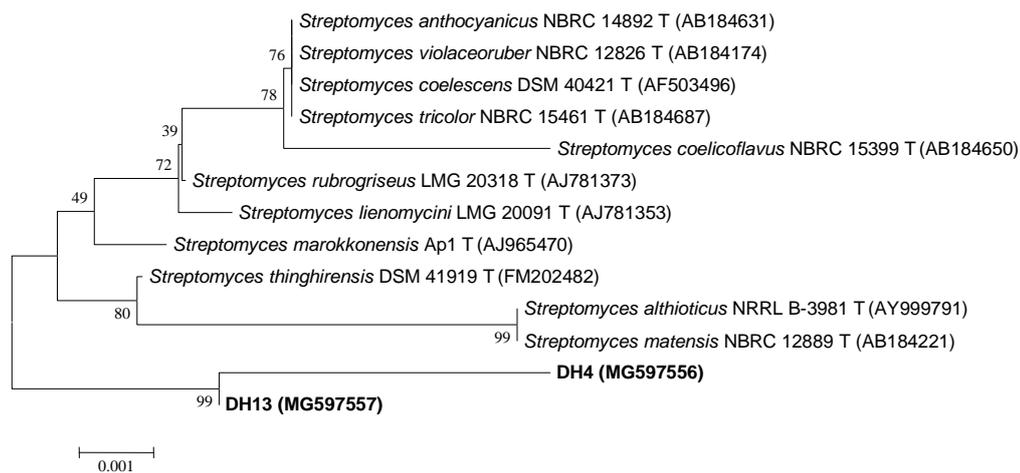


Figure 4 : Arbre phylogénétique non enraciné construit par la méthode de Neighbor-Joining, montrant la relation des isolats DH4 et DH13 du site Djendli avec les espèces les plus proches du genre *Streptomyces*. Les valeurs de Bootstrap aux noeuds représentent le pourcentage après 1000 réplifications. Les numéros d'accèsion de chaque séquence sont représentés entre parenthèses. L'échelle 0,001 représente le nombre de substitution par position de nucléotide et estime la divergence des séquences.

Annexe 8. Arbres phylogénétiques détaillés des isolats du site Tinsilt.

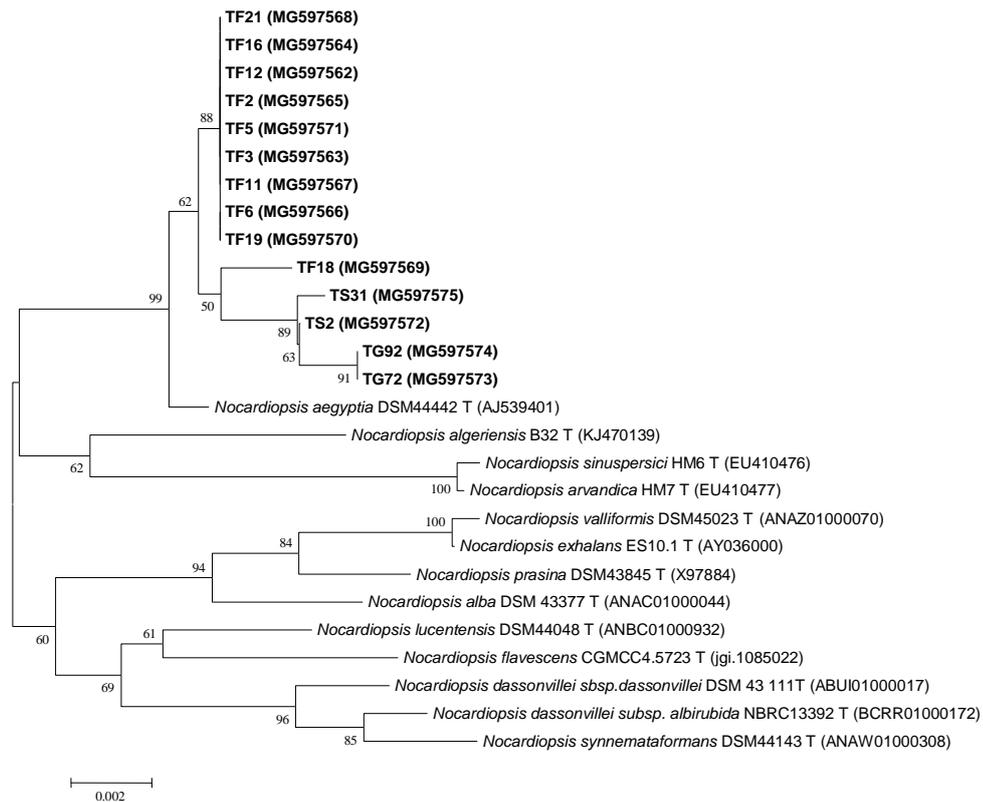


Figure 1 : Arbre phylogénétique non enraciné construit par la méthode de Neighbor-Joining, montrant la relation des isolats du site Tinsilt avec les espèces les plus proches du genre *Nocardioopsis*. Les valeurs de Bootstrap supérieures à 50% (après 1000 répliquions) sont représentées sur les noeuds. Les numéros d'accèsion de chaque séquence sont représentés entre parenthèses. L'échelle 0,002 représente le nombre de substitution par position de nucléotide et estime la divergence des séquences.

Suite de l'annexe 8.

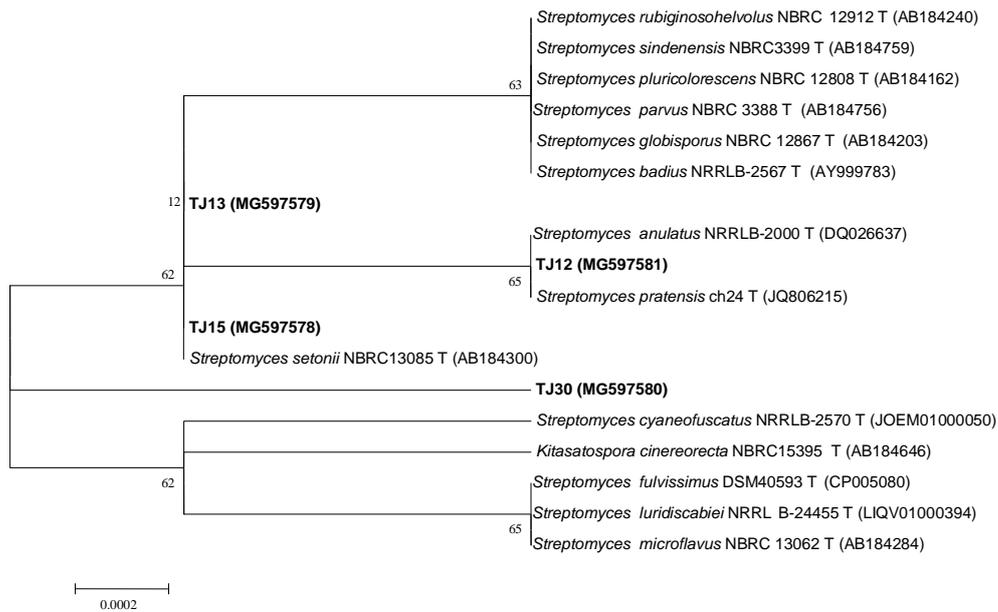


Figure 2 : Arbre phylogénétique non enraciné construit par la méthode de Neighbor-Joining, montrant la relation des isolats TJ12, TJ13, TJ15 et TJ30 du site Tinsilt avec les espèces les plus proches du genre *Streptomyces*. Les valeurs de Bootstrap aux nœuds représentent le pourcentage après 1000 réplifications. Les numéros d'accèsion de chaque séquence sont représentés entre parenthèses. L'échelle 0,0002 représente le nombre de substitution par position de nucléotide et estime la divergence des séquences.

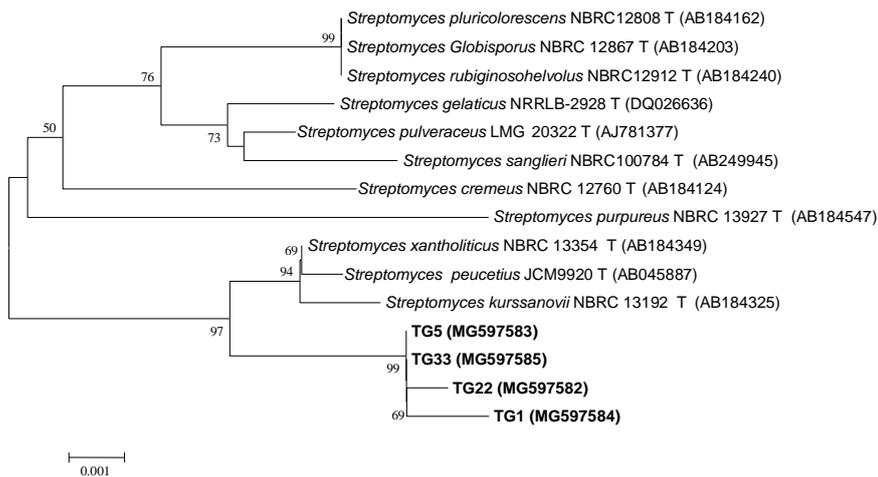


Figure 3 : Arbre phylogénétique non enraciné construit par la méthode de Neighbor-Joining, montrant la relation des isolats TG5, TG33, TG22 et TG1, du site Tinsilt avec les espèces les plus proches du genre *Streptomyces*. Les valeurs de Bootstrap supérieures à 50% (après 1000 réplifications) sont représentées sur les noeuds. Les numéros d'accèsion de chaque séquence sont représentés entre parenthèses. L'échelle 0,001 représente le nombre de substitution par position de nucléotide et estime la divergence des séquences

Suite de l'annexe 8.

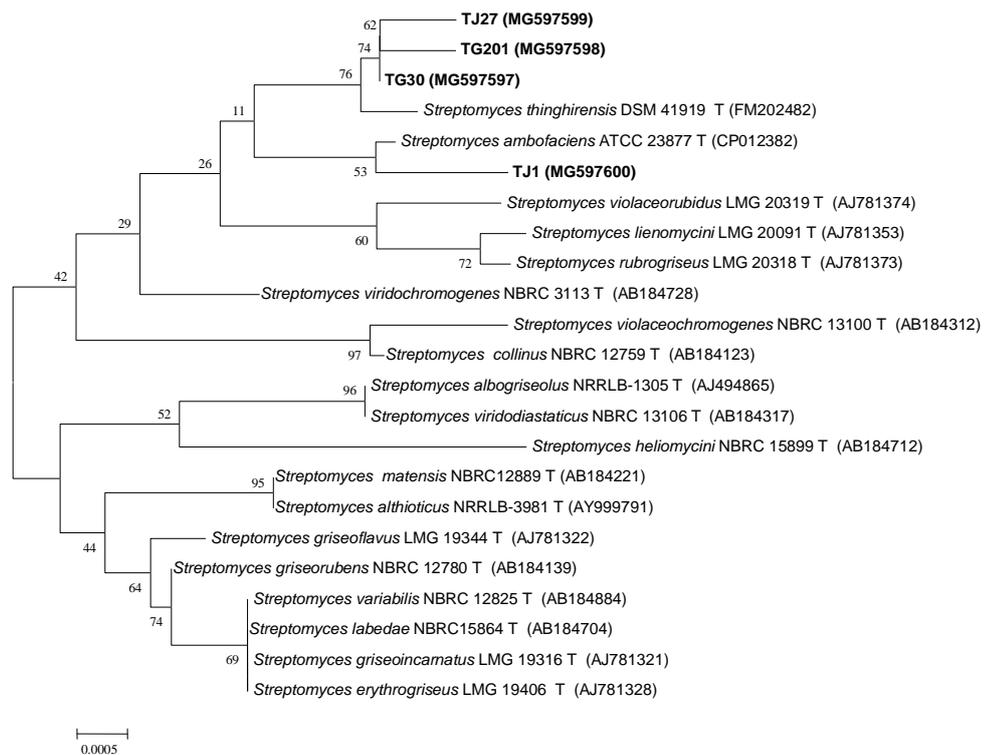


Figure 4 : Arbre phylogénétique non enraciné construit par la méthode de Neighbor-Joining, montrant la relation des isolats TJ27, TJ1, TG201 et TG30 du site Tinsilt avec les espèces les plus proches du genre *Streptomyces*. Les valeurs de Bootstrap aux nœuds représentent le pourcentage après 1000 réplifications. Les numéros d'accèsion de chaque séquence sont représentés entre parenthèses. L'échelle 0,0005 représente le nombre de substitution par position de nucléotide et estime la divergence des séquences.

