

*République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira de Bejaïa
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie*

Mémoire de fin de cycle

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Option : Biotechnologie Microbienne

Thème

*Caractérisation de substances antibiotiques produites
par des souches d'Archaea halophiles*

Membre du jury :

Président : M^f BOUKEROUL.

Promoteur : M^{me} IDRES N.

Examineur : M^f BENDJEDDOU K.

Examineur : M^{elle} LOUAILACHE

Présenté par :

M^{lle} TAMITI Dihia

PROMOTION 2012/2013

Remerciements

*Mes profonds remerciements sont adressés à ma promotrice M^{me}
IDRESS N. pour ces qualités d'encadrement.*

*Pour la même occasion je remercie l'équipe de recherche du
« Laboratoire de Génie Biologique » de m'avoir accueillie au sein
du laboratoire*

*Mes remerciements sont également adressés à Mr
BOUKEROUI, Le président du jury de soutenance qui m'a
honoré par sa présence de qualité*

*Je remercie chaleureusement M^r BENDJEDDOU K. et
M^{me} LOUAILACHE, d'avoir consacré leur temps pour examiner
et évaluer mon travail*

*Je remercie sincèrement toute personne ayant participé de près ou
de loin pour la réalisation de ce projet*

Dédicaces

Merci Allah de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir,

la

force d'y croire, la patience d'aller jusqu'au bout de mes efforts.

*Je dédie ce modeste travail à celle qui m'a donné la vie, le
symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma
réussite, à ma mère.*

A mon père, qui

m'a encouragé tout au long de ma vie, m'a protégé,

et a veillé à ce que je ne manque de rien.

Que Dieu les garde et les protège.

A mes adorables sœurs Shahla, Tiziri, Shania ainsi qu'à son mari

Samir et leur petit bout de chou de 1mois « Youba »

*A ma meilleure amie Djahida, qui a toujours été à mes côtés de
près ou de loin. A mes amies Sonia, Nadia et Yasmine qui ont
toujours su me redonner le sourire dans les moments d'angoisse.*

A tous ceux qui me sont chers.

A tous ceux qui m'aiment.

A tous ceux que j'aime.

Je dédie ce travail.

Sommaire

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1
Synthèse bibliographique	
I.Archaea	3
I.1. Ecologie	4
I.2.Principaux groupes d'Archaea	4
II.Microorganismes halophiles et Halophilisme	5
III.Archaea halophiles ou Haloarchées.....	6
III.1.Aspect biotechnologique des <i>Archaea</i> halophiles.....	8
III.2.Halocines.....	8
III.2.1.Spectre d'activité	10
Matériel et Méthodes	
I.Matériel	11
I.1. Matériel biologique	11
I.2. Appareillage et réactifs.....	11
I.3.Milieu de culture	11
II. Méthodes	12
II.1.Culture des souches d'Archées halophiles en milieu liquide	12
II.1.1Préparation de la pré-culture.....	12
II.1.2.Inoculation des Erlenmeyer	12
II.1.3.Estimation de la croissance	12
II.2.Détermination de l'activité antagoniste entre souches d'archées halophiles	12
II.2.1. Préparation du germe cible	12
II.2.2.Inoculation du germe cible en double couche	13

II.3.Stimulation de la production de substances antibiotiques	13
II.3.1.Par l'apport du milieu Br à différentes teneurs d'extrait de levure.....	13
II.3.2.Par l'ajout du milieu Br à différentes concentrations de NaCl	13
V.Caractérisation des substances antibiotiques produites	13
V.1.Etude de l'adsorption des halocines sur les cellules productrices.....	13
V.2.Etude de la stabilité des substances actives.....	15
Dessalage par filtration sur gel sephadex G25	15
VI.Caractérisation partielle des souches d'<i>haloarchaea</i> étudiées.....	16
VI.1.Dégradation de l'amidon, de la gélatine, et de la caséine par les souches étudiées	16
VI.2.Antibiogramme	16
Résultats et Discussion	
I.Détermination de l'antagonisme entre les souches d'archées halophiles	17
II.Stimulation de la production des halocines	19
II.1.Par l'apport de milieu Br, à différentes teneurs en extrait de levure.....	19
II.2.Par l'apport de milieu Br à différentes concentrations de NaCl	20
III.Caractérisation des substances actives produites par les souches SWO25 et SWO40...	21
III.1.Adsorption des halocines à la surface des cellules productrices	21
III.2.Effet du dessalage sur l'activité des halocines.....	21
V.Caractérisation biochimique des souches halophiles	21
V.1.Test d'hydrolyse de l'amidon, gélatine et caséine	21
V.2.Sensibilité aux antibiotiques	22
Conclusion	23
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumé	

Liste des abréviations

SWO : Salt Water Ouargla

Milieu Br : Milieu Brown

DO : Densité Optique

SC: Surnageant de Culture

EP : Extrait Protéique

nm : nanomètre

rpm : tours par minute

min: minute

mm : millimètre

% mole : pourcentage molaire

ZI : Zone d'inhibition

DSM : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen

YE: Yeast Extract

Liste des figures

Figure	Titre	Page
1	Arbre phylogénique universel	4
2	Phylogénie des <i>Archaea</i>	5
3	Extraction des protéines membranaires par adsorption/désorption dans les conditions acide/froid	14
4	Effet de l'apport du milieu Br sur la croissance et sur l'activité après 23h d'incubation	18
5	<i>Activités antibiotiques dans les surnageants de culture de SWO40 (à droite), et de SWO25 (à gauche) sur la DSM3754 après ajout du milieu neuf à 5g/l de YE</i>	18
6	Effet de l'apport du milieu Br à différentes concentrations de NaCl sur la croissance et la production d'halocine par la souche SWO32	19
7	Activité des surnageant(Sc) de culture et des extrait protéiques(EP) des souches SWO40 et SWO25	20
8	Activité des extraits protéiques membranaires des cultures de SWO40 ajustées à différents pH (1:pH 5, 2 : pH 6, 3 : pH 7, 4 : pH 8, T : Témoin pH 2)	21

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
I	Caractères généraux de quelques genres d'haloarchées	6
II	Caractéristiques des halocines	8
III	Les souches utilisées	11
IV	Antagonisme entre les souches	17
V	hydrolyse de gélatine, amidon et caséine par les souches étudiées	22
VI	Résultats des antibiogrammes des différentes souches d'archées halophiles	22

Introduction

Introduction

Partout dans le monde, les lacs salés et les marais salants possédant une concentration de NaCl égale ou proche de la saturation, ils sont habités par des communautés denses de bactéries halophiles (famille *Halobacteriaceae*). Des densités de 10^7 - 10^8 cellules et plus par ml sont monnaie courante. Leur haute teneur en caroténoïdes C-50 (α -bacteriorubérine et dérivés), confère une couleur rougeâtre aux saumures (Kis-Ppo et Oren, 2008).

Le mécanisme de tolérance au sel et l'halophilie ont été étudiés dans une certaine mesure. Les microorganismes halophiles élaborent une protection contre la forte concentration de Na^+ . On a rapporté qu'ils produisent certains produits biochimiques tels que la glycine bêtaïne qui agit comme soluté compatible pour les protéger contre la grande concentration en NaCl. L'enveloppe cellulaire et la membrane externe montrent des modifications de la composition en fonction de la force ionique du milieu extérieur (Kanekar *et al.*, 2012).

Les extrémophiles sont considérés comme un trésor de nouvelles biomolécules, de biomatériaux et de métabolites (Kanekar *et al.*, 2012), comme la bactériorhodopsine, qui est récemment appliquée à la bioénergétique et également à la nano-informatique, les solutés compatibles, les biopolymères comme les surfactants et les exopolysaccharides pour le traitement des saumures contaminées et la récupération du pétrole, ainsi que diverses enzymes stables (Kanekar *et al.*, 2012 ; Margesin et Schinner, 2001 ; Oren *et al.*, 1997).

Les *Archaea* halophiles sont caractérisées par la production de composés antimicrobiens de nature protéique, nommés Halocines. Très peu d'halocines ont été caractérisées jusqu'à présent. Le seul mode d'action qui a été élucidé est celui de l'halocine H6/H7 qui inhibe l'antipore Na^+/H^+ des *Haloarchaea* et de celui des cellules de mammifères (Shand et Leyva, 2007).

Notre travail s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche dont l'objectif principal est la recherche de substances antimicrobiennes produites par des microorganismes extrémophiles. Cinq souches d'*Archaea* halophiles, isolées de différents milieux hypersalins, affiliées aux genres, *Haloarcula* (SOW24, SOW32) et *Halorubrum* (SOW33, SOW40, SWO41) se sont avérées potentiellement productrices de substances antagonistes ou halocines.

Le but fondamental de notre travail est de rechercher les facteurs nutritionnels pouvant induire la production d'halocine, ceci d'une part, et d'autre part de caractériser ces substances actives essentiellement par l'application aux halocines d'un protocole d'extraction des bactériocines. Une caractérisation partielle des souches étudiées est également abordée.

Synthèse
Bibliographique

I. Archeae

En raison des grandes différences dans la composition génétique, le Dr Carl Woese a proposé que le monde vivant devait être divisé en trois domaines: *Eucarya*, *Bacteria* et *Archaea* (Prescott *et al.*, 2003). La classification de ces trois groupes principaux s'est basée sur une étude des séquences des molécules d'ARN ribosomiques ARN 16S et 18S (figure 1).

A la fin du 20^{ème} siècle, les microbiologistes ont réalisé que les *Archaea* sont un groupe important et diversifié d'organismes, largement répandu dans la nature et sont également fréquents dans des habitats moins extrêmes, tels que les sols et les océans (DeLong, 1998). En tant que groupe, les *Archaea* (du grec *archaios*, ancien) sont très diverses, aussi bien du point de vue morphologique que physiologique. Elles diffèrent en de nombreux points à la fois des eubactéries et des eucaryotes. Ces différences concernent la structure et la chimie de la paroi, la structure des lipides membranaires, la synthèse de macromolécules et le métabolisme (Prescott *et al.*, 2003).

La plupart des *Archaea* sont bien adaptés pour faire face à des environnements physiques et / ou chimiques extrêmes (température, pH, salinité, etc.) et peuvent facilement être divisés en hyperthermophiles, halophiles méthanogènes, acidophiles et archées métabolisant le soufre.

Malgré leur ressemblance phénotypique aux bactéries, les *Archaea* sont du point de vue biochimique, plus étroitement liée aux *Eucarya* qu'aux *Bacteria* (Bullock, 2000). Les cellules d'archées ont une ultrastructure unicellulaire sans noyau, ressemblant à des cellules bactériennes, mais les protéines impliquées dans la réplication de l'ADN, la transcription et la traduction, présentent de fortes similitudes avec celles des eucaryotes (Ishino et Ishino, 2013).