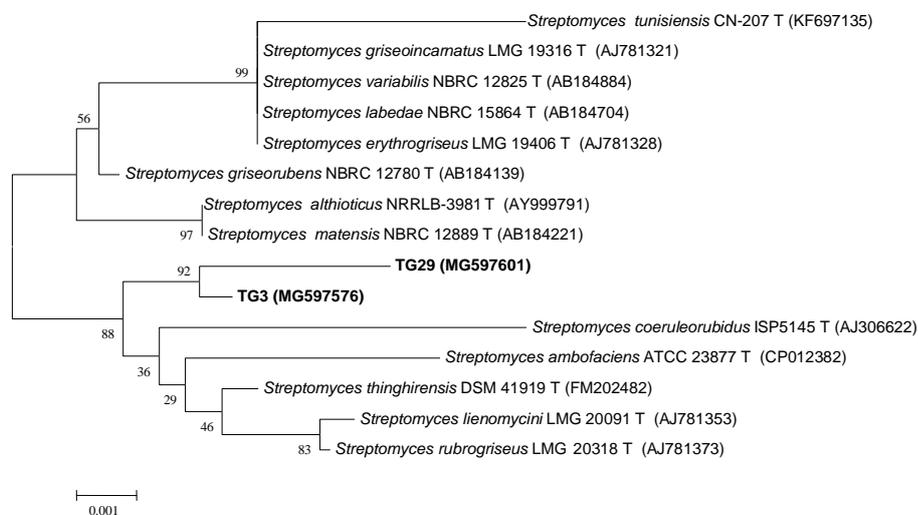


Figure 5 : Arbre phylogénétique non enraciné construit par la méthode de Neighbor-Joining, montrant la relation des isolats TG29 et TG3 du site Tinsilt avec les espèces les plus proches du genre *Streptomyces*. Les valeurs de Bootstrap supérieures à 50% (après 1000 réplifications) sont représentées sur les noeuds. Les numéros d'accèsion de chaque séquence sont représentés entre parenthèses. L'échelle 0,001 représente le nombre de substitution par position de nucléotide et estime la divergence des séquences.

Suite de l'annexe 8.

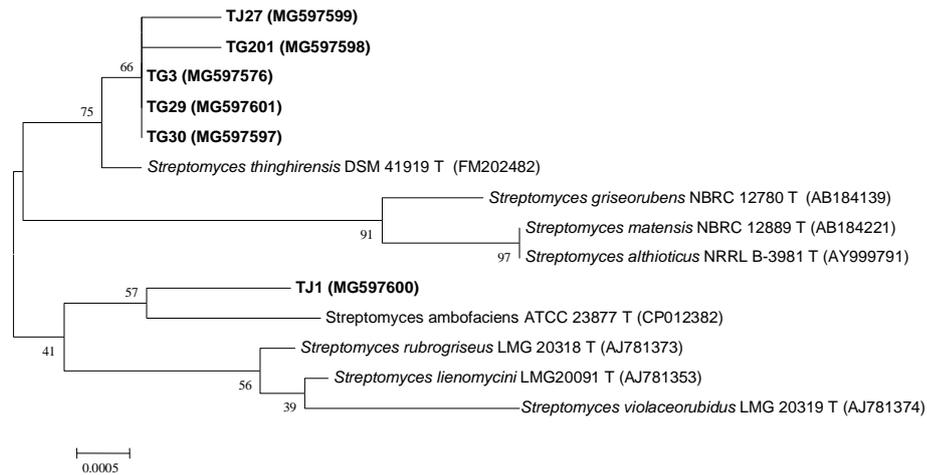


Figure 6 : Arbre phylogénétique non enraciné construit par la méthode de Neighbor-Joining, montrant la relation des isolats TJ27, TJ1, TG201 et TG30, TG03 et TG29 du site Tinsilt avec les espèces les plus proches du genre *Streptomyces*. . Les valeurs de Bootstrap aux nœuds représentent le pourcentage après 1000 réplifications. Les numéros d'accèsion de chaque séquence sont représentés entre parenthèses. L'échelle 0,0005 représente le nombre de substitution par position de nucléotide et estime la divergence des séquences.

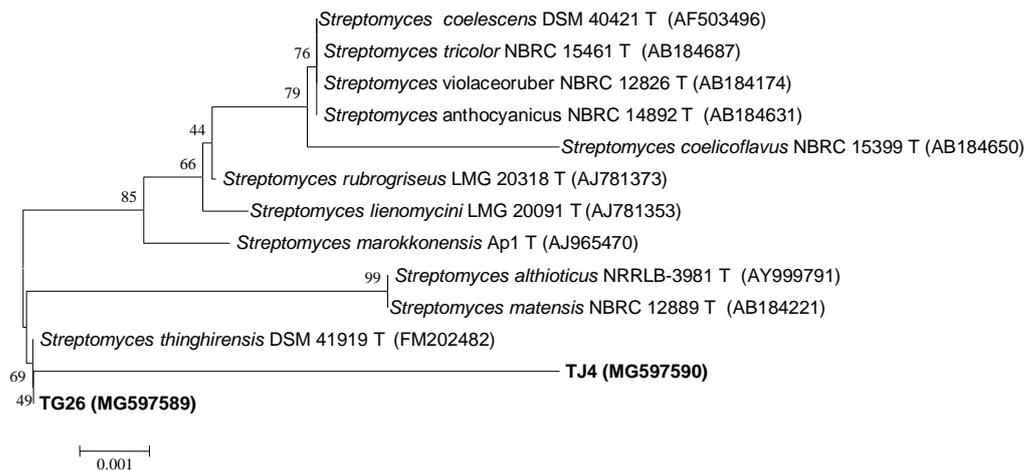


Figure 7 : Arbre phylogénétique non enraciné construit par la méthode de Neighbor-Joining, montrant la relation des isolats TJ27, TJ1, TG201, TG30, TG03 et TG29 du site Tinsilt avec les espèces les plus proches du genre *Streptomyce*. . Les valeurs de Bootstrap aux nœuds représentent le pourcentage après 1000 réplifications. Les numéros d'accèsion de chaque séquence sont représentés entre parenthèses. L'échelle 0,001 représente le nombre de substitution par position de nucléotide et estime la divergence des séquences.

Suite de l'annexe 8.

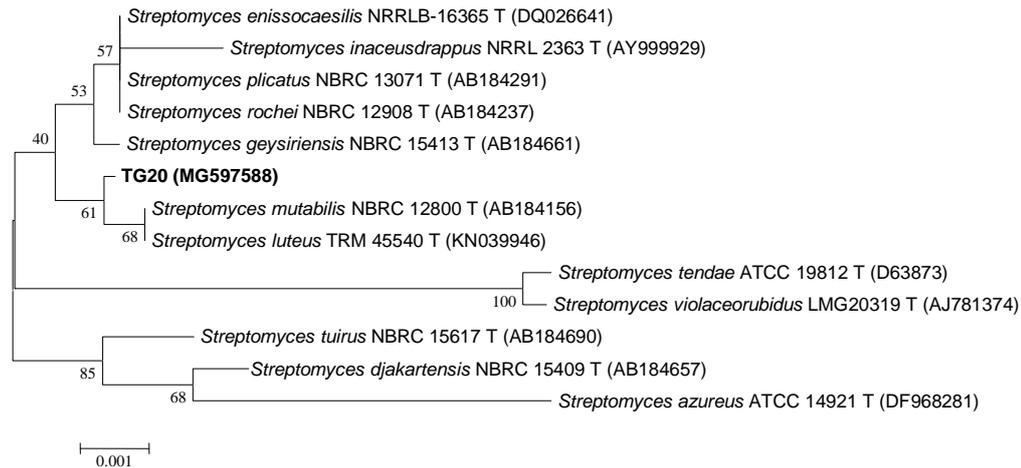


Figure 8 : Arbre phylogénétique non enraciné construit par la méthode de Neighbor-Joining, montrant la relation de l'isolat TG20 du site Tinsilt avec les espèces les plus proches du genre *Streptomyces*. Les valeurs de Bootstrap aux nœuds représentent le pourcentage après 1000 réplifications. Les numéros d'accèsion de chaque séquence sont représentés entre parenthèses. L'échelle 0,001 représente le nombre de substitution par position de nucléotide et estime la divergence des séquences.

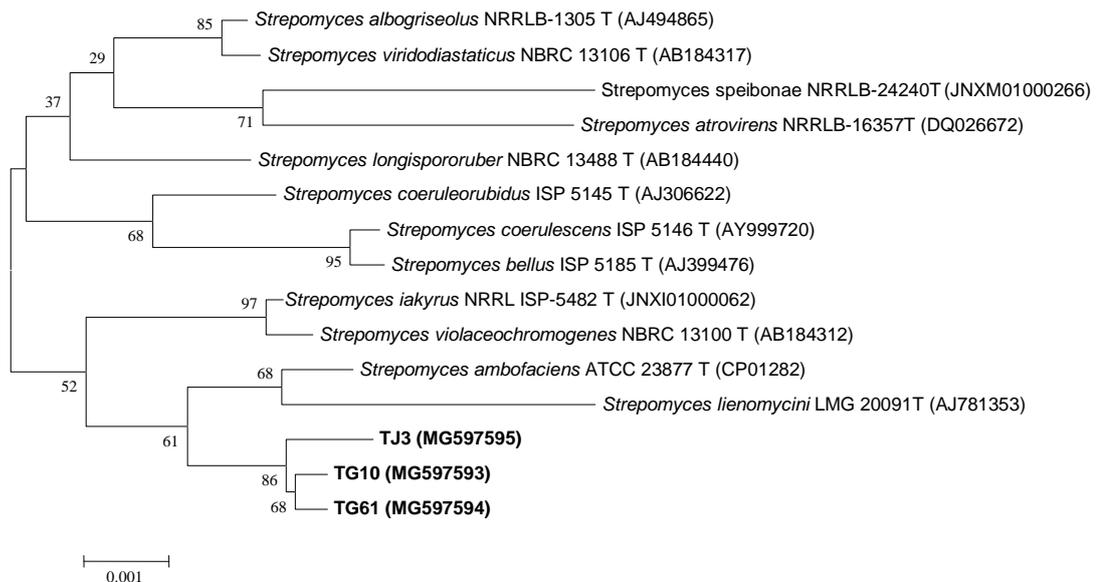


Figure 9 : Arbre phylogénétique non enraciné construit par la méthode de Neighbor-Joining, montrant la relation des isolats TG10, TG61 et TJ3 du site Tinsilt avec les espèces les plus proches du genre *Streptomyces*. Les valeurs de Bootstrap aux nœuds représentent le pourcentage après 1000 réplifications. Les numéros d'accèsion de chaque séquence sont représentés entre parenthèses. L'échelle 0,001 représente le nombre de substitution par position de nucléotide et estime la divergence des séquences.

Suite de l'annexe 8.

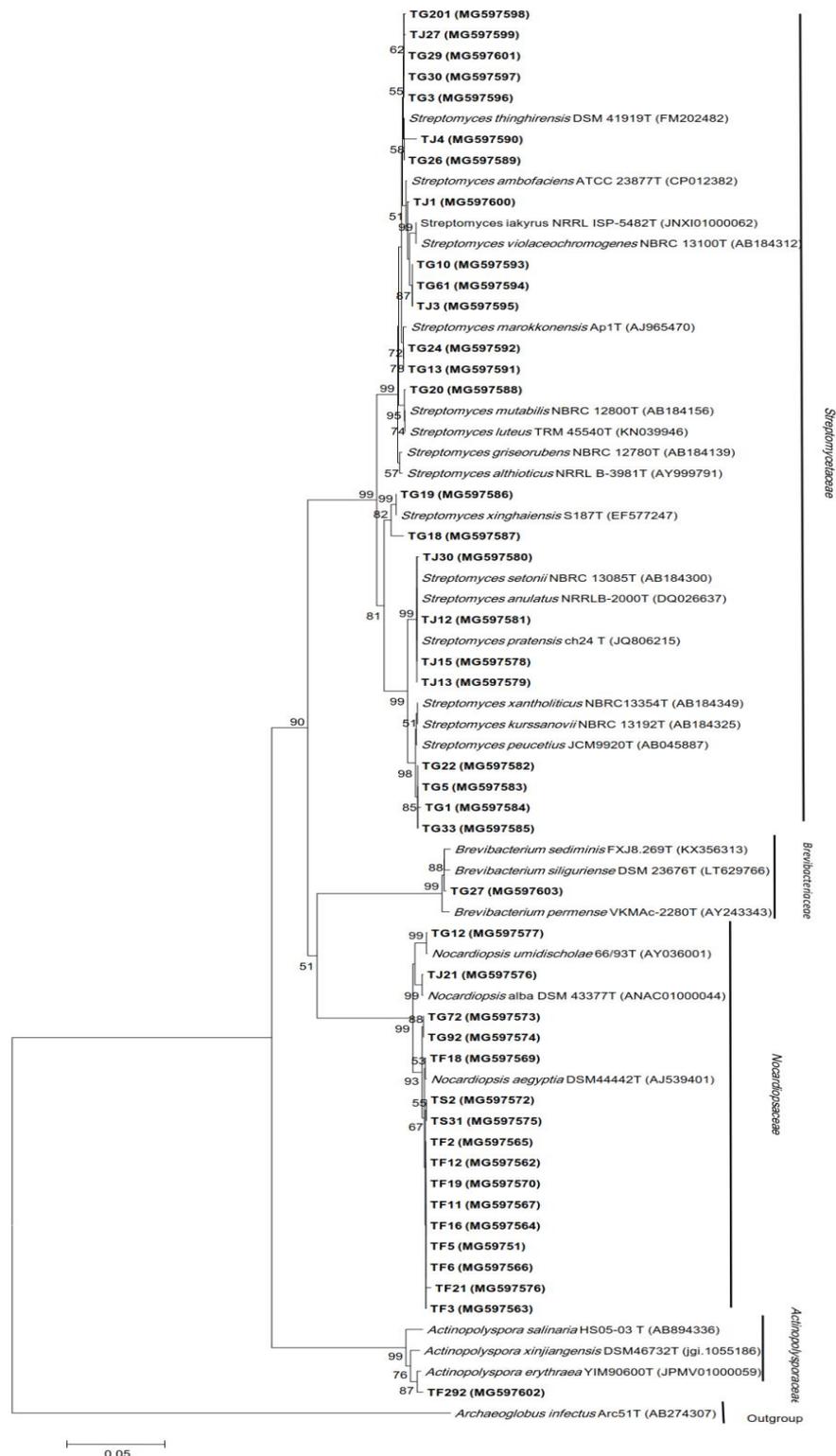


Figure 10 : Arbre phylogénétique enraciné construit par la méthode de Neighbor-Joining montrant la relation des isolats du site Tinsilt avec les espèces les plus proches des genres *Streptomyces*, *Nocardioopsis*, *Brevibacterium* et *Actinopolyspora*. Les valeurs de Bootstrap supérieures à 50% (après 1000 répliquions) sont représentées sur les noeuds. Les numéros d'accèsion de chaque séquence sont représentés entre parenthèses. *Archaeoglobus infectus* Arc51^T est utilisée comme outgroup. L'échelle 0,05 représente le nombre de substitution par position de nucléotide et estime la divergence des séquences. TJ, TG, TF et TS sont les isolats des concentrations de 2%, 5%,10% et 15%, respectivement.

Annexe 9. Tableaux détaillés des résultats du nombre de microorganismes isolés.

Sites d'étude	Echantillons	Nombre des actinobactéries $\times 10^4$ en UFC/g			
		NaCl en %			
		2	5	10	15
Sebkha d'ezzemoul	EE ₁	2,7	0,5	3,05	0
	EE ₂	8,6	4,75	3,7	0
	EE ₃	0	0	0	0
Chott Tinsilt	TE ₁	186	40,8	15,8	0
	TE ₂	0	205	306	0
	TE ₃	0	0	0,1	1,5
Sebkha de Djendli	DE ₁	3,8	22	0	0
	DE ₂	100	50,1	10	0
	DE ₃	0,2	1	0	0

Sites d'étude	Echantillons	Nombre des autres bactéries $\times 10^5$ en UFC/g			
		NaCl en %			
		2	5	10	15
Sebkha d'ezzemoul	EE ₁	13	6,77	2,98	0,4
	EE ₂	5,92	0,55	0,38	0,1
	EE ₃	7,47	30,5	0	0,02
Chott Tinsilt	TE ₁	47,1	6,22	2,6	0,002
	TE ₂	1600	23,8	34,6	0,6
	TE ₃	326	0,96	3,8	0,03
Sebkha de Djendli	DE ₁	0,53	24,7	0,1	1,23
	DE ₂	0,24	80	1	0
	DE ₃	912	485	0,8	0,47

Sites d'étude	Echantillons	Nombre des champignons $\times 10^5$ en UFC/g			
		NaCl en %			
		2	5	10	15
Sebkha d'ezzemoul	EE ₁	38	2,89	0,28	0
	EE ₂	5,5	87,2	0,33	0
	EE ₃	1,05	142	1,07	0
Chott Tinsilt	TE ₁	0,18	74,1	0,15	1,8
	TE ₂	0	33,6	3,55	0
	TE ₃	0,5	10,7	0,01	0,04
Sebkha de Djendli	DE ₁	5,05	53	2,81	0,5
	DE ₂	0,2	0,36	6	1,26
	DE ₃	0	67,3	6,11	2,4

PUBLICATION



Diversity of actinobacteria in the marshes of Ezzemoul and Djendli in northeastern Algeria

Maria Smati^{1*}, Mahmoud Kitouni¹

¹Biotechnologie et valorisation microbienne des écosystèmes extrêmes, Laboratoire de génie microbiologique et applications, Université des Frères Mentouri Constantine 1, Campus Chaâbat Erssas, Route Ain El Bey, 25000 Constantine, Algeria
Corresponding author, Tel.: +213556210363, E-mail: mariasmati87@gmail.com

ABSTRACT

The main purpose of this research is to study the microbial diversity of actinobacteria, living in "Ezzemoul" and "Djendli" sebkhas soils. These salt lakes are situated in the east of Algeria and they are microbiologically underexploited. Such unexplored ecological niches have been considered by many authors as sources of novel actinobacteria and bioactive molecules. Actinobacteria play an important role in safeguarding the environment by improving plant growth through nitrogen fixation, biodegradation, and bioremediation. Therefore, studying the diversity and distribution of actinobacteria in such special environments is important for determining the ecological and biotechnological roles of these microorganisms. In this article, we focused on the occurrence and the diversity of actinobacteria from sebkhas using two techniques: cultural and culture-independent (molecular cloning). The latter are based on phylogenetic analysis of the 16S rDNA gene. Thus, the cultural method allowed us to obtain 62 isolates: 40 from the "Ezzemoul" site and 22 from the "Djendli" site. These isolates tolerate mainly 2, 5, and 10% sodium chloride (NaCl) and belong to the genera *Nocardiopsis*, *Streptomyces*, and *Rhodococcus*. Moreover, the molecular cloning gave us 39 clones. Twenty-four clone sequences from "Ezzemoul" site are affiliated to the genera *Demequina*, *Plantactinospora*, *Friedmanniella*, and *Mycobacterium*. Also, 15 clone sequences from "Djendli" site are related to the genera *Marmoricola*, *Phytoactinopolyspora*, *Streptomyces*, and to an unclassified actinobacterial clone. Some sequences from both sites are related to uncultured clones. In addition to the data provided by the cultural method, molecular cloning allowed us to have additional information about the unknown actinobacteria, uncultured ones as well as on the genera that exist in both sites. So, the cultural method is complementary to the culture-independent one, and their combination revealed an important diversity in targeted saline environments. Furthermore, all new isolated strains that tolerate 10% NaCl may have a very interesting biotechnological potential in the future.

KEYWORDS

Actinobacteria; sebkha; culture; cloning; 16S rRNA gene; phylogenetic biodiversity

 © 2019 Maria Smati, Mahmoud Kitouni

This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs license

INTRODUCTION

Actinobacteria especially actinomycetes are ubiquitous microorganisms. They are mainly prevalent in the soil (Oskay et al. 2004). These bacteria are responsible for the degradation of organic matter and produce many bioactive compounds (Naikpatil and Rathod 2011) such as vitamins, enzymes, antiparasitics, antivirals, immunostimulants, immunosuppressants, nutrients, and cosmetic products. They are well known for the production of antibiotics. Around 80% of the latter in the world come from actinomycetes mainly from the genus *Streptomyces* (Pandey et al. 2004). Several recent studies in Algeria have proved the importance of certain *Actinobacteria* in aflatoxin B1 reduction (Lahoum et al. 2017), enzyme production (Gasmi and Kitouni 2017), and fungicide degradation (Hocinat and Boudemagh 2015). Among the *Actinobacteria*, those that

are halophilic or halotolerant create interest in both taxonomic and biotechnological point of view.

Extreme ecosystems, not or a little bit exploited, represent a coveted field of research where rare or new microbial species that may have an interesting production potential are targeted. Wetlands are biologically one of the most important and the most productive ecosystems in the world (Bedford et al. 1999). There are several important wetlands in Algeria like chotts, sebkhas, or salt lakes. Among them, 50 have an international importance and they are classified as Ramsar sites. Most of them are endorheic and are qualified for their wide variety of species (Balla 2012).

In this research, we studied *Actinobacteria* in two sites: the Ezzemoul and Djendli sebkhas, which are parts of the "Hauts Plateaux" region. It is located in the northeast of the country. This region is characterized by a semiarid climate. So,

this type of climate causes the salinization of soil (Rengasamy 2006).

The wetlands that have been chosen for this research are a bit studied and not still very detailed, except some pedological studies (Chenchouni 2009; Aliat et al. 2016) and several others studying the diversity of fauna (Aberkane 2014; Bellagoune 2015), flora (Chenchouni 2009; Neffar et al. 2016), and certain halophilic microorganisms (Kharroub 2007), including actinomycetes (Kitouni et al. 2005; Boughachiche et al. 2016).

Until now, there is little or no research on the taxonomy of *Actinobacteria* in the ecosystems chosen for this study. According to Vartoukian et al. (2010), most of the microorganisms that can be observed in the environment are generally not cultivated by using traditional culture techniques; and thus, the majority of the microflora remains undetected. This limitation can be solved by the application of culture-independent methods to reveal the presence of non-culturable populations and estimate microbial diversity in nature (Cocolin et al. 2013; Hozzein 2015). Nevertheless, culture remains useful for understanding the metabolism and functions of microorganisms (Pham et Kim, 2012). Therefore, the main aim of this article is to explore the actinobacterial biodiversity in the soil of the Ezzemoul and Djendli sebkhas, using cultural and culture-independent (the culture-independent approach is molecular cloning) approaches. These two approaches are based on phylogenetic analysis of the 16S rDNA gene.