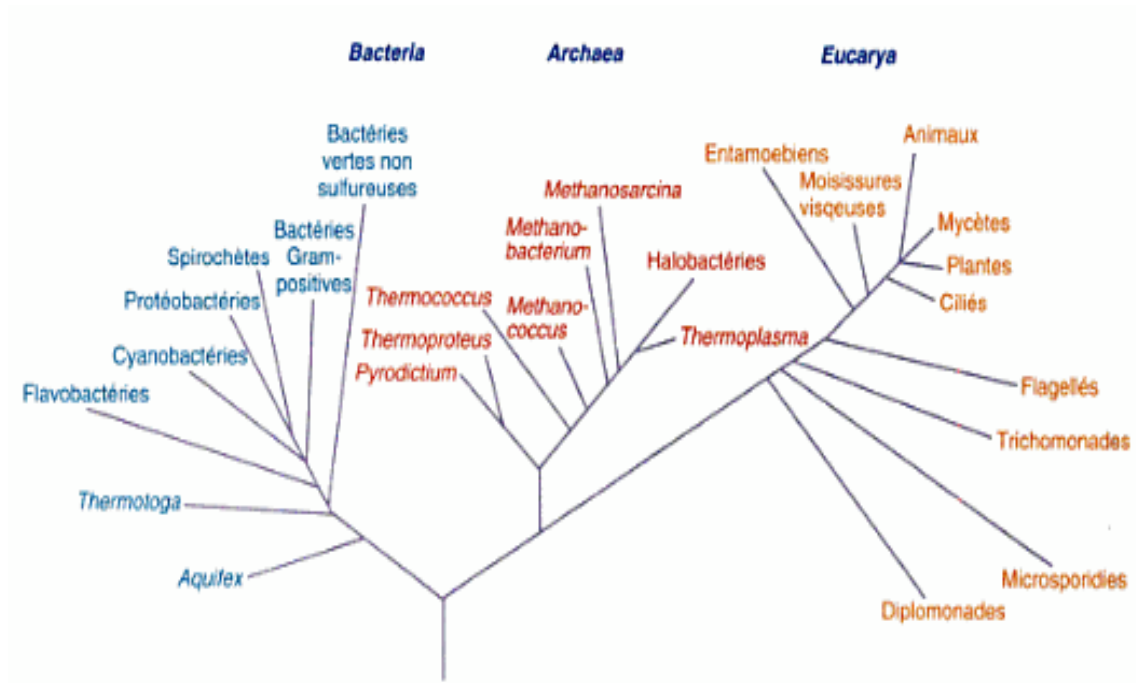


Figure 1: Arbre phylogénique universel selon la comparaison des séquences d'ARNr (Prescott et al, 2003).

I.1. Ecologie

Les archées sont plus répandues dans des zones de température ou de pH très élevés ou très faibles, concentrées en sel, ou complètement anoxiques. On les qualifie généralement d'« environnements extrêmes ». La plus grande partie de la terre (les océans) constitue un « environnement extrême » très froid (environ 4°C), sombre et où règne une pression élevée (Prescott *al.*, 2010). Beaucoup d'archées sont bien adaptées à ces environnements, où elles peuvent se développer en grand nombre (Prescott *et al.*, 2003). Le nombre de procaryotes dans les saumures est généralement compris entre 10^7 et 10^8 /ml (Oren, 2011). En outre, la récente écologie microbienne a révélé que les organismes archéens habitent non seulement des environnements extrêmes, mais aussi des habitats plus ordinaires et non-extrêmes.

I.2. Principaux groupes d'Archaea

Les *Archaea* comportent trois principaux groupes physiologiques (figure 2), les Archées produisant le méthane, les méthanogènes, les halophiles extrêmes ou les *Haloarchaea*, et les thermophiles extrêmes ou hyperthermophiles (Perry *et al.*, 2004).

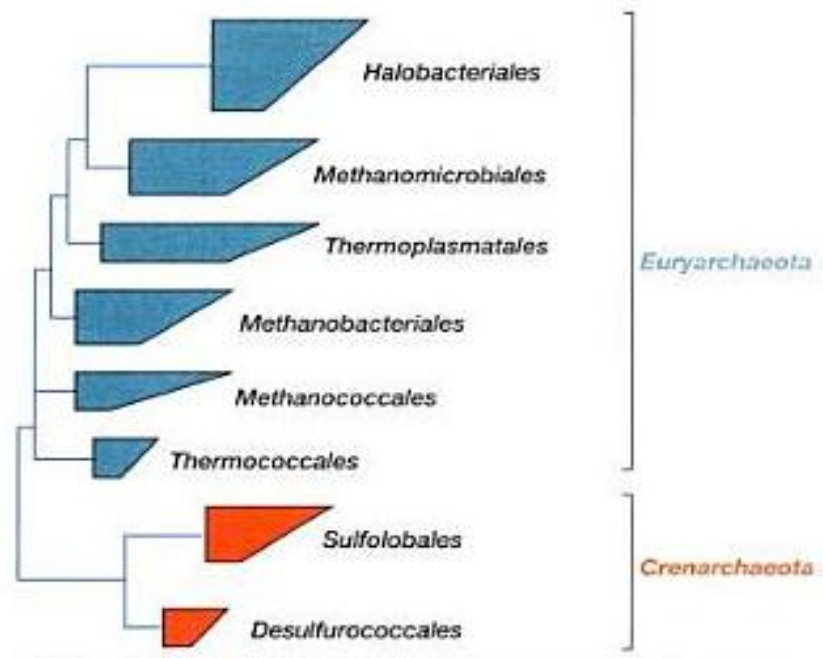


Figure 2: Phylogénie des Archaea selon les données des ARNr 16S (Prescott et al, 2010)

II. Microorganismes halophiles et Halophilisme

Les océans sont les plus grandes étendues d'eau salée, avec des salinités moyennes. Les environnements hypersalins, principalement les saumures naturelles des mers, les zones littorales et profondes ainsi que les marais salants artificiels qui présentent une salinité beaucoup plus élevée que celle de l'eau de mer, proviennent généralement de l'évaporation de celle-ci. Ces environnements sont habités par des organismes aimant le sel ou halophiles.

Ils ont la capacité de réguler la pression osmotique, résistant ainsi aux effets dénaturants du sel (Kerker, 2004).

Selon le gradient de salinité on distingue différentes catégories de microorganismes halotolérants ou halophiles (Ventosa *et al.*, 1999). Les microorganismes halotolérants (0-5% NaCl) comme *Staphylococcus aureus*, légèrement halophiles (2-5% NaCl), modérément halophiles (5-20% de NaCl) (*Salinivibrio costicola*) et halophiles extrêmes (20-30% de NaCl), (*Halobacterium salinarum*). Quelques micro-organismes peuvent s'adapter à la vie sur toute la gamme de concentration en sel même à la saturation, c'est l'exemple de *Halomonas elongata* (Kanekar *et al.*, 2012 ; Oren, 2006)

Les halophiles ont développé deux différentes stratégies d'adaptation pour faire face à la pression osmotique induite par la forte concentration en NaCl du milieu. La première, utilisée

par les Archées halophiles aérobies de la famille *Halobacteriaceae* et les bactéries halophiles anaérobies de l'ordre des *Halanaerobiales* implique l'accumulation de concentrations molaires de KCl (Kerkar, 2004). Cette stratégie nécessite une adaptation de la machinerie enzymatique intracellulaire. Les protéines doivent conserver leur propre conformation et activité à des concentrations salines quasi-saturantes. Le protéome de ces organismes est très acide, et la plupart des protéines se dénaturent à de faibles teneurs en sel.

La deuxième stratégie qui est observée chez la plupart des bactéries halophiles, des eucaryotes et aussi chez les archées halophiles méthanogènes (Kerkar, 2004), consiste à exclure le sel du cytoplasme et de synthétiser et/ou d'accumuler des solutés organiques "compatibles" qui n'interfèrent pas avec l'activité enzymatique. Une variété de ces solutés sont connus, telles la glycine bêtaïne, et l'ectoïne, d'autres dérivés d'acides aminés, les sucres et les alcools de sucre (Oren, 2008).

III. *Archaea* halophiles ou Haloarchées

Les halobactéries contiennent les halophiles extrêmes par excellence. Ils sont classés dans le domaine *Archaea*, Classe *Halobacteria*, Ordre *Halobacteriales* et de la Famille *Halobacteriaceae*. 96 espèces sont classées dans 27 genres. Les halophiles les plus connus sont relativement faciles à cultiver, et des genres tels que *Halobacterium*, *Haloferax*, *Haloarcula* et *Halorubrum* sont devenus des modèles bien connus pour l'étude du domaine *Archaea*, car ils sont beaucoup plus simples à manipuler que les archées méthanogènes et hyperthermophiles (Özcan, 2012). Le tableau I montre les principaux caractères de quelques genres.

Ce sont des micro-organismes hautement spécialisés, dont la plupart ne poussent pas à des concentrations salines en dessous de 2,5-3 M. Dans des solutions contenant moins de 1-2 M de sel, les cellules sont endommagées de manière irréversible, et de nombreuses espèces sont lysées (Oren, 2002).

Dans certains milieux hypersalins leur population atteint une telle densité que l'eau devient rouge du fait des pigments caroténoïdes (Prescott *et al*, 2003).

L'identification des halobactéries est polyphasique (Oren, 1997) et est basée sur des critères phénotypiques, biochimiques, physiologiques et génétiques.

Tableau I : Caractères généraux de quelques genres d'haloarchées (Kanekar *et al*, 2012 ; Oren, 2009)

Genre	<i>Halobacterium</i>	<i>Haloarcula</i>	<i>Haloferax</i>	<i>Halorubrum</i>
Forme	Bâtonnets	Bâtonnets pléomorphes plats ou carrés	Pléomorphes plats	Bâtonnets
Gram	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
[NaCl] optimale	3,5-4,5M	2,5-3,5M	2,5M	1,0-5,2M
[Mg] optimale	0,05-0,6M	0,005-0,1	0,001-1,2M	0,005-0,6M
T° optimale	44°C	40°C	20-55°C	50°C
pH	7	7,4-7,5	5-9	Neutrophiles ou alkalophiles
Type trophique	Chimio-organotrophes (les acides aminés sont requis pour la bonne croissance)	Chimio-Organotrophes	Chimio-organotrophe	Chimio-organotrophe
Type respiratoire	Aérobie	Aérobie	Aérobie	Aérobie
Origine d'isolement	Peau de vache salée	Lac salé	Mer morte, Grand lac salé	saltern, Californie
Pigmentation	Rouge/violette	Rouge	rouge pourpre au rose	Rouge/orangé
GC%(%mole)	54.3 - 71.2	60.1 - 65	59.1 - 65.5	60.2-71.2
Principaux lipides polaires	Dérivés de Diéther de Glycérole C20 C20	Dérivés Diether de glycérole C20 C20	<i>Dérivés de Diether de glycérole C20C20/ C20C25</i>	<i>Dérivés de Diether de glycérole C20C20/ C20C25</i>
Souche type	<i>H. salinarum</i>	<i>H. vallismortis</i>	<i>H. volcanii</i>	<i>H. saccharovororum</i>

III.1. Aspect biotechnologique des *Archaea* halophiles

Bien que plusieurs micro-organismes extrêmophiles soient connus depuis 40 ans, la recherche d'extrêmophiles s'est intensifiée au cours de la dernière décennie pour deux raisons principales. La première est qu'ils peuvent se retrouver dans des environnements extrêmes, ce qui a conduit à l'exploration de nombreux habitats. Deuxièmement, ils ont un grand potentiel d'applications industrielles : Des applications techniques de la bactériorhodopsine, qui est une protéine ayant une structure similaire à la rétine humaine (l'informatique optique et les mémoires optiques) (Margesin et Schinner, 2001 ; Oren et al, 1997).

- Des solutés compatibles qui sont utiles en tant que stabilisants de biomolécules et de cellules entières, des antagonistes de sel, ou des agents de protection contre le stress (Margesin et Schinner, 2001)
- Des biopolymères, comme les biosurfactants et les exopolysaccharides, présentent un intérêt pour le traitement accéléré des environnements salins pollués par le pétrole (Margesin et Schinner, 2001 ; Kanekar et al, 2012).
- Des enzymes hydrolytiques telles que les DNAses, lipases, amylases, protéases et gélatinases qui sont capables de fonctionner dans des conditions qui causent la précipitation ou la dénaturation de la plupart des protéines (Kerkar, 2004).

En plus de leurs applications industrielles, les archées produisent des peptides ou des protéines présentant une activité antimicrobienne qui sont appelés archaeocines. Ceux identifiés chez les halophiles sont nommés Halocines (Chavan et Riley, 2007). La production de ces halocines présente une importance écologique, car par leur action catalytique, elles peuvent lyser les cellules qui leur sont sensibles pour libérer leurs contenus et par conséquent enrichir le milieu (Kerkar, 2004).

III.2. Halocines

La production bactérienne de substances antagonistes contre d'autres bactéries a été connue depuis 1925 en commençant par la découverte de l'antagonisme entre les souches d'*Escherichia coli*. A l'origine, ces premières substances ont reçu le nom " colicines," mais à présent de telles molécules produites par les membres des bactéries sont connues comme les bactériocines (O'Connor et Shand, 2002). Le terme bactériocine est appliqué pour décrire un large éventail de protéines bioactives d'origine bactérienne qui présentent des propriétés antimicrobiennes contre d'autres espèces de bactéries, généralement étroitement liée à l'organisme producteur (Platas et al., 1995). Ces protéines antibiotiques sont largement

étudiées en raison de leur potentiel comme agents de conservation dans l'industrie alimentaire, comme agents de contrôle des bactéries infectieuses (Platas et al., 2002).

La production de peptides ou de protéines antibiotiques est une caractéristique universelle retrouvée chez les trois domaines du vivant (Shand et Leyva, 2007). Les halobactéries produisent leur propre version de bacteriocines : les halocines (Chavan et al., 2007).

Il semble exister des centaines de différentes halocines, seule une poignée de celles-ci est caractérisée (Shand et Leyva, 2007). Les halocines ont d'abord été découvertes par Rodriguez-Valera et ses collègues (1982). Depuis, l'halocine H4 (Cheung et al., 1997; Mesenguer et Rodriguez-Valera, 1985, 1986); halocine H6 (Mesenguer et al., 1995; Torreblanca et al., 1989, 1990); halocine Hal R1 (Shand et al., 1999), S8 (Price et Shand, 2000) ; A4 (Haseltine et al., 2001), H1 (Platas et al., 2002) ; C8 (Yun Le et al., 2003) ; ont été caractérisés (tableau II).

Tableau II : Caractéristiques des halocines (Leyva et Shand, 2007 ; O'Connor et Shand 2002)

Halocine	Souche productrice	Taille	Stabilité thermique	Dépendance au sel	Mode d'action
H4	<i>Haloferax mediterranei</i> R4	34,9kDa	<60°C	partiellement	flux protonique
H6/H7	<i>Haloferax gibbonsii</i>	~3kDa	≤ 90°C	Non	antiport Na ⁺ /K ⁺
Hal R1	Halobacterium sp GN(101)	3,8kDa	60°C	Non	ND
S8	<i>S8a</i>	3,58kDa	≥24h à ébullition	Non	ND
A4	<i>Haloarcheon TuA4 (Tunisie)</i>	7,435Da	≥une semaine à ébullition	Non	ND
H1	<i>Hfx. mediterranei</i> Xai3	31kDa	< 50°C	Oui	perméabilité de la membrane
C8	<i>Halobacterium</i> sp AS7092	~6,3kDa	>60min à 100°C	Non	ND

ND : Non Déterminé

III.2.1. Spectre d'activité

L'activité des halocines se limite généralement à d'autres haloarchées, dont certaines à large spectre, inhibent de nombreuses espèces et peu d'autres à spectre étroit (Shand, 2006). Les halocines ne sont pas actives contre les bactéries ou les eucaryotes pour au moins deux raisons. Tout d'abord, les halocines de poids moléculaire élevé perdent leur activité lors du dessalage -une condition pré-requise pour les tester contre les halophiles non-extrêmes-. Deuxièmement, la plupart des eucaryocines et de nombreuses bactériocines portent une charge positive nette et interagissent avec les lipides membranaires des cellules cibles chargées négativement. En revanche, les microhalocines sont neutres, il n'y a donc aucun moyen d'interagir avec les lipides membranaires de la cellule cible (Shand, 2006). Cependant, l'halocine H6/H7 qui inhibe l'antipore Na^+/H^+ des *Haloarchaea*, inhibe aussi l'antipore Na^+/H^+ chez le chien. Les halocines A4, R1 et S8 inhibent *Sulfolobus sp* (archée hyperthermophile appartenant au phylum *Crenarchaeota*). L'halocine R1 inhibe également *Methanosarcina thermophyla* (un mésophile producteur de méthane). En plus de l'inhibition de *Sulfolobus* et la plupart des haloarchées, l'halocine A4 inhibe aussi deux haloalkalophiles *Natronobacter gregoryi* et *Natrialba magadii* (Leyva et Shand, 2007 ; O'Connor et Shand, 2002)

Selon leur taille, les halocines peuvent être classées en peptides ou microhalocines (<10 kDa) ou en protéines ou halocines (> 10 kDa) (Shand & Leyva, 2007). Les halocines sont dépendantes du sel, et perdent leur activité dans de faibles concentrations. Par contre, les microhalocines sont plus robustes. La plupart résistent au dessalage, aux fortes températures, à l'acidité ainsi qu'aux solvants organiques (Shand et *al.*, 2006).

Matériel

et

Méthodes

Matériel et Méthodes

I- Matériel

I.1. Matériel biologique

Cinq souches d'archées halophiles isolées de la Sebkha de Ouargla et de la saline d'Ichekaben ont été utilisées pour la production d'halocines (Tableau III). L'activité antibiotique a été mise en évidence en testant les souches entre-elles et sur une souche d'archée halophile de référence, *Halobacterium salinarum* DSM 3754.

Tableau III : Les souches utilisées

Souche	Source	Année d'isolement	Conditions de culture	Genre affilié
SWO25	Sebkha de Ouargla	1999	37°C, pH7	<i>Haloarcula</i>
SWO32	Sebkha de Ouargla	1999	43°C, pH7	Haloarcula
SWO33	Sebkha de Ouargla	1999	43°C, pH7	Halorubrum
SWO40	Sebkha de Ouargla	2009	40°C, pH7	Halorubrum
SWO41	Sebkha de Ouargla	2010	40°C, pH7	Halorubrum

I.1.1. Milieu de culture

Le milieu de culture utilisé dans cette étude est un milieu pour archées halophiles, le milieu Brown (Br) dont la composition est donnée en annexe.

I.1.2. Appareillage et réactifs

La liste des appareillages et réactifs utilisés figure dans l'annexe

II- Méthodes

II.1. Culture des souches d'Archées halophiles en milieu liquide

Cinq souches d'archées halophiles SWO25, SWO32, SWO33, SWO40, sont cultivées sur milieu Brown liquide afin d'étudier la production de substances antibiotiques produites.

II.1.1. Préparation de la pré-culture

Une colonie de chaque souche est transférée dans des tubes contenant 9ml de milieu, puis incubés au bain-marie à 40°C sous agitation à 120trs/min pendant 2 à 3 jours (jusqu'à avoir une $DO_{600nm} = 0,2$).

II.1.2. Inoculation des Erlenmeyer

Des Erlenmeyer de 250 ml contenant 40ml de milieu liquide sont inoculés à raison de 1% avec la pré-culture (400 μ l), puis incubés à 40°C sous agitation à 120trs/min jusqu'à ce que la pigmentation soit visible à l'œil nu (phase exponentielle). Des échantillons sont prélevés à différents intervalles de temps puis conservés à 4°C jusqu'à l'analyse.

II.1.3. Estimation de la croissance

La croissance est estimée par mesure de la DO à 600nm après avoir dilué les suspensions au 1/10^{ème}.

II.2. Détermination de l'activité antagoniste entre souches d'archées halophiles

Afin de détecter une activité antibiotique de type halocine, l'antagonisme entre les souches d'*haloarchaea* SWO25, SWO32, SWO33, SWO40, SWO41 est étudié. L'activité antibiotique est également recherchée sur la souche de référence *Halobacterium salinarum* DSM3754. Après centrifugation des cultures à 8000 rpm pendant 20 min à 4°C, le surnageant est conservé à 4°C jusqu'à ce qu'il soit testé pour son activité antibiotique.

II.2.1. Préparation du germe cible

A partir d'une culture en phase exponentielle, les cellules sont remises dans le milieu neuf de manière à avoir une DO_{600nm} de 0,01, elles sont ensuite incubées à 40°C sous une agitation de 120trs/min jusqu'à avoir une $DO_{600nm} \leq 0,2$. Cette dernière suspension est à nouveau diluée de la même manière que précédemment puis remise en culture jusqu'à avoir une absorbance de 0,6-0,8 qui servira d'inoculum pour la double couche (Shand, 2006).