1. MATERIALS AND METHODS

1.1. Sampling

According to the Pochon and Tardieux (1962) method, six soil samples were taken in the northeastern region of Algeria from two different sites: the Ezzemoul sebkha (latitude: 35° 53' 14" North, longitude: 06° 30' 20" East) and the Djendli sebkha (latitude: 35° 43' 15" North, longitude: 06° 32' 23" East). Samples were frozen in the field and stored during transport on dry ice for molecular work. Those intended for the other works were kept at 4°C.

1.2. Physicochemical analysis of samples

According to referenced methods, three samples of soil from each site were subjected to physicochemical analyses of pH (Pochon and Tardieux 1962), of electrical conductivity (EC) (Richards 1954), of moisture and organic matter content (Lee and Hwang 2002), and of particle size (Dupain et al. 2000).

1.3. Isolation, enumeration, and conservation of *Actinobacteria*

After drying, 2 g of soil of each sample were diluted four times in sterile physiological water (NaCl 9 g/L) and homogenized. Each dilution (100 µL) was spread on the surface of ISP5 medium (Shirling and Gottlieb 1966) supplemented with 2, 5, 10, and 15% NaCl in order to target the slight, moderate, and extreme halophilic actinomycetes; an antifungal agent (nystatin at 50

µg/L) and an anti-Gram-negative antibacterial agent (polymyxin at 20 µg/L). Petri dishes were incubated at 30 °C for 3 weeks. Actinobacterial colonies were enumerated using an automatic counter and estimated in CFU/g. They were purified and stored at -20°C on the same antibiotic-free isolation medium and in the presence of 50% (v/v) glycerol.

1.4. Genomic DNA extraction and 16S rDNA amplification of actinobacterial isolates

From the genomic DNA extracted by heat shock technique (Queipo-Ortuño et al. 2008), the gene 16S rDNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR), using the universal primers 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-GGT-TACCTTGTACGACTT-3') (Lane 1991). The PCR was carried out in a thermocycler (Eppendorf) in a final volume of 25 µL containing 16.35 µL of sterile pure water (Sigma Life Science), 2.5 µL of the 10X buffer with 15 mM magnesium chloride (MgCl₂) (Roche), 2 µL (2.5 mM) deoxynucleoside triphosphate (dNTP) (Roche), 2 µL (10 µM) of each primer (GATC Biotech), 0.15 µL of AmpliTaq DNA polymerase 5U/µL (Roche), and 2 µL of extracted DNA. The PCR program is as follows: 4 min at 95°C (initial denaturation), followed by 30 cycles of 30 s at 94°C (denaturation), 1 min at 54°C (hybridization), 1 min at 72°C (elongation), and then 10 min at 72°C (final elongation).

1.5. Environmental DNA extraction, actinobacterial 16S rDNA amplification, and cloning

The whole DNA was extracted from 500 mg of each soil sample using the FastDNA™ Spin Kit for Soil and the FastPrep® instrument (MP Biomedicals) according to the manufacturer's recommendations. The extracted DNA was purified using the Illustra™ MicroSpin™ S-400 HR Columns Kit (GH Healthcare), according to the manufacturer's instructions. The 16S rDNA gene (approximately 640 bp) was amplified by PCR using actinobacterial specific primers S-C-Act-235-a-S-20 (5'-CGCG-GCCTATCAGCTTGTG-3" forward) and S-C-Act-878-a-A-19 (5'-CCGTACTCCCCAGGCGGGG-3', reverse) (Stach et al. 2003). The PCR mixture (50 µL) contains 37.7 µL of sterile pure water (Sigma Life Science), 5 µL of the 10X buffer with 15 mM MgCl₂ (Roche), 2 µL (500 µg/µL) T4gp32 Bulk (MP Biomedicals), 1 µL (10 mM) of dNTP (Thermo Fisher Scientific), 1 µL (10 µM) of each primer (Eurofins Genomics), 0.3 µL of AmpliTaq DNA polymerase 5U/µL (Roche), and 2 µL of purified extracted DNA. The amplification was carried out using the touchdown protocol: 4 min at 95°C (initial denaturation), 10 cycles (during which the hybridization temperature decreased by 0.5°C/cycle): 45 s at 95°C (denaturation), 45 s at 72°C (hybridization), and 1 min at 72°C (elongation), followed by 20 other cycles with the same preceding steps except that the hybridization temperature was 68° C, and then 5 min at 72°C (final elongation). Two separate PCR amplifications were performed for each sample. Their products were pooled and purified by the GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. The pooled and purified amplicons were first cloned using the pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems

(Promega) using the pGEM[®]-T Vector and *E. coli* JM109 high-efficiency chemical-competent cells, according to the manufacturer's recommendations. Second, cloning was carried out using TOPO[®] TA Cloning[®] Kit for Sequencing (Invitrogen, Life Technologies) with *E. coli* electro-competent cells (One Shot[®] DH5 α [™]-T1R) according to the manufacturer's instructions. All positive clones were selected and examined by colony PCR using the vector-specific primers.

1.6. Purification, sequencing, and sequences analysis

The PCR products from the cultural and culture-independent methods were purified according to the protocol of the Illustra[™] ExoStar[™] 1-Step Kit (GE Healthcare, Life Sciences) and sequenced. Sequencing was conducted in the sequencer (AB3730, 48 capillaries, Applied Biosystems) according to the Big Dye Terminator protocol Kit ver.3.1 (Applied Biosystems).

All sequences were analyzed by ChromasPro software ver.1.5 (Technesium Pty Ltd). Clone sequences were analyzed and corrected manually. Primers and vector sequences were eliminated, and the chimeric sequences were verified by DECIPHER's Find Chimeras online tool (Wright et al. 2012). Non-chimeric sequences were compared to other sequences in the EzBioCloud database (Yoon et al. 2017) as well as to GenBank of the NCBI site by the BLAST program (Altschul et al. 1990). Multiple alignment of sequences was achieved by the CLUSTAL X 2.0.12 program (Larkin et al. 2007). The results of multiple alignment by the CLUSTAL X program of the 16S rDNA gene sequences showed that the sequences did not have the same length. This required manual corrections before their use by the MEGA software, which uses the algorithm of progressive multiple alignment CLUSTAL W. It has been proved that the quality of the alignment could have an impact on the final tree. So, it is as important as the method of construction used and it can be more important (Ebihara et al. 2006). The preparation of an alignment of quality is, therefore, a critical step in any phylogenetic analysis. The rooted phylogenetic trees were constructed with the MEGA ver.6.0.6 program (Tamura et al. 2013). According to the neighbor-joining method (Saitou and Nei 1987), the distance matrix was computed according to the Kimura model with two parameters (Kimura 1980). Topology of trees was evaluated by bootstrap analysis with 1000 replicates (Felsenstein 1985).

All actinobacterial sequences appear in GenBank with accession numbers MG597500 to MG597561 for cultivated isolates and MG601182 to MG601220 for uncultured clones.

2. RESULTS

2.1. Physicochemical analyses of soil samples

The average values of the physicochemical characteristics of the soil samples of the Ezzemoul and Djendli sebkhas are presented in Table 1.

Referring to the pH interpretation scale (Gagnard et al. 1988) and EC values (Richards 1954), the soils of the Ezzemoul and Djendli sebkhas are alkaline and extremely salty. According to the Lee and Hwang (2002) classification, our soils are characterized by low rates of moisture and organic matter. According to the triangle of mineral textures (Eswaran et al. 2002), the texture of these soils is silty-clayey-sandy.

2.2. Enumeration of actinobacterial isolates

The average values of the number of *Actinobacteria* that developed on the ISP5 culture medium containing different concentrations of salt (Table 2) vary from 0 to 34.7×10^4 (CFU/g) in "Djendli" site and are higher than those of "Ezzemoul" site, which vary from 0 to 5.65×10^4 (CFU/g). However, the total number of colonies that could have been purified and stored for this study is higher in the Ezzemoul site (40) than that in the Djendli site (22). In both sites, no colony was counted at 15% NaCl concentration. The greatest number of *Actinobacteria* was observed at 2% NaCl concentration.

2.3. Phylogenetic analysis of actinobacterial isolates

The 16S rRNA genes of 62 actinobacterial isolates were sequenced: 40 of "Ezzemoul" sebkha and 22 of "Djendli" sebkha. Sequence analysis of "Ezzemoul" site (Figs 1 & A1) revealed the presence of three genera: *Nocardiopsis*, *Streptomyces*, and *Rhodococcus*. The genus *Nocardiopsis* dominates with 95% of isolates, which belong to four different species.

Thus, almost half of the isolates are affiliated to the *N. dassonvillei* species with identity percentages of 98.38–99.93%, followed by 35% of *N. lucentensis* with 99.35–100% identity, 10% of *N. aegyptica* with 99.07–99.57% identity, and 2.5% (one isolate) of *N. synnemataformans* (with 100% identity).

The identity percentage 98.38% of isolate ED43 with *N. dassonvillei* is below the threshold 98.7% that separates the new species (Stackebrandt and Ebers 2006). Thus, this isolate could represent a new taxon of the *Nocardiopsis* genus.

Single isolates ES72 and ES42 are related respectively to *R. corynebacterioides* species of the genus *Rhodococcus* (with 99.49% identity) and *S. cavourensis* species of the genus *Streptomyces* (with 99.42% identity).

Table 1. Physicochemical characteristics of soil samples

Study sites	pH	Electrical Conductivity (EC) (dS/m)	M* (%)	O.M† (%)	Sand (%)	Silt (%)	Clay (%)
Ezzemoul sebkha	8.56	16.26	6.01	6.03	52.76	22.39	24.85
Djendli sebkha	8.03	11.57	6.16	5.82	30.97	32.7	36.33

*M: moisture; †O.M: organic matter

Table 2. Enumeration of the Actinobacteria isolated from “Ezzemoul” and “Djendli” sebkhas depending on the concentrations of NaCl added to the ISP5 medium

Study sites	ISP5 supplemented with NaCl in %	Number of Actinobacteria × 10 ⁴ (CFU/g)
Ezzemoul sebkha	2	5.65 (16)*
	5	2.62 (4)*
	10	3.37 (20)*
	15	0
Djendli sebkha	2	34.7 (11)*
	5	24.4 (11)*
	10	3.33 (0)
	15	0

*Values in brackets represent the number of purified and preserved colonies

The sequences' analysis of the Djendli site (Figs 1 & A2) detected the same genera *Nocardiopsis* and *Streptomyces* already found in the Ezzemoul site, except that in the Djendli site it is the genus *Streptomyces* that dominates with 81.82% of the isolates. The latter are divided into six different species: *S. xantholiticus* (27.27%), *S. albidoflavus* (18.18%), *S. thinghirensis* (18.18%), *S. marokkensis* (9.1%), *S. philanthi* (4.54%), and *S. violascens* (4.54%). Identity percentages of isolates with these species are respectively 99.21–99.43%, 99.71%, 99.55–100%, 98.98–99.78%, 99.54%, and 99.5%.

In addition to its presence in the Ezzemoul site, the species *N. aegyptica* of the genus *Nocardiopsis* is also detected in the Djendli site and is related to 18.18% of the isolates with 99.71–99.79% identity.

2.4. Phylogenetic analysis of actinobacterial clones

Due to an insufficient number of recombinant colonies, we have used two methods of cloning. Twelve clones are from the first method (using the pGEM[®]-T vector) and 48 are from the second method (using the pCR[®]4Blunt-TOPO[®] vector). The total of 60 clones was sequenced and subjected to phylogenetic analysis, based on 16S rDNA. Twenty-one chimeric sequences were removed from the study. All sequences could be regrouped into seven families of Actinobacteria: *Demequinaceae*, *Streptomycetaceae*, *Micromonosporaceae*, *Jiangellaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Propionibacteriaceae*, and *Nocardioidaceae*. Adding to that, there is a group of unclassified Actinobacteria and two clusters composed of members do not belong to the class Actinobacteria (Figs 2 & A3).