II.2.2. Inoculation du germe cible en double couche

15ml de milieu Br à 2% d'agar, sont répartis dans des boites de Petri. Après solidification 5ml de gélose molle du même milieu (à 1% d'agar) contenant le germe cible à une DO600nm de 0,01 sont étalés en surface) (Shand, 2006).

Des spots de 5 à 10 µl de surnageant sont déposés à la surface des boites puis incubées à 40°C pendant 2 jours ou plus jusqu'à ce que la croissance des souches indicatrices soit visible. L'apparition de zones d'inhibition d'au moins 2mm de diamètre indique un résultat positif. (Biscola *et al.*2012).

II.3. Stimulation de la production de substances antibiotiques

II.3.1. Par l'apport du milieu Br à différentes teneurs d'extrait de levure

Des cultures de 3 à 5 jours sont centrifugées à 8000 rpm pendant 20 minutes à 4°C, les culots de chaque souche sont remis dans des Erlen de 100 ml contenant 15 ml de milieu neuf à 0,5% et 0,05% d'extrait de levure. Des prélèvements sont pris à des intervalles de temps de 3 heures et les surnageants de culture sont testés pour leur activité antibiotique.

II.3.2. Par l'ajout du milieu Br à différentes concentrations de NaCl

Parmi les souches étudiées, celles qui produisent peu ou pas de substances antibiotiques sont cultivées sur milieu Brown liquide pendant 4 à 5 jours puis remises en culture sur milieu Br à différentes concentrations de NaCl (10%, 15%, 20%, 25%, 30%) dans les mêmes conditions que précédemment.

Des échantillons de 1ml sont pris à des intervalles de temps de 3heures pendant deux jours, puis conservés à 4°C jusqu'à l'analyse.

II.4. Caractérisation des substances antibiotiques produites

II.4.1. Etude de l'adsorption des halocines sur les cellules productrices

Certaines bactéries productrices de bactériocines, particulièrement les bactéries lactiques, adsorbent à leurs surfaces ces substances bioactives. (Yang *et al.*, 1992) (figure 3). Le relargage est effectué dans des conditions acide et à froid. Nous avons donc appliqué le protocole de Yang *et al.*, (1992) aux cellules d'*archaea* halophiles (SWO25 et SWO40) afin de vérifier cette caractéristique pour les halocines.

- Dans une première étape afin de déterminer le pH adéquat pour l'adsorption, une culture en phase exponentielle est répartie en plusieurs suspensions égales, ajustées à des pH allant de 5 à 8 avec de l'acide phosphorique à 5%.

- Dans une deuxième étape, après centrifugation à 12000rpm/15min les culots sont lavés avec la solution saline puis extraits à pH acide et à froid (Figure 3).

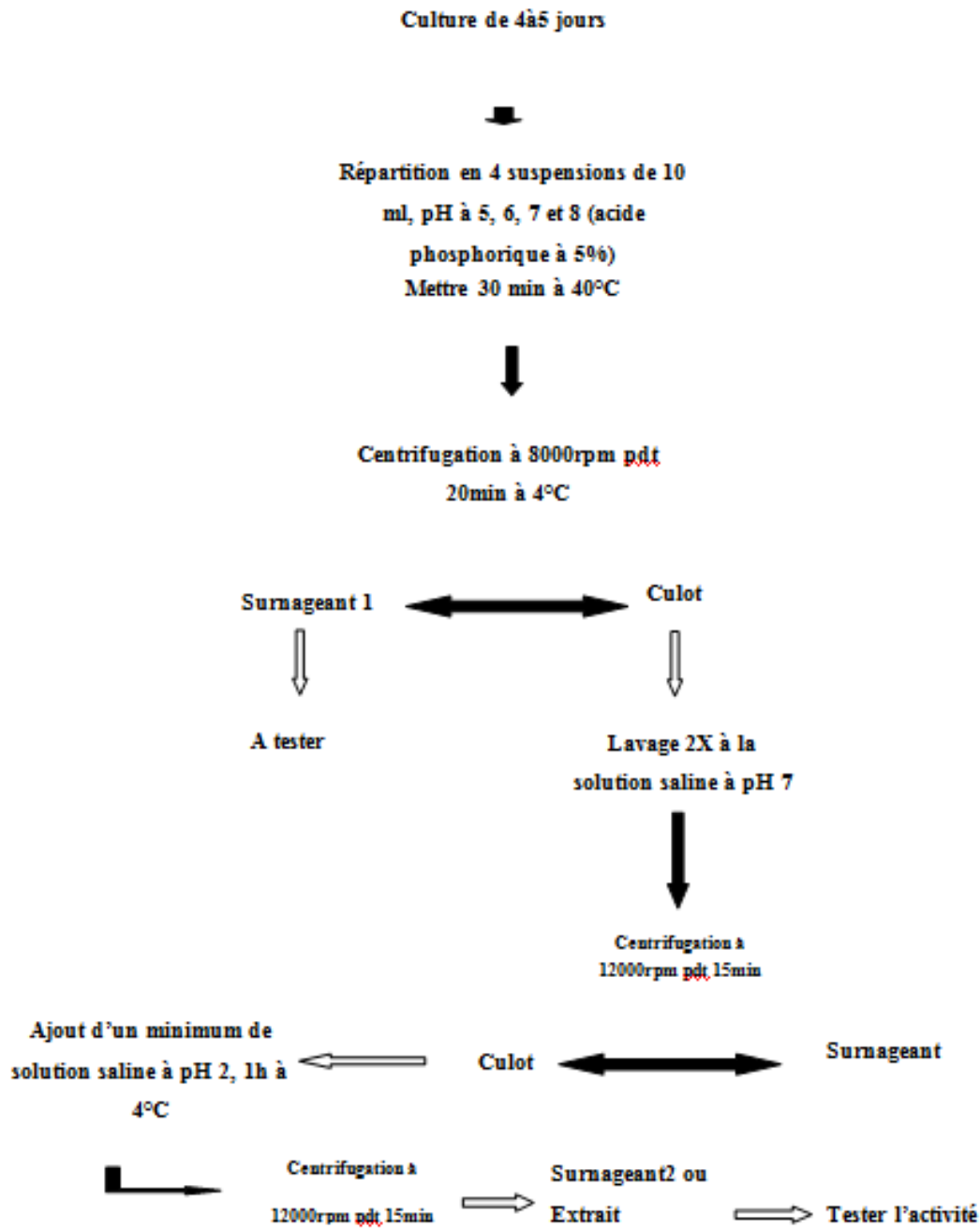


Figure 3 : Extraction des protéines membranaires par adsorption/désorption dans les conditions acide/froid (Yang et al.,1992)

Figure 3 Extraction des protéines membranaires par adsorption/désorption dans les conditions acide/froid

5µl des surnageants 1 et 2 sont testés pour leur activité antibiotique en présence du témoin négatif (solution saline à pH 2).

II.4.2. Etude de la stabilité des substances actives

Dessalage par filtration sur gel sephadex G25

La chromatographie de filtration sur gel est un procédé de séparation de protéines et de peptides en fonction de leur taille, et qui sert également à se débarrasser des plus petites impuretés et molécules tel que le sel (Hagel ,2011)

Dans le but de vérifier la stabilité des halocines produites par les souches SWO25 et SWO40 envers le sel, les extraits protéiques ainsi que les surnageants actifs sont élués avec un tampon Tris-HCl à 0,05M (pH 8,0) à travers une colonne chromatographique de 1cm de diamètre et 25cm de longueur contenant du gel séphadex G25 avec des dimensions de lit de 0,7x12,5cm.

Mode opératoire

- Gonfler les billes du gel en poudre avec un excès de tampon
- Laisser 3 heures à T° ambiante
- Dégazer le gel sous vide avec une pompe à vide
- Introduire un bout de laine de soie au bout de la colonne
- Verser la suspension de gel bien homogène en une seule fois en évitant d'introduire les bulles d'air
- Laisser se tasser toute la nuit
- Stabiliser et équilibrer le lit du gel avec la phase mobile (tampon)
- Ouvrir le robinet et laisser passer la phase mobile

Afin de déterminer le volume mort, un volume de 0,5ml d'une suspension de bleu de dextran à 1mg/ml (masse molaire égale à 2.10^6 D); est introduit dans la colonne. Après avoir bien lavé la colonne avec le tampon tris-Hcl, 0,5ml de l'échantillon préalablement centrifugé à 12000rpm pendant 20 minutes, sont versé délicatement avec une micropipette en évitant toute perturbation à la surface du gel (Hagel ,2011).

Après que l'échantillon ait complètement pénétré dans le gel, le tampon Tris-HCl à 0,05M pH 8 est utilisé avec un débit de 0,4ml/min, pour l'éluion de 40 fractions de 0,5ml. Ces dernières sont testées pour leur activité antibiotique, telles quelles ou supplémentées de 250 µl de solution de NaCl à 4M dans le but de déceler si le dessalage dénature la molécule active de manière réversible ou pas (PRICE et SHAND, 2000).

II.5. Caractérisation partielle des souches d'*haloarchaea* étudiées

II.5.1. Dégradation de l'amidon, de la gélatine, et de la caséine par les souches étudiées

Pour déterminer l'hydrolyse de l'amidon, des spots de 20µl de chaque souche sont déposés sur des boîtes de milieu gélosé supplémenté avec 0,2% (p/v) d'amidon.

La production de la gélatinase est détectée sur milieu solide supplémenté avec 1,5% (p/v) de gélatine.

L'hydrolyse de la caséine est déterminée sur milieu gélosé contenant 2% (p/v) de caséine. Après 48h d'incubation, les résultats sont pris par mesure des diamètres des zones d'hydrolyses.

II.5.2. Antibiogramme

La sensibilité aux antibiotiques des isolats est testée par la méthode de diffusion sur agar. Sur des boîtes de Petri contenant le germe ensemencé en double couche comme décrit précédemment sont déposés des disques imprégnés d'antibiotiques : clindamycine (2µg)(DA), Rifampicine (5µg)(RIF), Chloramphénicol (30µg)(C), Tétracycline (30µg)(TE), Erythromycine (15µg)(E), Amoxicilline (25µg)(AMX), Gentamicine (10µg)(CN), Céfazoline (30µg)(CZ), Pénicilline G (10µg)(P). Les boîtes sont mises à 4°C pendant 15 minutes pour permettre la diffusion d'antibiotique puis incubées à 40°C.

La lecture se fait en se basant sur le diamètre d'inhibition autour des disques après 20 jours d'incubation des boîtes dans des sacs en plastiques afin d'éviter la déshydratation de la gélose.

Résultats

et

Discussion

Résultats et Discussion

I. Détermination de l'antagonisme entre les souches d'archées halophiles

L'étude de l'antagonisme entre les souches d'archées montre que l'activité antibiotique n'est notable que dans les cultures des souches SWO25, SWO40. La souche de référence DSM 3754 présente une sensibilité à la plupart des activités détectée (Tableau IV). En effet *H. salinarum* est sensible à la plupart des halocines connues (Shand, 2006).