The 24 clones derived from the soil of Ezzemoul (EZ) site are affiliated to uncultured clones (20.83%) and the following four genera: *Demequina* (dominant with 62.5%), *Friedmanniella* (4.16%), *Mycobacterium* (4.16%), and *Plantactinospora* with 12.5%. The latter corresponds to clones EZ1, EZ10, and EZ16, which are related to the clone obtained from the alkaline saline soil of Lake Texcoco in Mexico (Valenzuela-Encinas et al. 2009). These genera belong respectively to the different families: *Demequinaceae*, *Propionibacteriaceae*, *Mycobacteriaceae*,

and *Micromonosporaceae*. 16.16% do not belong to the class of Actinobacteria (cluster I and II) (Figs 2 & A3).

Concerning the soil of the Djendli (DJ) site and from 15 clones, three genera were detected: *Marmoricola* (13.33%), *Phytoactinopolyspora* (6.66%), and *Streptomyces* (6.66%). They belong respectively to the families: *Nocardioidaceae*, *Jiangellaceae*, and *Streptomycetaceae*. The clone DJ77 (6.66%) is an unclassified actinobacterium. These results, and in particular those of genera, are very different from those found in the Ezzemoul site. Contrary to the latter, more than half of the clones (66.66%) of the Djendli site do not belong to the class Actinobacteria (cluster I and II) and the majority of them (73.33%) are linked to uncultured clones (Figs 2 & A3).

3. DISCUSSION

The physicochemical analysis (Table 1) showed that the soils of “Ezzemoul” and “Djendli” sebkhas are mainly characterized by their very high salinity and their alkaline pH. The phenomenon of salinization is not only due, chiefly, to the rarity of the rain that is used to transport the salts, but also to the high rates of evaporation that are characteristic of regions with arid and semiarid climate. These soils are also silty-clayey-sandy and have low rates of moisture and organic matter. In general, our results are consistent with those reported by Chenchouni (2009) and Aliat et al. (2016). The physicochemical characteristics may act as potential factors influencing the number, growth, and composition of the actinobacterial community in the studied soils.

After isolation and counting of actinobacteria (Table 2), it is 2% NaCl concentration that allowed us to obtain the greatest number of bacteria in “Djendli” (34.7 × 10⁴ CFU/g) and “Ezzemoul” (5.65 × 10⁴ CFU/g) sebkhas. Forty viable actinobacteria were recovered from the salty soils of “Ezzemoul” and 22 from those of “Djendli.” Our results are higher than those found by Okoro et al. (2009) in salty soils of Chile, who used different recovery media. Also, our isolates tolerate only 2, 5, and 10% NaCl. It can therefore be concluded that the bacteria in this study are slight and moderate halophiles or halotolerants.

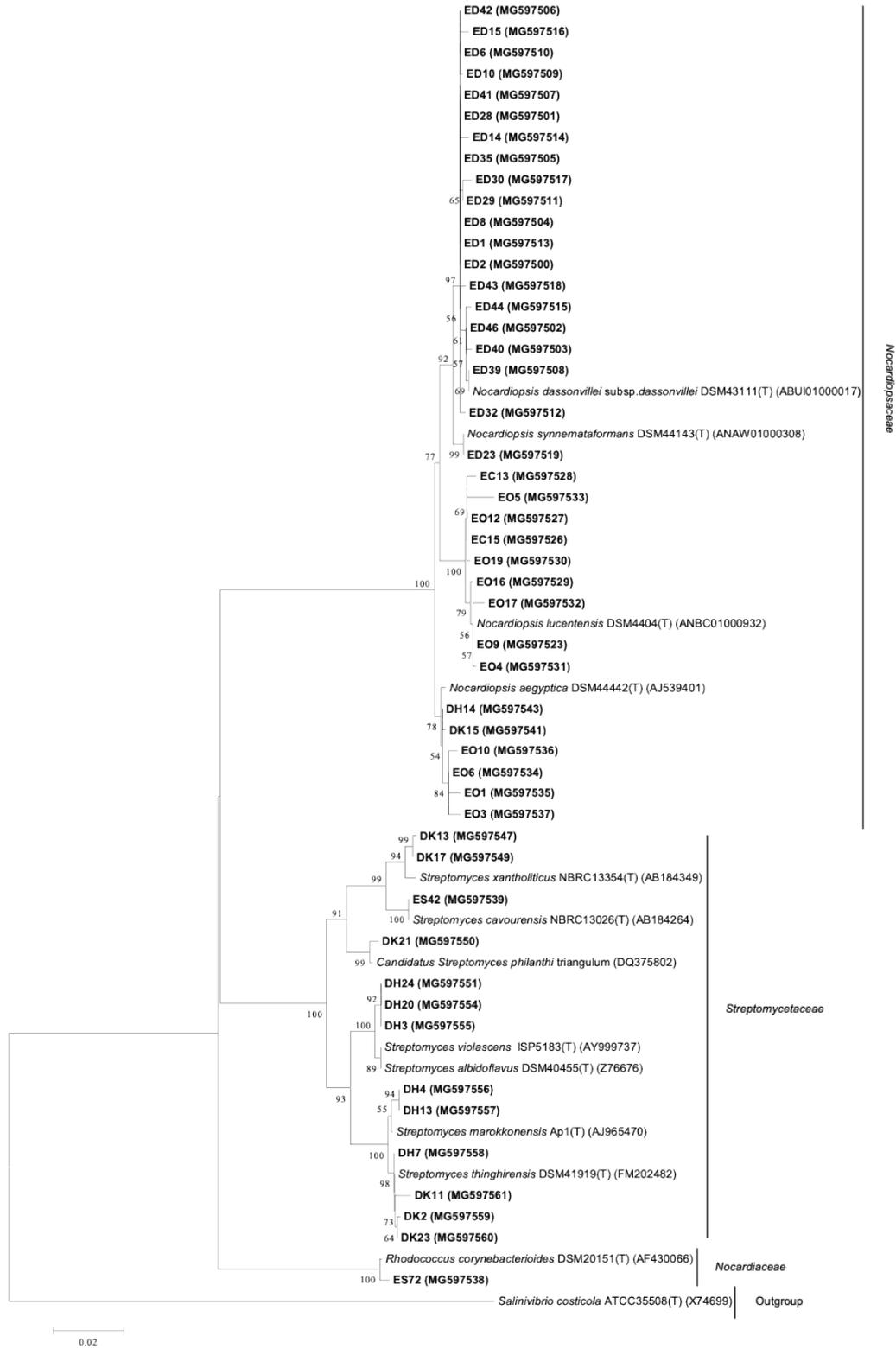


Figure 1. Neighbor-joining tree showing the phylogenetic relationships between the nearly complete 16S rRNA gene sequences isolated from “Ezzemoul” (EO, EC, ES, ED) and “Djendli” (DK, DH) sebkhass and their closely related sequences from the EzBioCloud database. The very close sequences are not represented on the tree. Bootstrap values above 50% (for 1000 replications) are shown. The scale bar indicates 0.02 substitutions per nucleotide position. (EO, DK), (EC, ES, DH), and ED are isolates from 2%, 5%, and 10% of NaCl concentrations, respectively. *Salinivibrio costicola* (X74699) is used as an outgroup.

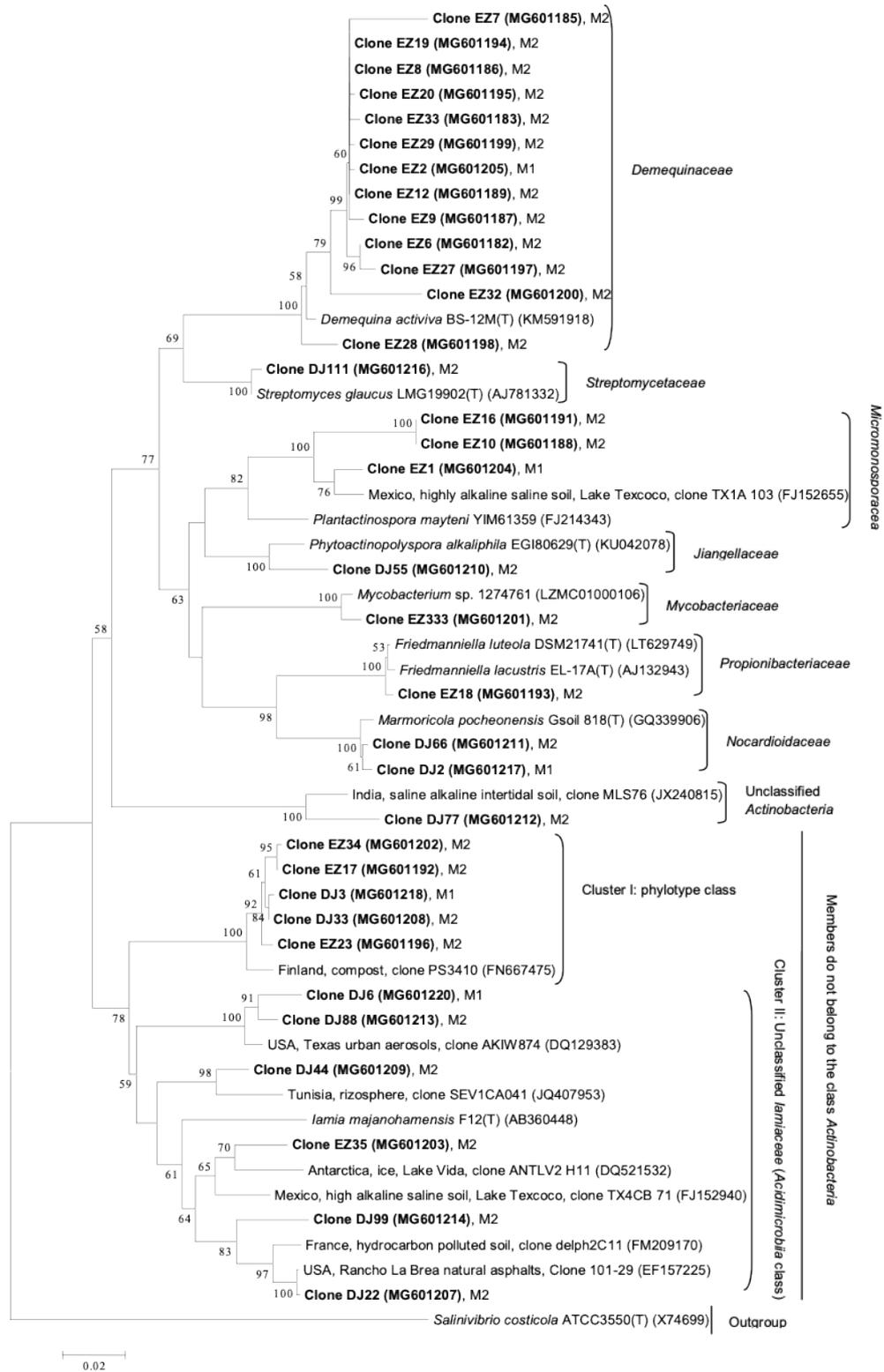


Figure 2. Neighbor-joining tree showing the phylogenetic relationships between the partial actinobacterial 16S rRNA gene sequences cloned from “Ezzemouli” (EZ) and “Djendli” (DJ) sebkh and their closely related sequences from the EzBioCloud database. The very close sequences are not represented on the tree. Bootstrap values above 50% (for 1000 replications) are shown. The scale bar indicates 0.02 substitutions per nucleotide position. M1 and M2 respectively represent the first and second cloning methods whose clones are derived. Salinivibrio costicola (X74699) is used as an outgroup.

The results of the cultural method and molecular cloning revealed the presence of several genera and groups of actinobacteria in the sites of Ezzemoul and Djendli. It should be noted that the species *Streptomyces thinghirensis*, *Candidatus Streptomyces philanthi*, and *Marmoricola pocheonensis*, identified from both methods, were detected for the first time in the extremely salty soils. After culture, phylogenetic analysis of the 16S rDNA sequences of “Ezzemoul” and “Djendli” isolates (40 and 22, respectively) showed the existence of three genera: *Nocardiopsis*, *Streptomyces*, and *Rhodococcus* (Figs 1, A1, & A2). In the salty soil of Ezzemoul (Figs 1 & A1) it is the genus *Nocardiopsis* that dominates with more than 90% of sequences. These sequences are represented by four species: *N. dassonvillei* (50% of sequences), followed by *N. lucentensis*, *N. aegyptica*, and *N. synnemataformans* with identity percentages ranging from 98.7 to 100%. The genus *Rhodococcus* represents a minority and is detected only in “Ezzemoul” site. On the other hand, in the salty soil of Djendli (Figs 1 & A2), it is the genus *Streptomyces* that dominates with more than 80% of the sequences. These sequences belong to six species: *S. xantholiticus*, *S. albidoflavus*, *S. thinghirensis*, *S. marokkensis*, *S. philanthi*, and *S. violascens* with identity percentages ranging from 99.21% up to 100%. Many species of *Nocardiopsis* are of a halotolerant nature, and they are isolated from desert soils and marine environments (Bennur et al. 2016). Those of *Streptomyces* can adapt to high salt concentrations in soils (Sudnitsyn 2009). Studies have reported that members of the genus *Nocardiopsis* were predominant in some desert soils in Algeria (Meklat et al. 2011) and in saline soil in China (Lv et al. 2006). Those of the genus *Streptomyces* were predominant in other saline soils in China (Cai et al. 2009) and in India (Jose and Jebakumar 2013). *Rhodococcus* species can occupy several habitats such as soil, water, air, plants, and animals. Some have been found in the marine environment (Li et al. 2012) and very few have been described in saline soils (Táncsics et al. 2017).

Regarding the culture-independent method, phylogenetic analysis allowed us to retain 39 clone sequences. In “Ezzemoul” sebkha (Figs 2 & A3), there are nearly 21% of uncultured clones and four genera: *Demequina*, *Plantactinospora*, *Friedmanniella*, and *Mycobacterium*. The genus *Demequina* has already been found by cultivation methods in the marine environments of South Korea (Park et al. 2016) and Japan (Hamada et al. 2013), in the saline soil of the Japanese mangrove (Matsumoto et al. 2010), in a salt marsh plant in Portugal (Fidalgo et al. 2016), and even in the permafrost of the Arctic Highlands of Norway (Finster et al. 2009). *Plantactinospora* species have been mainly isolated from Chinese plants (Guo et al. 2016). The genus *Friedmanniella* has been isolated in China from an unsalted soil (Zhang et al. 2013) and from various habitats in the world such as plants (Tuo et al. 2016), activated mud moss (Maszenan et al. 1999), sandstone (Schumann et al. 1997), air (Kim et al. 2016), hypersaline lake water (Lawson et al. 2000), and spiders and their webs (Iwai et al. 2010). The genus *Mycobacterium* is known for its pathogenicity in human beings and animals. It is mostly isolated from clinical specimens (Vasireddy

et al. 2016). Some are isolated from soil and water (Peeters et al. 2016). The species *M. algericum* has been discovered for the first time in Algeria in goat lung lesions (Sahraoui et al. 2011). In “Djendli” sebkha, there are three genera: *Marmoricola*, *Phytoactinopolyspora*, *Streptomyces*, and an unclassified actinobacterium (DJ77). Most clones are uncultured (over 70%). The genus *Marmoricola* comes from several places in the world such as the agricultural (*M. pocheonensis*) and forest soils (Dastager et al. 2008; Lee et al. 2016), the marine environment (Maszenan et al. 1999), marble (Urzi et al. 2000), and volcanic ashes (Lee et al. 2011). The genus *Phytoactinopolyspora* was recently discovered in China. The known species are halotolerant. Some are isolated from saline soils (Ji et al. 2017) and others are derived from plants (Li et al. 2015). Several species of the genus *Streptomyces* were detected by the cultural method and only one (*S. glaucus*) was found by molecular cloning. Several clones in both sebkhas do not belong to the class *Actinobacteria* and are represented by two Clusters (Figs 2 & A3). Cluster I represents a phylotype that does not have a valid name yet. Ghai et al. (2013) suggested a new subclass “*Candidatus Actinomarinidae*” with an *Actinomarinales* order, which includes uncultured marine *Actinobacteria* with low GC%. However, this division does not still exist in the classification. Cluster II represents unclassified members of the family *Lamiaceae* of the class *Acidimicrobiia* belonging to the phylum *Actinobacteria* (Norris 2012). The members linked to these two clusters are not a part of the class *Actinobacteria*, whereas the primers used in this study are supposed to be specific to this class (Stach et al. 2003). This could be explained by the lack of specificity of these primers. This point has already been reported by Song et al. (2009), while other researchers (Piao et al. 2008) have found the efficiency of these primers.

The results obtained by the cultural method are clearly different from those achieved by the culture-independent method (molecular cloning) in the two study sites, except from the genus *Streptomyces* that was reported simultaneously by both methods in the Djendli site. Therefore, the cultural method is complementary to the culture-independent method and their combination can give a good description of the actinobacterial diversity in the salty soils of sebkhas. Based on the comparison of the two methods, our results may agree with those of other researchers (Borsodi et al. 2013) who studied the diversity of *Bacteria* and *Archaea* in saline environments.

4. CONCLUSIONS

This research was the first to study the diversity of *Actinobacteria* in “Ezzemoul” and “Djendli” sebkhas soils in Algeria by combining two methods: one cultural and the other by molecular cloning. Based on the 16S rRNA gene, our primary data indicated that the actinobacterial community is very diverse. Besides the genera *Streptomyces* and *Nocardiopsis* found in the two studied sites (with the probability of the presence of a new species of the genus *Nocardiopsis* in the Ezzemoul sebkha), many other different genera were detected with some

unknown members and not belonging to the class *Actinobacteria*. In addition, all our new isolates that tolerate 10% NaCl may be important candidates for biotechnological applications.

Acknowledgments

We thank Prof. A. Boulahrouf for helping us to do a part of this work in the Laboratory of Microbiological Engineering and Applications. We are very grateful to C. Monard, O. Lima, and F.

Binet of UMR 6553 ECOBIO (University of Rennes 1, France) for facilitating the realization of molecular work. This research was funded by the Ministry of Higher Education and Scientific Research, Algeria.

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Aberkane M (2014) Ecologie de la Sarcelle marbrée *Marmaronetta angustirostris* dans les zones humides de l'Est algérien. PhD thesis, Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria, (in French).
- Aliat T, Kaabeche M, Khomri H, et al (2016) A Pedological Characterisation of Some Inland Wetlands and Ramsar Sites in Algeria. *Land Degrad Dev* 27:693–705. doi: 10.1002/ldr.2467
- Altschul SF, Gish W, Miller W, et al (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410
- Balla A (2012) Synthèse écologique sur les zones humides algériennes d'importance internationale de "Sites Ramsar". PhD thesis, Batna University, Algeria, (in French).
- Bedford BL, Walbridge MR, Aldous A (1999) Patterns in Nutrient Availability and Plant Diversity of Temperate North American Wetlands. *Ecology* 80:2151–2169. doi: 10.2307/176900
- Bellagoune S (2015) Hivernage du Tadorne de Belon *Tadorna tadorna* (Anatidés) dans la sebkha de Djendli (Batna, Est algérien). PhD thesis, Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria, (in French).
- Bennur T, Ravi Kumar A, Zinjarde SS, Javdekar V (2016) *Nocardioopsis* species: a potential source of bioactive compounds. *J Appl Microbiol* 120:1–16. doi: 10.1111/jam.12950
- Borsodi AK, Felföldi T, Máthé I, et al (2013) Phylogenetic diversity of bacterial and archaeal communities inhabiting the saline Lake Red located in Sovata, Romania. *Extremophiles* 17:87–98. doi: 10.1007/s00792-012-0496-2
- Boughachiche F, Rachedi K, Duran R, et al (2016) Optimization of alkaline protease production by *Streptomyces* sp. strain isolated from saltpan environment. *Afr J Biotechnol* 15:1401–1412
- Cai Y, Xue Q, Chen Z, Zhang R (2009) Classification and salt-tolerance of actinomycetes in the Qinghai lake water and lakeside saline soil. *J Sustain Dev* 2:107–110
- Chenchouni H (2009) Place des argiles dans la caractérisation écopédologique du Chott de Djendli (Batna, Algérie) et mise en évidence de la relation salinité-répartition des halophytes, (in French). In: Proceedings of the 3rd Maghreb Symposium on Clays 'SMA. pp 23–25
- Cocolin L, Alessandria V, Dolci P, et al (2013) Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 167:29–43. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.008
- Dastager SG, Lee J-C, Ju Y-J, et al (2008) *Marmoricola bigeumensis* sp. nov., a member of the family *Nocardioideaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:1060–1063. doi: 10.1099/ijs.0.65576-0
- Dupain R, Lanchon R, Saint-Arroman JC (2000) Granulats, sols, ciments et bétons: caractérisation des matériaux de génie civil par les essais de laboratoire, (in French). Paris: Casteilla
- Ebihara H, Takada A, Kobasa D, et al (2006) Molecular Determinants of Ebola Virus Virulence in Mice. *PLOS Pathog* 2:e73. doi: 10.1371/journal.ppat.0020073
- Eswaran H, Rice T, Ahrens R, Stewart B. (2002) Soil classification: a global desk reference. Boca Raton: CRC Press
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783–791
- Fidalgo C, Henriques I, Rocha J, et al (2016) Culturable endophytic bacteria from the salt marsh plant *Halimione portulacoides*: phylogenetic diversity, functional characterization, and influence of metal(loid) contamination. *Environ Sci Pollut Res* 23:10200–10214. doi: 10.1007/s11356-016-6208-1
- Finster KW, Herbert RA, Kjeldsen KU, et al (2009) *Demequina lutea* sp. nov., isolated from a high Arctic permafrost soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:649–653. doi: 10.1099/ijs.0.004929-0
- Gagnard J, Huguet C, Ryser J-P (1988) L'analyse du sol et du végétal dans la conduite de la fertilisation. Le contrôle de la qualité des fruits, (in French).
- Gasmi M, Kitouni M (2017) Optimization of chitinase production by a new *Streptomyces griseorubens* C9 isolate using response surface methodology. *Ann Microbiol* 67:175–183. doi: 10.1007/s13213-016-1249-8
- Ghai R, Mizuno CM, Picazo A, et al (2013) Metagenomics uncovers a new group of low GC and ultra-small marine Actinobacteria. *Sci Rep* 3:2471. doi: 10.1038/srep02471
- Guo X, Guan X, Liu C, et al (2016) *Plantactinospora soyae* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from soybean root [Glycine max (L.) Merr]. *Int J Syst Evol Microbiol* 66:2578–2584. doi: 10.1099/ijs.0.001088
- Hamada M, Tamura T, Yamamura H, et al (2013) *Demequina flava* sp. nov. and *Demequina sediminicola* sp. nov., isolated from sea sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:249–253. doi: 10.1099/ijs.0.039297-0
- Hocinat A, Boudemagh A (2015) Biodegradation of commercial Ortiva fungicide by isolated actinomycetes from the activated sludge. *Desalination Water Treat* 57:6091–6097. doi: 10.1080/19443994.2015.1022799
- Hozzein WN (2015) Biodiversity of Halophilic and Halotolerant Actinobacteria. In: DK Maheshwari, M Saraf (Eds.), *Halophiles Sus-*