Pour les autres souches, l'activité est très peu visible et donc difficile à mettre en évidence. Les souches SWO40 et SWO41 ne sont sensibles à aucune des activités décelées dans le milieu Br et dans les conditions utilisées.

Tableau IV: Antagonisme entre les souches d'archées halophiles

Germe producteur \ Germe cible (ZI : mm)	DSM3754	SWO25	SWO32	SWO33
SWO25	14mm	0	0	0
SWO32	4mm	0	NT	0
SWO33	faible	0	faible	NT
SWO40	22mm	NT	0	0
SWO41	0	NT	0	0

NT : Non Testé

II. Stimulation de la production des halocines

II.1. Par l'apport de milieu Br, à différents teneurs en extrait de levure

Un effet stimulant du milieu apporté est noté sur la souche SWO40. En effet la zone d'inhibition sur la DSM3754 passe de 10mm à 25mm de diamètre. Les souches SWO41 et SWO33 qui ne produisaient pas auparavant, s'avèrent productrices de substances antibiotiques une fois remises dans un milieu Br neuf. Dans tous les cas, l'activité est plus importante avec 0,5% d'extrait de levure (Fig.4).

Le milieu neuf ajouté affecte également la croissance de façon considérable, toutefois elle est beaucoup plus importante à 5g/l d'extrait de levure (Fig.4).

L'optimum de croissance et de production de l'halocine Sech7a (Pašić *et al.*, 2008) a également été obtenu dans un milieu de culture contenant 0,5% d'extrait de levure.

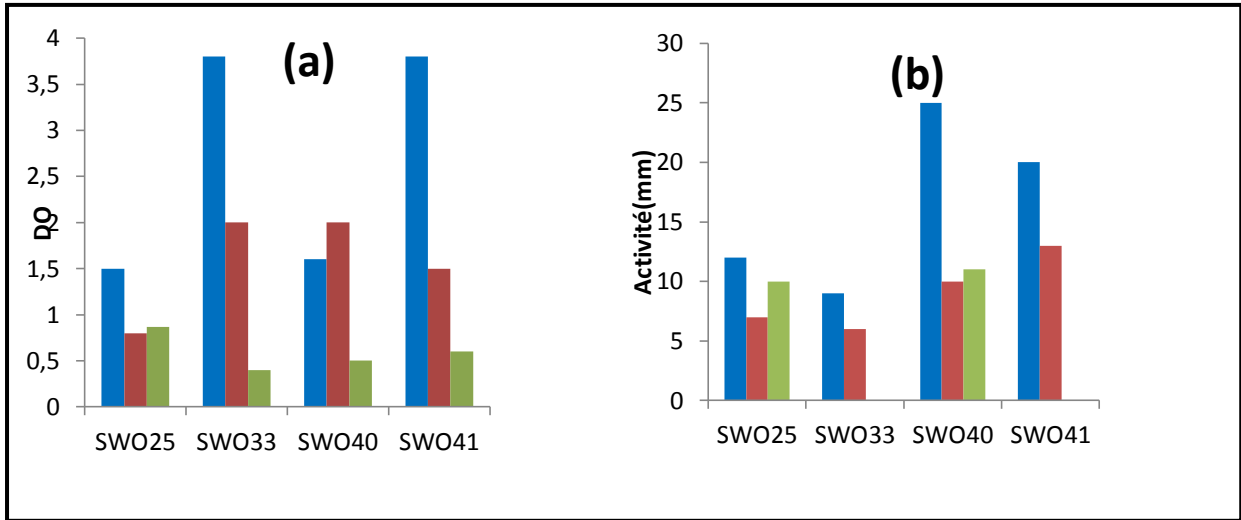


Figure 4 : Effet de l'apport du milieu Br (a) sur la croissance ; (b) sur l'activité après 23h de culture

■ Milieu contenant 5% YE. ■ Milieu contenant 0,05% YE. ■ Milieu non renouvelé

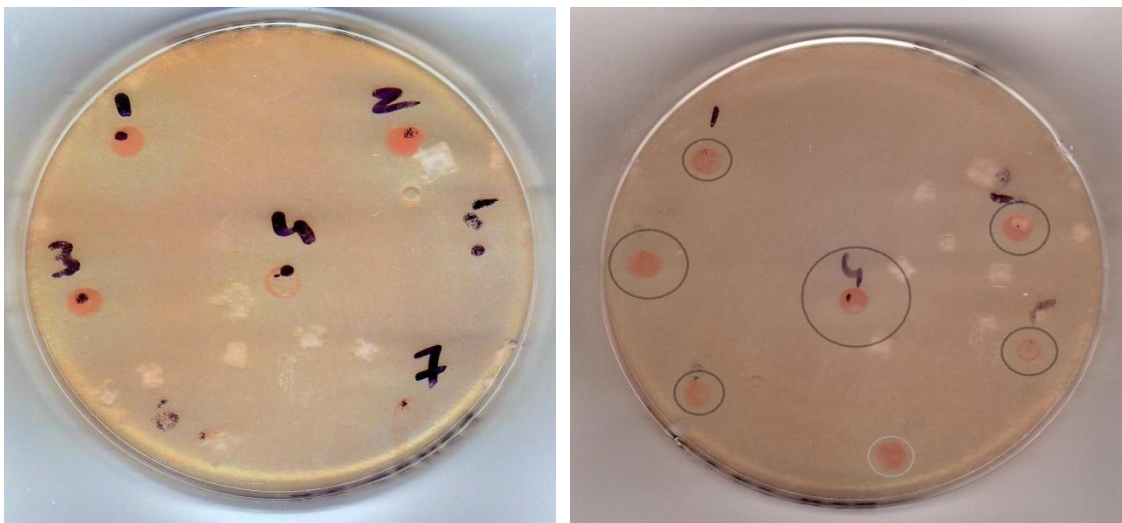


Figure 5 : Activités antibiotiques dans les surnageants de culture de SWO40 (à droite), et de SWO25 (à gauche) sur la DSM3754 après ajout du milieu neuf à 5g/l de YE

II.2. Par l'apport de milieu Br à différentes concentrations de NaCl

La croissance optimale de la souche SWO32 a été obtenue dans le milieu Br à 15% de NaCl, le développement des cellules est plutôt faible (Fig.6). L'aspect de la culture a également changé en fonction de la concentration en sel du milieu de croissance. Les cellules cultivées dans le Br à 15% ont montré une pigmentation rougeâtre qui s'atténue à une concentration en sel plus élevée. Ce phénomène a déjà été observé auparavant chez *Haloferax mediterranei Xia3* qui a présenté un optimum de croissance à 15% de NaCl (Platas *et al.*, 1996).

La production maximale d'halocines par la souche SWO32 est obtenue à une concentration de NaCl de 25% avec un diamètre d'inhibition d'environ 22mm, bien qu'une bonne production soit également présente sur toute la gamme (10%, 15%, 20%, 25%, 30%) (Figure 6). Ces observations témoignent du caractère halophile de la souche et l'impact de la variation des concentrations du sel sur l'activité antimicrobienne.

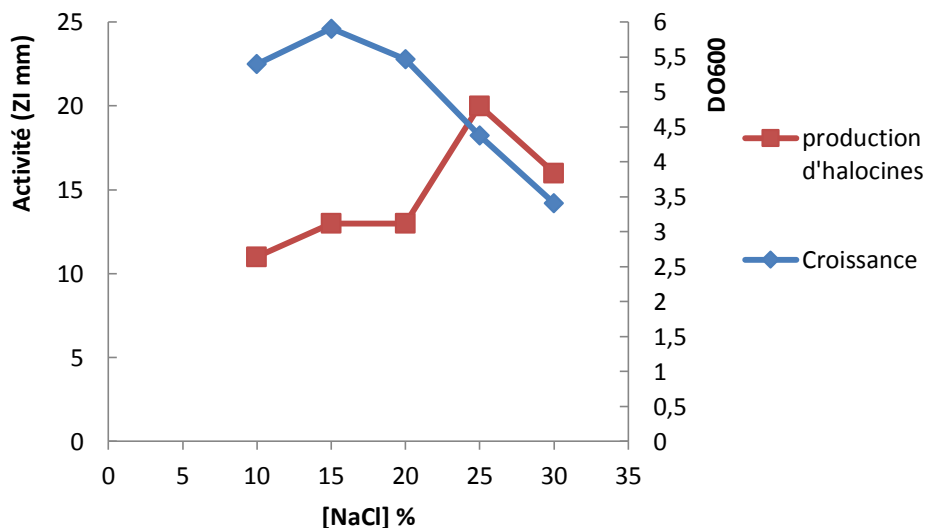


Figure 6: Effet de l'apport du milieu Br à différentes concentrations de NaCl sur la croissance et la production d'halocine par la souche SWO32

L'activité de l'halocine produite par l'*haloarchaea* Sech7a est restée importante sur une large gamme de concentration de NaCl (0,02 M-5,2 M) soit de 0,1 à 30% (Pašić *et al.*, 2008). La production d'autres halocines telles que l'halocine H1 produite par *Haloferax*

mediterranei Xia3 (Platas *et al.*, 1995), ainsi que SH10 produite par *Natrinema* sp. BTSH10 est optimale à 20% de NaCl (Karthikeyan *et al.* 2013).