- tainable Development and Biodiversity (pp.1-28). Switzerland: Springer International Publishing
- Iwai K, Aisaka K, Suzuki M (2010) *Friedmanniella luteola* sp. nov., *Friedmanniella lucida* sp. nov., *Friedmanniella okinawensis* sp. nov. and *Friedmanniella sagamiharensis* sp. nov., isolated from spiders. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:113–120. doi: 10.1099/ijms.0.007815-0
- Ji Y, Chunyu W-X, Li E-Y, et al (2017) *Phytoactinopolyspora halotolerans* sp. nov., a halotolerant actinobacterium isolated from a saline soil in Xinjiang, northwest of China. *Antonie Van Leeuwenhoek* 111:27–34. doi: 10.1007/s10482-017-0923-6
- Jose PA, Jebakumar SRD (2013) Phylogenetic appraisal of antagonistic, slow growing actinomycetes isolated from hypersaline inland solar salterns at Sambhar salt Lake, India. *Front Microbiol* 4:190. doi: 10.3389/fmicb.2013.00190
- Kharroub K (2007) Identification et étude moléculaire des bactéries et des archéobactéries aérobies halophiles de la sebkha Ezzemoul (Ain M'Lila). PhD thesis, Mentouri University, Constantine, Algeria, (in French)
- Kim S-J, Hamada M, Ahn J-H, et al (2016) *Friedmanniella aerolata* sp. nov., isolated from air. *Int J Syst Evol Microbiol* 66:1970–1975. doi: 10.1099/ijsem.0.000973
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:111–120. doi: 10.1007/BF01731581
- Kitouni M, Boudemagh A, Oulmi L, et al (2005) Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north–east of Algeria. *J Mycol Médicale-Journal Med Mycol* 15:45–51
- Lahoum A, Verheecke-Vaessen C, Bouras N, et al (2017) Taxonomy of mycelial actinobacteria isolated from Saharan soils and their efficiency to reduce aflatoxin B1 content in a solid-based medium. *Ann Microbiol* 67:231–237. doi: 10.1007/s13213-017-1253-7
- Lane DJ (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: E Stackebrandt, M Goodfellow (Eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (pp.115–175). New York: John Wiley and Sons
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, et al (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947–2948. doi: 10.1093/bioinformatics/btm404
- Lawson PA, Collins MD, Schumann P, et al (2000) New LL-diaminopimelic acid-containing actinomycetes from hypersaline, heliothermal and meromictic Antarctic Ekho Lake: *Nocardioides aquaticus* sp. nov. and *Friedmanniella* [correction of *Friedmanniella*] *lacustris* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* 23:219–229
- Lee JY, Hwang BK (2002) Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Can J Microbiol* 48:407–417. doi: 10.1139/w02-025
- Lee SD, Lee DW, Ko Y-H (2011) *Marmoricola korecus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:1628–1631. doi: 10.1099/ijms.0.025460-0
- Lee S-Y, Im W-T, Kang M-S, et al (2016) *Marmoricola ginsengisoli* sp. nov. and *Marmoricola pacheonensis* sp. nov. isolated from a ginseng-cultivating field. *Int J Syst Evol Microbiol* 66:1996–2001. doi: 10.1099/ijsem.0.000977
- Li J, Zhao G-Z, Long L-J, et al (2012) *Rhodococcus nanhaiensis* sp. nov., an actinobacterium isolated from marine sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 62:2517–2521. doi: 10.1099/ijms.0.038067-0
- Li L, Ma J-B, Abdalla Mohamad O, et al (2015) *Phytoactinopolyspora endophytica* gen. nov., sp. nov., a halotolerant filamentous actinomycete isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* F. *Int J Syst Evol Microbiol* 65:2671–2677. doi: 10.1099/ijms.0.000322
- Lv Z., Zhang L., Li Y, et al (2006) Biodiversity of halophilic actinomycetes of Cangzhou salty environments. , 26(1):1-6. *J Hebei Univ Nat Sci Ed* 26:1–6
- Maszenan AM, Seviour RJ, Patel BK, et al (1999) *Friedmanniella spumicola* sp. nov. and *Friedmanniella capsulata* sp. nov. from activated sludge foam: gram-positive cocci that grow in aggregates of repeating groups of cocci. *Int J Syst Bacteriol* 49 Pt 4:1667–1680. doi: 10.1099/00207713-49-4-1667
- Matsumoto A, Nakai K, Morisaki K, et al (2010) *Demequina salsinemo-ris* sp. nov., isolated on agar media supplemented with ascorbic acid or rutin. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:1206–1209. doi: 10.1099/ijms.0.012617-0
- Meklat A, Sabaou N, Zitouni A, et al (2011) Isolation, Taxonomy, and Antagonistic Properties of Halophilic Actinomycetes in Saharan Soils of Algeria. *Appl Environ Microbiol* 77:6710–6714. doi: 10.1128/AEM.00326-11
- Naikpatil SV, Rathod JL (2011) Selective isolation and antimicrobial activity of rare actinomycetes from mangrove sediment of Karwar. *J Ecobiotechnology* 3:48–53
- Neffar S, Chenchouni H, Si Bachir A (2016) Floristic composition and analysis of spontaneous vegetation of Sabkha Djendli in north-east Algeria. *Plant Biosyst - Int J Deal Asp Plant Biol* 150:396–403. doi: 10.1080/11263504.2013.810181
- Norris PR (2012) Class Acidimicrobia. In: M Goodfellow, P Kämpfer, HJ Busse, ME Trujillo, K Suzuki, W Ludwig, WB Whitman (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn (pp.1968–1969). New York: Springer
- Okoro CK, Brown R, Jones A, et al (2009) Diversity of culturable actinomycetes in hyper-arid soils of the Atacama Desert, Chile. *Antonie Van Leeuwenhoek* 95:121–133. doi: 10.1007/s10482-008-9295-2
- Oskay M, Tamer AU, Azeri C, et al (2004) International Conference on the Great Himalayas: Climate, Health, Ecology, Management and Conservation, Kathmandu, Organized by Kathmandu University and the Aquatic Ecosystem Health and Management Society, Canada. *Afr J Biotechnol* 3:441–446
- Pandey B, Ghimire P, Agrawal VP (2004) International Conference on the Great Himalayas: Climate, Health, Ecology, Management and Conservation, Kathmandu, Organized by Kathmandu University and the Aquatic Ecosystem Health and Management Society, Canada.
- Park S, Jung Y., Won S., Yoon J. (2016) *Demequina litorisediminis* sp. nov., isolated from a tidal flat, and emended description of the genus *Demequina*. *Int J Syst Evol Microbiol* 66:4197–4203. doi: 10.1099/ijsem.0.001335
- Peeters C, Depoorter E, Praet J, Vandamme P (2016) Extensive cultivation of soil and water samples yields various pathogens in

- patients with cystic fibrosis but not Burkholderia multivorans. *J Cyst Fibros* 15:769–775. doi: 10.1016/j.jcf.2016.02.014
- Pham VHT, Kim J (2012) Cultivation of unculturable soil bacteria. *Trends in Biotechnology* 30:475–484. doi: 10.1016/j.tibtech.2012.05.007
- Piao Z, Yang L, Zhao L, Yin S (2008) Actinobacterial Community Structure in Soils Receiving Long-Term Organic and Inorganic Amendments. *Appl Environ Microbiol* 74:526–530. doi: 10.1128/AEM.00843-07
- Pochon J, Tardieux P (1962) Techniques d'analyse en microbiologie du sol, (in French)
- Queipo-Ortuño MI, Colmenero JDD, Macías M, et al (2008) Preparation of Bacterial DNA Template by Boiling and Effect of Immunoglobulin G as an Inhibitor in Real-Time PCR for Serum Samples from Patients with Brucellosis. *Clinical and Vaccine Immunology* 15:293–296. doi: 10.1128/CVI.00270-07
- Rengasamy P (2006) World salinization with emphasis on Australia. *Journal of Experimental Botany* 57:1017–1023. doi: 10.1093/jxb/erj108
- Richards LA (1954) Diagnostic and improvement of saline and alkaline soils. U.S Department of agriculture, Washington D.C
- Sahraoui N, Ballif M, Zelleg S, et al (2011) *Mycobacterium algericum* sp. nov., a novel rapidly growing species related to the *Mycobacterium terrae* complex and associated with goat lung lesions. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:1870–1874. doi: 10.1099/ijs.0.024851-0
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454
- Schumann P, Prauser H, Rainey FA, et al (1997) *Friedmanniella antarctica* gen. nov., sp. nov., an LL-diaminopimelic acid-containing actinomycete from Antarctic sandstone. *Int J Syst Bacteriol* 47:278–283. doi: 10.1099/00207713-47-2-278
- Shirling EB, Gottlieb D (1966) Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol* 16:313–340
- Song Z, Zhi X, Li W, et al (2009) Actinobacterial Diversity in Hot Springs in Tengchong (China), Kamchatka (Russia), and Nevada (USA). *Geomicrobiol J* 26:256–263. doi: 10.1080/01490450902892373
- Stach JEM, Maldonado LA, Ward AC, et al (2003) New primers for the class *Actinobacteria*: application to marine and terrestrial environments. *Environ Microbiol* 5:828–841. doi: 10.1046/j.1462-2920.2003.00483.x
- Stackebrandt E, Ebers J (2006) Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol Today* 33:152–5
- Sudnitsyn II (2009) Specificity of actinomycetes in salt-affected soils. *Eurasian Soil Sci* 42:235–236. doi: 10.1134/S106422930902015X
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725–2729
- Táncsics A, Máthé I, Benedek T, et al (2017) *Rhodococcus sovatus* sp. nov., an actinomycete isolated from the hypersaline and heliothermal Lake Ursu. *Int J Syst Evol Microbiol* 67:190–196. doi: 10.1099/ijsem.0.001514
- Tuo L, Pan Z, Li F-N, et al (2016) *Friedmanniella endophytica* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from bark of *Kandelia candel*. *Int J Syst Evol Microbiol* 66:3057–3062. doi: 10.1099/ijsem.0.001146
- Urzi C, Salamone P, Schumann P, Stackebrandt E (2000) *Marmoricola aurantiacus* gen. nov., sp. nov., a coccoid member of the family *Nocardioideae* isolated from a marble statue. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:529–536
- Valenzuela-Encinas C, Neria-González I, Alcántara-Hernández RJ, et al (2009) Changes in the bacterial populations of the highly alkaline saline soil of the former lake Texcoco (Mexico) following flooding. *Extremophiles* 13:609–621. doi: 10.1007/s00792-009-0244-4
- Vartoukian SR, Palmer RM, Wade WG (2010) Strategies for culture of 'unculturable' bacteria. *FEMS microbiology letters* 309:1–7
- Vasireddy R, Vasireddy S, Brown-Elliott BA, et al (2016) *Mycobacterium arupense*, *Mycobacterium heraklionense*, and a Newly Proposed Species, "*Mycobacterium virginense*" sp. nov., but Not *Mycobacterium nonchromogenicum*, as Species of the *Mycobacterium terrae* Complex Causing Tenosynovitis and Osteomyelitis. *J Clin Microbiol* 54:1340–1351. doi: 10.1128/JCM.00198-16
- Wright ES, Yilmaz LS, Noguera DR (2012) DECIPHER, a Search-Based Approach to Chimera Identification for 16S rRNA Sequences. *Appl Environ Microbiol* 78:717–725. doi: 10.1128/AEM.06516-11
- Yoon S-H, Ha S-M, Kwon S, et al (2017) Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol* 67:1613–1617. doi: 10.1099/ijsem.0.001755
- Zhang X, Zhang J, Zhang Y, et al (2013) *Friedmanniella flava* sp. nov., a soil actinomycete. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:1771–1775. doi: 10.1099/ijse.0.043984-0