III. Caractérisation des substances actives produites par les souches SWO25 et SWO40

III.1. Adsorption des halocines à la surface des cellules productrices

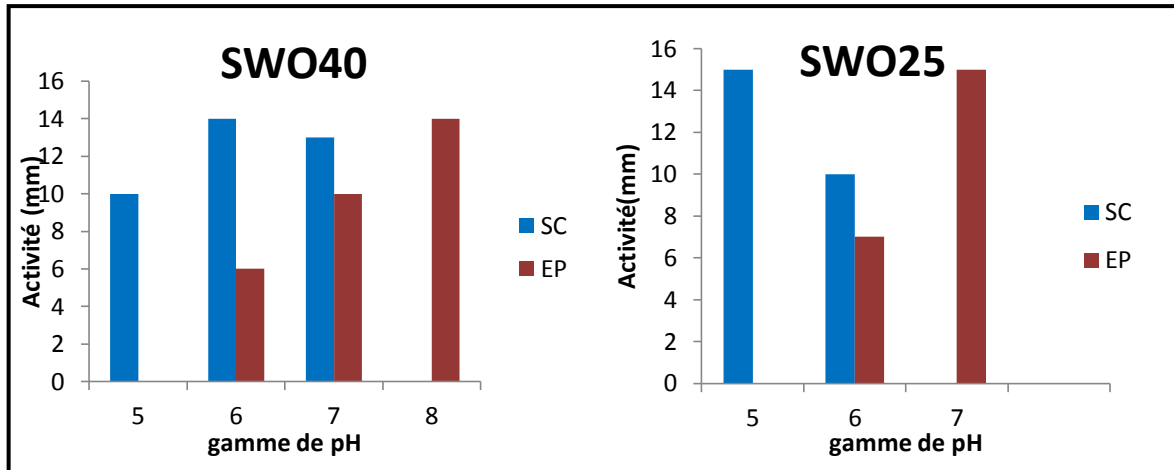


Figure7 : Activité des surnageant(SC) de culture et des extrait protéiques(EP) des souches SWO40 et SWO25

100% d'adsorption de la protéine antibiotique (halocine) produite par la souche SWO25 est obtenu à pH 7, et à pH 8 pour la SWO40. En effet à ces pH respectifs l'activité est nulle dans le surnageant de culture mais qu'on retrouve dans l'extrait protéique après extraction à pH acide et à froid. Une perte complète d'adsorption est obtenue à pH 5 pour les deux souches étudiées (Figure 7) puisque l'activité n'est retrouvée que dans le surnageant de culture (Fig.8). Dans le cas des bactériocines, l'adsorption totale est obtenue à pH 6 ou 7 et le relargage à pH 2 (Yange *et al.*, 1992)

D'après les travaux de Yang *et al.*, 1992, la Pédioïcine AcH, une bactériocine produite par une bactérie lactique *Pediococcus acidilactici* LB 42-923, adsorbe à 100% à un pH de 6,0 à 6,5. Une adsorption maximale de la nisine, produite par *Lactococcus lactis* subsp.lactis ATCC 11454, est survenue à pH 6,5. Par contre, la pentocine produite par *L. pentosus* 31-1 ne s'adhère pas aux cellules productrices (Liu *et al.*, 2008).

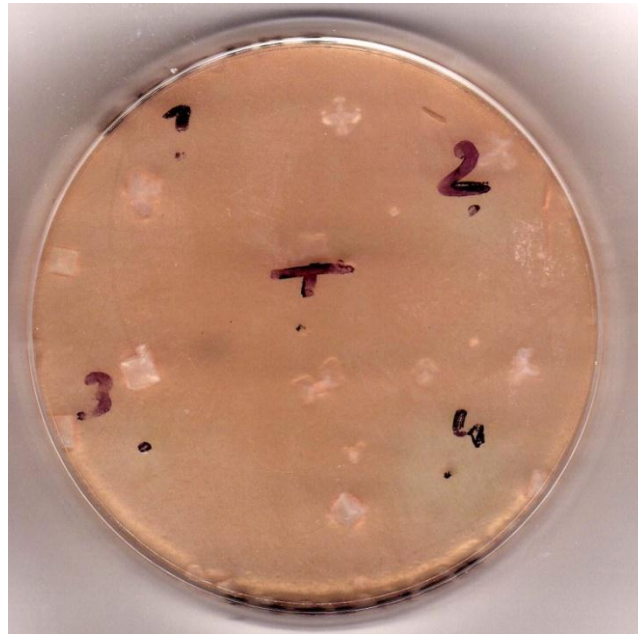


Figure 8 : Activité des extraits protéiques membranaires des cultures de SWO40 ajustées à différents pH (1: pH 5, 2 : pH 6, 3 : pH 7, 4 : pH 8, T : Témoin pH 2)

III.2 Effet du dessalage sur l'activité des halocines

Les fractions récoltées lors de l'élution des échantillons actifs de la souche SWO25 avec le tampon tris/HCl et le tris/HCl à 4M de NaCl n'ont montré aucune activité contre le germe cible. Cette halocine ne résiste probablement pas au dessalage. Par contre, les fractions récoltées lors de l'élution de l'extrait actif de la souche SWO40 ont pu donner une activité dans les fractions 2 et 3 une fois supplémentées de 4M de NaCl. Le dessalage dénature l'halocine produite par SWO40 de façon réversible, contrairement à celle produite par SWO25.

Parmi les halocines déjà caractérisées, la R1, H6, et S8 sont sel indépendantes, alors que la H4 perd son activité antimicrobienne après dialyse contre un tampon contenant moins de 15% de NaCl (Platas et al, 2002)

IV. Caractérisation biochimique des souches halophiles

IV.1. Test d'hydrolyse de l'amidon, gélatine et caséine

D'après le tableau V, aucune des souches étudiées n'hydrolyse la caséine. Même après ajout de TCA sur la boîte (Medina et Baresi., 2007), aucune zone n'est observée. Par contre, elles sont toutes productrices de gélatinase.

La SWO32 et SWO33 sont les seules à hydrolyser l'amidon. Les zones d'hydrolyses n'ont pu être décelées qu'après inondation des boîtes d'une solution iodine (lugol) (Arahal et al, 1996 ;

Elvi *et al.*, 2004). D'après les travaux déjà effectués ces caractéristiques biochimiques varient selon les espèces.

Tableau V : Zones d'hydrolyse de la gélatine, l'amidon et la caséine par les souches d'archées

substrats	Gélatine	Amidon	Caséine
souches			
SWO25	25mm	0	0
SWO32	32mm	25mm	0
SWO33	0	12mm	0
SWO40	35mm	0	0
SWO41	35mm	0	0

IV.2.Sensibilité aux antibiotiques

Toutes les souches étudiées se sont avérées résistantes à tous les antibiotiques testés (tableauVI).

Tableau VI : Résultats des antibiogrammes des différentes souches d'archées halophiles

Souches	SWO25	SWO32	SWO33	SWO40	SWO41	Charge du disque
ATB						
Rifampicine (RIF)	R	R	R	R	R	5µg
Céfazoline (CZ)	R	R	R	R	R	30µg
Gentamicine (CN)	R	R	R	R	R	10µg
clindamycine (DA)	R	R	R	R	R	2µg
Chloramphénicol (C)	R	R	R	R	R	30µg
Tétracycline(TE)	R	R	R	R	R	30µg
Amoxicilline (AMX)	R	R	R	R	R	25µg
Erythromycine (E)	R	NT	NT	R	NT	15µg

R : Résistant ; **NT** : Non Testé

D'après la littérature, les *Archaea* halophiles extrêmes sont présentées comme résistantes à la pénicilline, erythromycine, chloramphénicol, rifampicine, gentamicine, tétracycline et la streptomycine (Bonelo *et al*, 1984 ; Elvi *et al*, 2004 ; Elvi *et al*, 2008).

Conclusion

Conclusion

Les objectifs de notre étude étaient de vérifier la production de substances antimicrobiennes en milieu liquide, par cinq souches d'*Haloarchaea*, *SWO25*, *SWO32*, *SWO33*, *SWO40*, *SWO41* et de caractériser les molécules produites. Le spectre d'activité est étroit pour toutes les souches, toutefois elles présentent presque toutes une activité contre *Halobacterium salinarum* DSM 3754 qui est utilisé comme germe cible.

La concentration de NaCl requise pour une production optimale de substances antibiotiques varie de 10% à 30% selon les souches.

Comme certaines bactériocines, les halocines s'adsorbent à la surface cellulaire du germe producteur en fonction de pH de culture. Cette caractéristique, pourrait améliorer le rendement de purification de ces substances antibiotiques.

Les halocines se sont avérés être des protéines dépendantes du sel, perdant rapidement leur activité après l'exposition à des conditions de faibles concentrations.

Références

Bibliographiques

Références Bibliographiques

Bonelo G., Ventosa A., Megias M. et Ruiz-Berraquero F. (1984). The sensitivity of halobacteria to antibiotics (Halobacteria; Haloarcula; antibiotics sensitivity; MIC; resistant mutants). *FEMS Microbiology Letters*. **21**: 341-345.

Bullock C. (2000). The Archaea- A Biochemical Perspective. *Biochem. Mol. Biol. Edu.* **28**: 186-191.

Cayol J.L., Olivier B., Patel B.K.C., Prensier G., Guezennec J. et Garcia J.L. (1994). Isolation And Characterization Of *Halothermothrix Orenii* Gen. Nov. Sp. Nov., A Halophilic, Fermentative, Strictly Anaerobic Bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **44**: 534-540.

Cheung J., Dana K.J., O'Connor E.M., Price L.B. et Shand R.F. (1997). Isolation, Sequence, And Expression Of The Gene Encoding Halocin H4, A Bacteriocin From The Halophilic Archaeon *Haloferax Mediterranei* R4. *J Bacteriol.* **179**: 548–551

DeLong E.F. (1998). Everything in moderation: archaea as 'non-extremophiles'. *Curr Opin Genet Dev.* **8**(6): 649-654.

Elvi B.R., Parvanesh Assa., Birbir M., Ogan A et Oren A. (2004). Characterization of extremely halophilic Archaea isolated from the Ayvalik Saltern, Turkey. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. **00**: 1-7.

Elevi B.R., Oren A. (2008). Sensitivity of Haloquadratum and Salinibacter to antibiotics and other inhibitors: implications for the assessment of the contribution of Archaea and Bacteria to heterotrophic activities in hypersaline environments. *FEMS Microbiol Ecol.* **63**(3): 309-15.

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

Guerra N.P., Rua M.L. et Pastrana L. (2001). Nutritional Factors Affecting The Production Of Two Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria On Whey. *International Journal of Food Microbiology*. **70**: 267–28.

Hagel L (2011). Gel Filtration : Size exclusion chromatography. *In* : Protein Purification. Ed. Inc. Hoboken. New Jersey. 51-93.

Haseltine C., Hill T., Montalvo-Rodriguez R., Kemper S.K., Shand R.F. et Blum P. (2001). Secreted Euryarchaeal Microhalocins Kill Hyperthermophilic Crenarchaea. *Journal Of Bacteriology*. **183**(1): 287–291.

Ishino Y et Ishino S. (2013). DNA Replication in *Archaea*, the Third Domain of Life. *The Mechanisms of DNA Replication*. Ed INTECH. Japan. p91-111.

Karthikeyan P., Bhat S.G. et Chandrasekaran M. (2013). Halocin SH10 production by an extreme haloarchaeon *Natrinema* sp. BTSH10 isolated from salt pans of South India. *Saudi Journal of Biological Sciences*. **20**(2): 205–212.

Kerkar S. (2004). Ecology of Hypersaline Microorganisms. *In: marine microbiology: Facets opportunities*. Ed. Bookchapter. 37-47.

Kis-Papo T. et Oren A. (2000). Halocins: Are They Involved In The Competition Between Halobacteria In Saltern Ponds? *Extremophiles*. **4**: 35–41

Litchfield C.D. (2011). Potential for industrial products from the halophilic *Archaea*. *J Ind Microbiol Biotechnol*. **38**: 1635–1647.

Margesin R. et Schinner F. (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*. **5** (2): 73-83.

Meseguer I. et Rodriguez-Valera F. (1985). Production And Purification Of Halocin H4. *FEMS Microbiol Lett*. **28**: 177–182.

Meseguer I., Rodríguez-Valera F. et Ventosa A. (1986). Antagonistic interactions among halobacteria due to halocin production. *FEMS Microbiol Lett*. **36**: 177–182.

Meseguer I., Torreblanca M. et Konishi T. (1995). Specific Inhibition of the Halobacterial Na⁺/H⁺ Antiporter By Halocin H6. *J Biol Chem*. **270**: 6450–6455.

Meseguer I., Torreblanca M. et Rodriguez-Valera F. (1991). Mode Of Action Of Halocins H4 And H6: Are They Effective Against The Adaptation To High Salt Environments. *In: General and applied aspects of halophilic microorganisms*. Ed. Plenum. NewYork. 157–164.

- Messeguer I. et Rodriguez-Valera F.** (1985). Production And Purification Of Halocin H4. FEMS Microbiol Lett. **28**: 177-182.
- Messeguer I. et Rodriguez-Valera F.** (1986). Effect Of Halocin H4 On Cells Of *Halobacterium Halobium*. Journal of General Microbiology. **132**: 3061-3068.
- Messeguer I., Torreblanca M. et Rodriguez-Valera F.** (1995). Specific Inhibition Of The Halobacterial Na⁺/H Antiporter By Halocin H6. Journal Of Biological Chemistry. **270**: 6450-6455.
- O'Connor E.M. et Shand R.F.** (2002). Halocins And Sulfolobocins: The Emerging Story Of Archaeal Protein And Peptide Antibiotics. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. **28**: 23-31.
- O'Connor E.M. et Shand R.F.** (2002). Halocins and sulfolobocins: The emerging story of archaeal protein and peptide antibiotics. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. **28**: 23–31.
- Ollivier B., Caumette P., Garcia J. L. et Mah R.A.** (1994). Anaerobic Bacteria From Hypersaline Environments. Microbiology Reviews. **58** (1): 27-38.
- Oren A.** (1994). The Ecology Of The Halophilic Archaea. FEMS Microbiol Rev. **13**: 415–440.
- Oren A.** (2000). Salts and brines. *In*: Whitton BA Et Potts M. Ed. Ecology Of Cyanobacteria : Their Diversity In Time and Space. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 281-306.
- Oren A.** (2006). Life at High Salt Concentrations. Prokaryotes. **2**: 263-282.
- Oren A.** (2008). Microbial Life At High Concentrations: Phylogenetic And Metabolic Diversity. Bio Med Central. 1-13.
- Özcan B.**(2012). Archaeal Diversity and Their Biotechnological Potential. Genetic Diversity in Microorganisms. Prof. Mahmut Caliskan (Ed.). Croatia. p27- 43
- Pašić L., Velikonja B. H. et Ulrih N. P.** (2008). Optimization of the Culture Conditions for the Production of a Bacteriocin from Halophilic Archaeon Sech7a. Preparative Biochemistry and Biotechnology. **38**(3): 229- 245.

Perry J.J., Staley T.J. et Lory S. (2004). Microbiologie “cours et questions de revision” Ed Dunod. 397-403

Platas G., Meseguer I. et Amils R. (1996). Optimization Of The Production Of A Bacteriocin From *Haloferax Mediterranei* Xia3. *Microbiol SEM*. **12**:75–84.

Platas G., Meseguer I. et Amils R. (2002). Purification And Biological Characterization Of Halocin H1 from *Haloferax Mediterranei* M2a. *Int Microbiol*. **5**: 15–19.

Prescott L. M., Harley J.P. et Klein D.A. (2003). Microbiologie. 2e édition française. Ed. De Boeck, Bruxelles. 1101p.

Price L.B. et Shand R.F. (2000). Halocin S8: a 36-Amino-Acid Microhalocin from the Haloarchaeal Strain S8a. *Journal of Bacteriology*. **182**(17): 4951-4958.

Riley M.A. et Chavan M.A. (2007). Bacteriocins: Ecology and Evolution. Ed. Springer-Verlag .Berlin. 150p.

Rodriguez-Valera F., Juez G. et Kushner D.J. (1982). Halocins: Salt Dependent Bacteriocins Produced By Extremely Halophilic Rods. *Can J Microbiol*. **28**: 151–154.

Shand R.F. (2006). Detection, Quantification and Purification of Halocins: Peptide Antibiotics from Haloarchaeal Extremophiles. *Methods in Microbiology*. **35**: 703-718.

Shand R.F. et Leyva K.J. (2007). Peptide and Protein Antibiotics from the Domain *Archaea*: Halocins and Sulfolobocins. *Bacteriocins: Ecology and Evolution*. Ed. springer verlag. Berlin. 93-109.

Shand R.F., Price L.B. et O’Connor E.M. (1999). Halocins: Protein Antibiotics From Hypersaline Environments. *In: Microbiology and biogeochemistry of hypersaline environments*. CRC Press. Boca Raton. 295–306.

Torreblanca M., Meseguer I. et Rodriguez-Valera F. (1989). Halocin H6, A Bacteriocin From *Haloferax Gibbonsii*. *J Gen Microbiol*. **135**: 2655–2661.

Torreblanca M., Meseguer I. et Ventosa A. (1994) Production Of Halocin Is A Practically Universal Feature Of Archaeal Halophilic Rods. *Lett Appl Microbiol*. **19**:201–205.

Ventosa A., Mellado E., Sanchez-Porro C. et Maequez M.C. (2008). Halophilic and Halotolerant Micro-Organisms from Soils. *Microbiology of Extreme Soils*.**13**: 87-115.

Von Mollendorff J.W., Todorov S.D. et Dicks L.M.T. (2007). Factors Affecting the Adsorption of Bacteriocins to *Lactobacillus sakei* and *Enterococcus sp.* *Appl Biochem Biotechnol* (142): 209–220.

Yang R., Johnson C.M. et Ray B. (1992). Novel Method To Extract Large Amounts of Bacteriocins from Lactic Acid *Bacteria*. *Applied and Environmental Microbiology*. **58**(10): 3355-3359.

Annexes

Annexe 1 : Appareillage

- Balance
- Plaque chauffante et agitation magnétique TRADE Raypa AG-2 et AG-5
- Bain marie HS-B20 digital, IKA labortechnik, Allemagne
- pH-mètre Eutech pH 700
- Autoclave ALFA-10-Plus
- Etuve Venticell MMM
- Vortex VELP SCIENTIFIC, Italy
- Spectrophotomètre UV mini 1240 SHIMADZU
- Centrifugeuses : SIGMA 1-14
- Centrifugeuse réfrigérée ROTOR 380 R
- Bain marie
- Four pasteur RADE Raypa
- Microscope
- Micropipettes
- Pipettes
- Réfrigérateur
- Plaque agitatrice VBRAMAX 100
- Pompe à vide Fisherbrand

Annexe 2 : Milieux de cultures**Milieu Brown:**

- NaCl250g
- KCl2g
- MgSO₄20g
- Extrait de levure5g
- Citrate trisodique3g
- Agar20g
- Eau distillée1000ml
- Le pH 7,2 Stérilisation 120 °C pendant 20 mn dans l'autoclave.

Solution saline:

- NaCl250g
- KCl2g
- MgSO₄20g
- Citrate trisodique3g
- Eau distillée1000ml

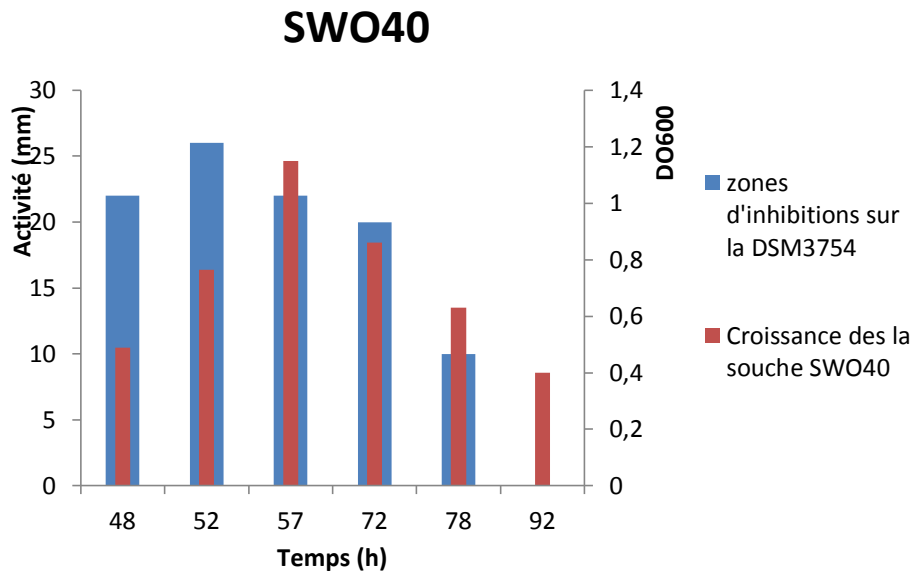
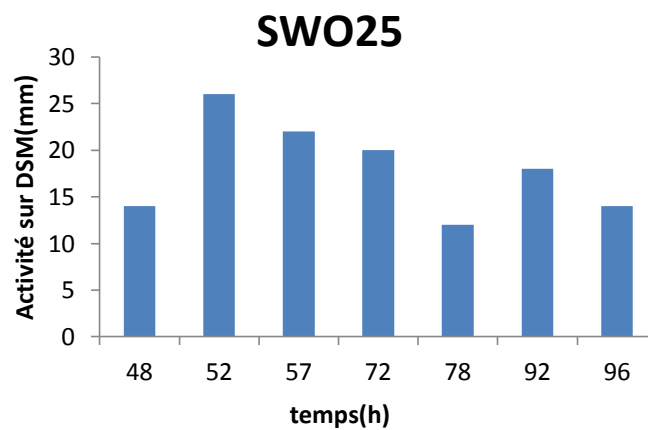
Milieu Brown semi-solide:

- NaCl250g
- KCl2g
- MgSO₄20g
- Extrait de levure5g
- Citrate trisodique3g
- Agar10g
- Eau distillée1000ml