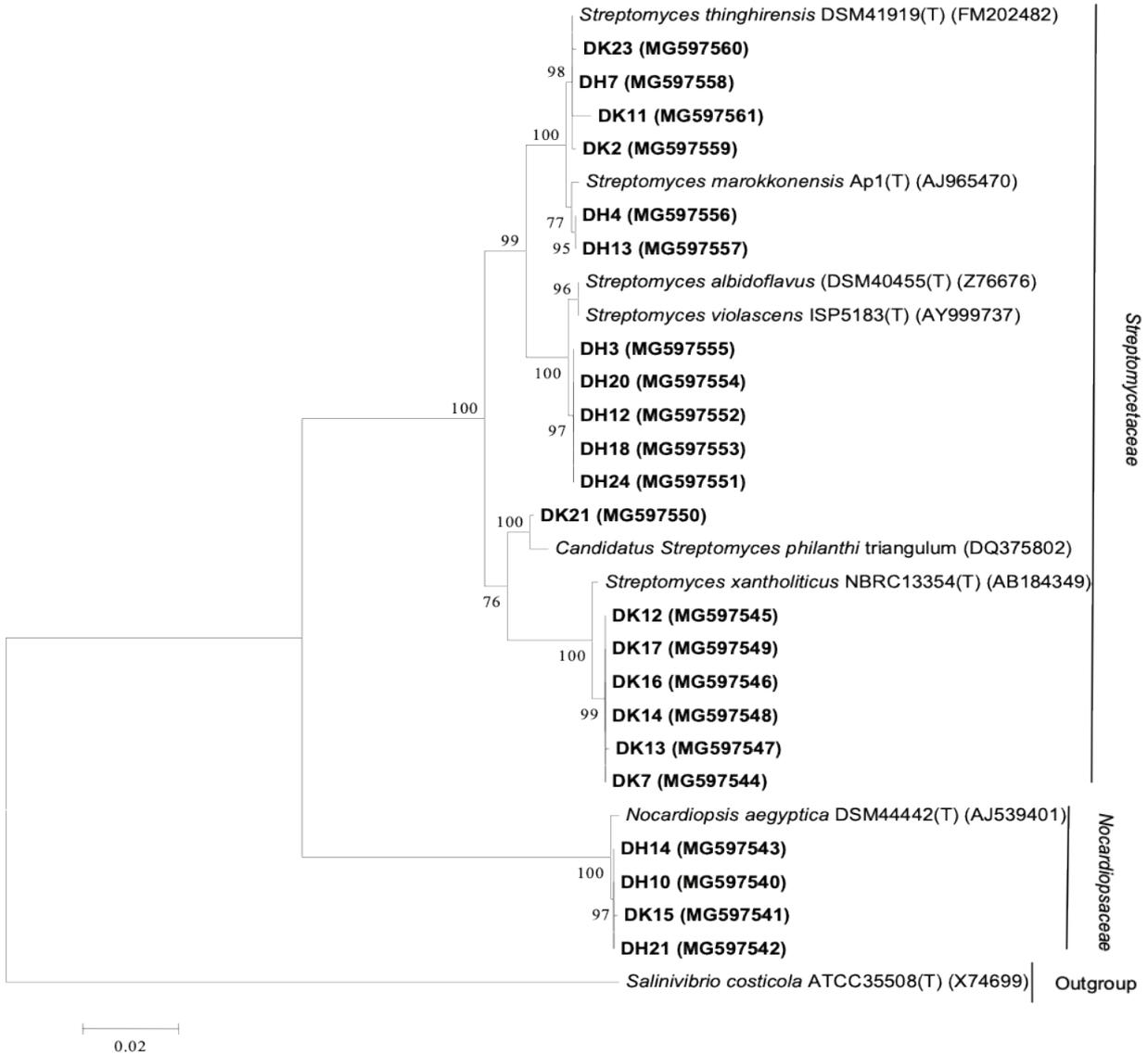


Figure A2. Neighbor-joining tree showing the phylogenetic relationships between the nearly complete 16S rRNA gene sequences isolated from "Djendli" sebkhha and their closely related sequences from the EzBioCloud database. All sequences are represented. Bootstrap values above 50% (for 1000 replications) are shown. The scale bar indicates 0.02 substitutions per nucleotide position. DK and DH are isolates from 2% and 5% of NaCl concentrations, respectively. *Salinivibrio costicola* (X74699) is used as an outgroup.

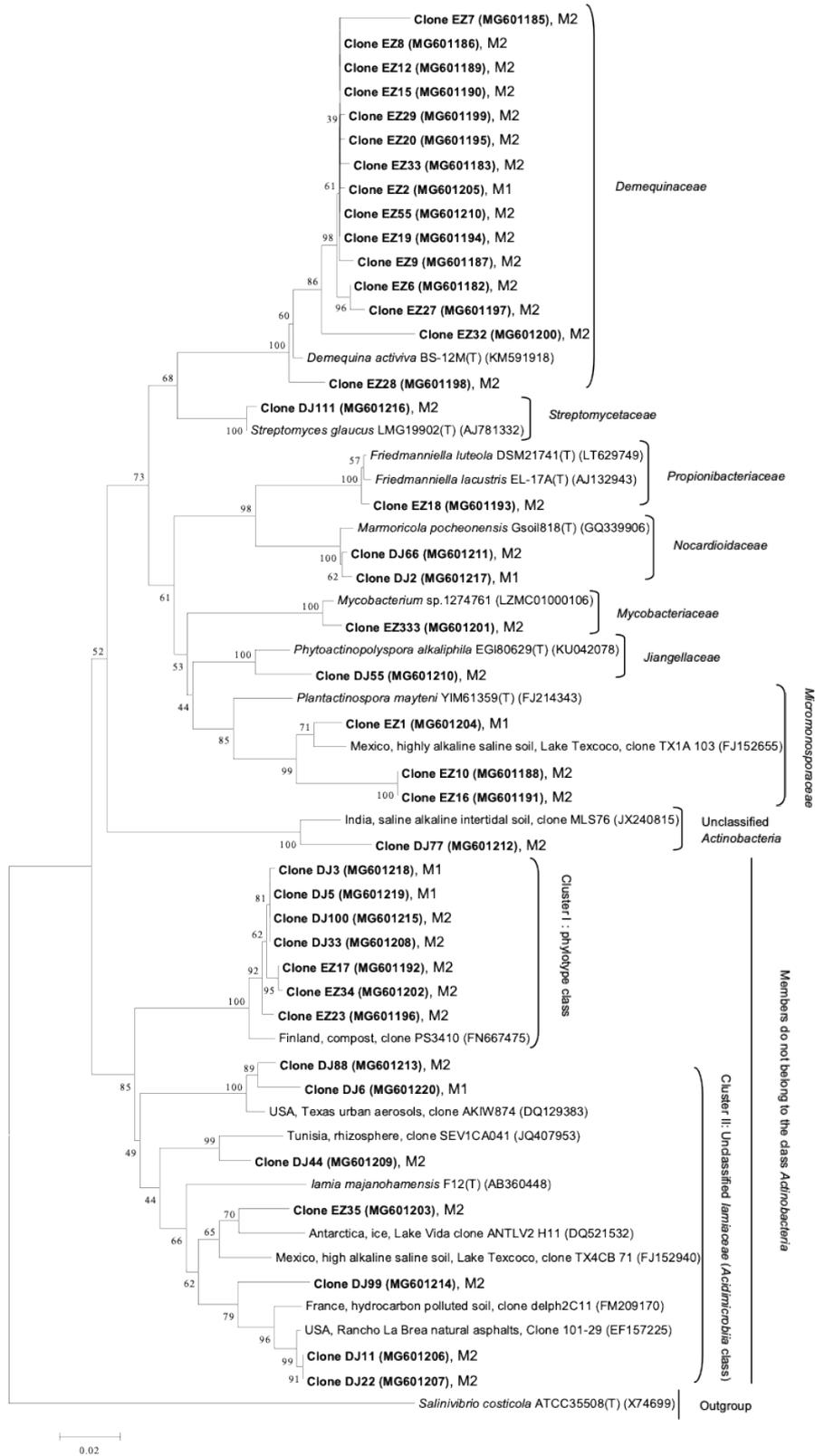


Figure A3. Neighbor-joining tree showing the phylogenetic relationships between the partial actinobacterial 16S rRNA gene sequences cloned from “Ezzemoul” (EZ) and “Djendli” (DJ) sebkhass and their closely related sequences from the EzBioCloud database. All sequences are represented. Bootstrap values above 50% (for 1000 replications) are shown. The scale bar indicates 0.02 substitutions per nucleotide position. M1 and M2 respectively represent the first and second cloning methods whose clones are derived. Salinivibrio costicola (X74699) is used as an outgroup.

*Thème :***Etude de la biodiversité des bactéries actinomycétales dans les zones humides d'Ezzemoul, Djendli et Tinsilt par des approches culturelles et moléculaires****Résumé**

Une combinaison de techniques culturale et indépendante de la culture (métagénomique par clonage moléculaire), a été utilisée pour étudier la biodiversité des actinobactéries halophiles et halotolérantes, vivant dans les sols de la sebkha d'Ezzemoul, du chott Tinsilt et de la sebkha de Djendli (situés dans le Nord-Est de l'Algérie). Ces écosystèmes sont principalement, extrêmement salés, alcalins, avec des taux faibles d'humidité. Selon l'analyse phylogénétique des séquences du gène de l'ADNr 16S : 40 isolats du site Ezzemoul sont assignés aux espèces des genres *Nocardiopsis* (dominant), *Streptomyces* et *Rhodococcus* ; 42 autres isolats du site Tinsilt sont attribués à *Streptomyces* (dominant), *Nocardiopsis*, *Actinopolyspora* et *Brevibacterium* ; et 22 isolats du site Djendli appartiennent aux mêmes genres *Streptomyces* (dominant) et *Nocardiopsis*. Parmi tous ces isolats, il y a une forte probabilité de la présence de nombreuses nouvelles espèces. De plus, 24 séquences de clones dérivées du site Ezzemoul, sont affiliées aux genres *Demequina* (dominant), *Plantactinospira*, *Friedmanniella* et *Mycobacterium*. Aussi, 15 séquences de clones issues du site Djendli, sont reliées aux genres *Marmoricola*, *Phytoactinopolyspora* et *Streptomyces* ; et à un clone d'actinobactéries non classifié. Certaines séquences (des deux sites) sont apparentées à des clones non cultivables et/ou n'appartenant pas à la classe *Actionbacteria* (dominants dans le site Djendli). Par ailleurs, les isolats obtenus à partir des trois sites d'étude, sont : halophiles et halotolérants modérés, mésophiles, neutrophiles ou acido-alcali-tolérants. Plusieurs d'entre eux peuvent produire en même temps, des enzymes extracellulaires hydrolytiques comme la cellulase, l'amylase, la lipase, la pectinase et les protéases ; ainsi que des molécules bioactives contre les bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*) et les champignons (*Candida albicans* et *Aspergillus niger*). Les résultats de cette recherche montrent une grande diversité taxonomique, physiologique et métabolique des actinobactéries, provenant de sebkhas et de chott. Ces bactéries peuvent donc, être d'excellentes candidates pour de futures applications biotechnologiques.

Mots clés : Biodiversité, lacs salés, actinobactéries halophiles, actinobactéries halotolérantes, métagénomique, clonage, biotechnologie.

Membres du jury :

Président :	Mr. BENHIZIA Yacine	Professeur	UFM Constantine 1
Directeur de thèse :	Mr. KITOUNI Mahmoud	Professeur	UFM Constantine 1
Examineur :	Mr. BOUDEMAGH Allaoueddine	Professeur	UFM Constantine 1
Examineur :	Mr. BELAHCEN Miloud	Professeur	C. U. Ain Témouchent