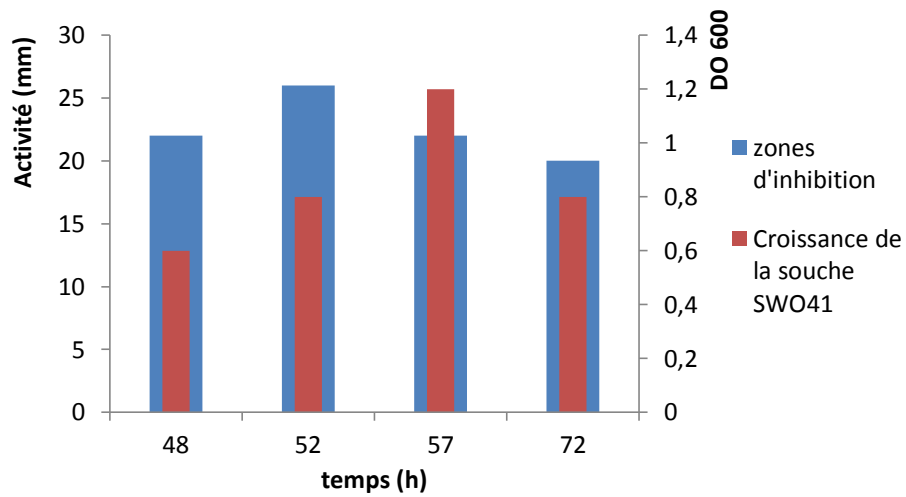
Tampon Tris-Hcl 0,05M, pH8

- Tris.....6,057g
- Eau distillée.....1000ml
- Ajuster le pH à 8 avec une solution de HCl à 4N

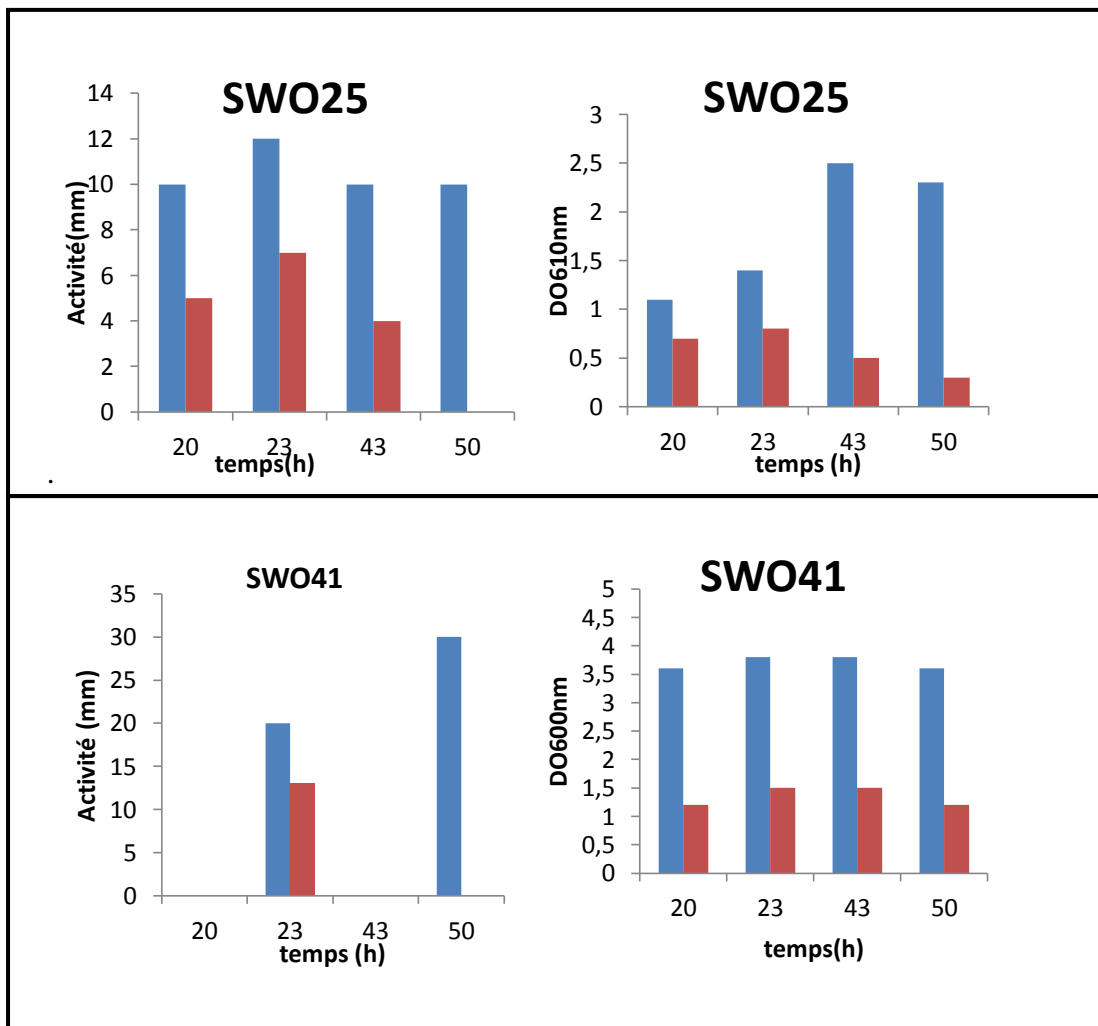
Annexe 3

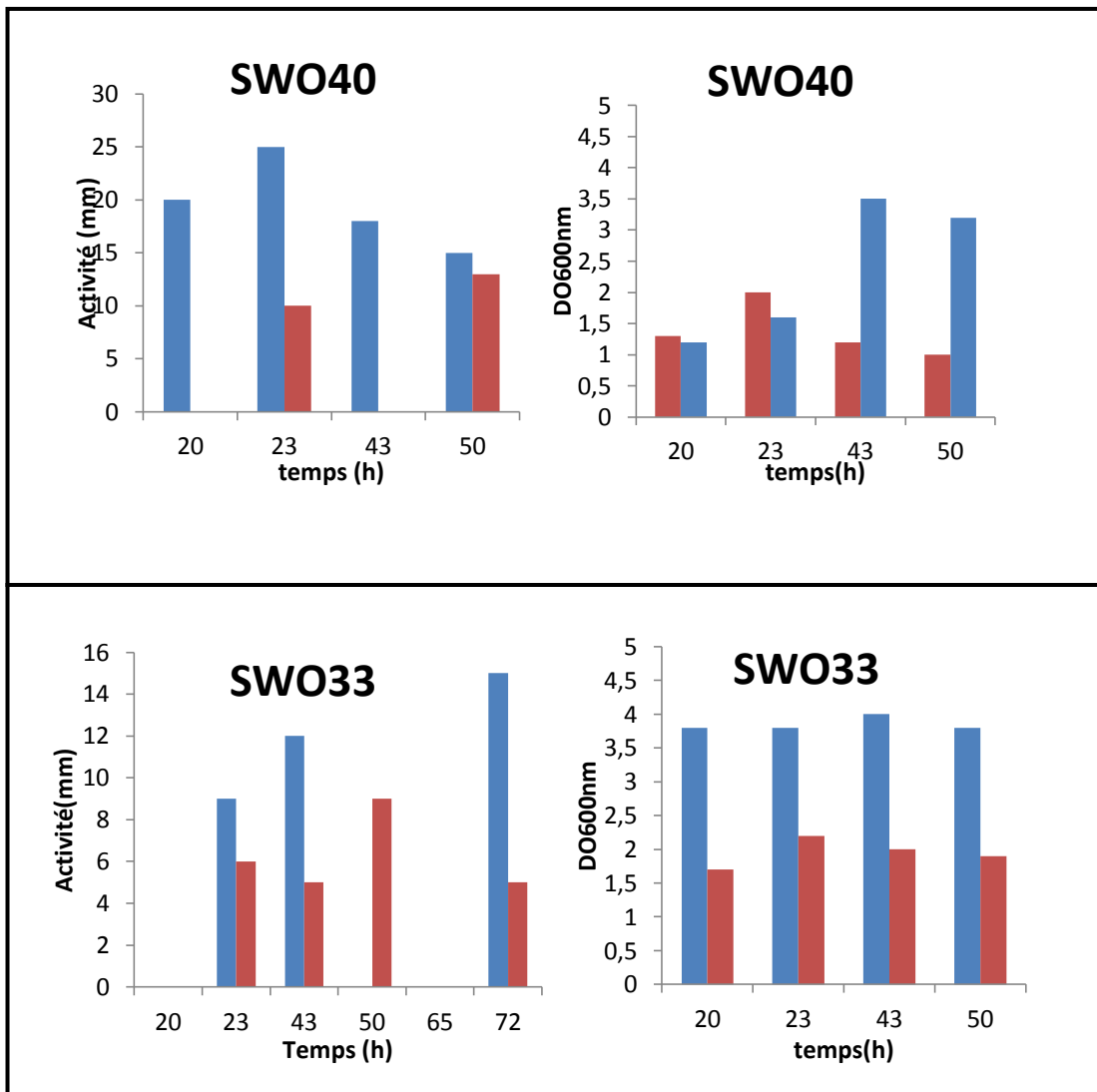
Croissance de la SWO40 et activité antimicrobienne des halocines dans 5 μ l de SCactivité des surnageants de la SWO25 dans 5 μ l

SWO41



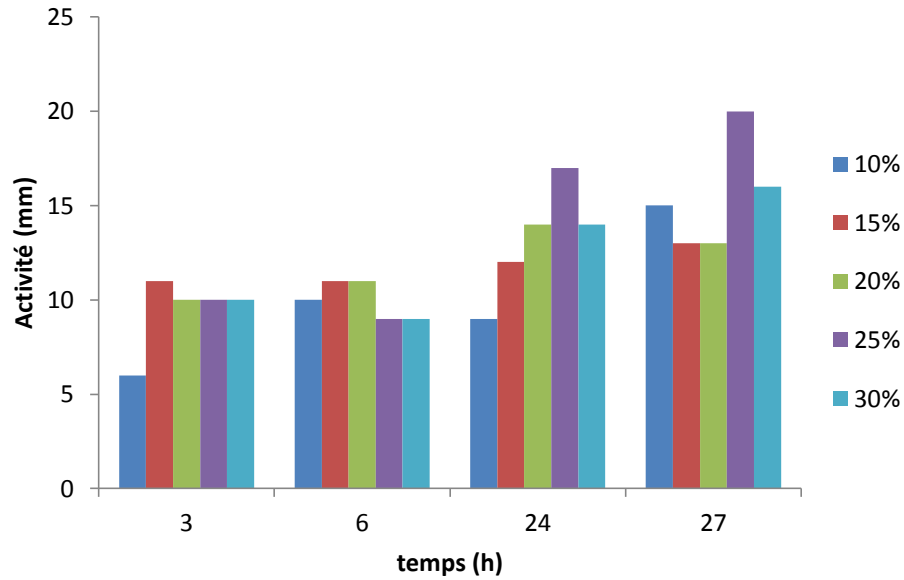
Croissance et production d'halocines chez la SWO41 dans 50µl de surnageant



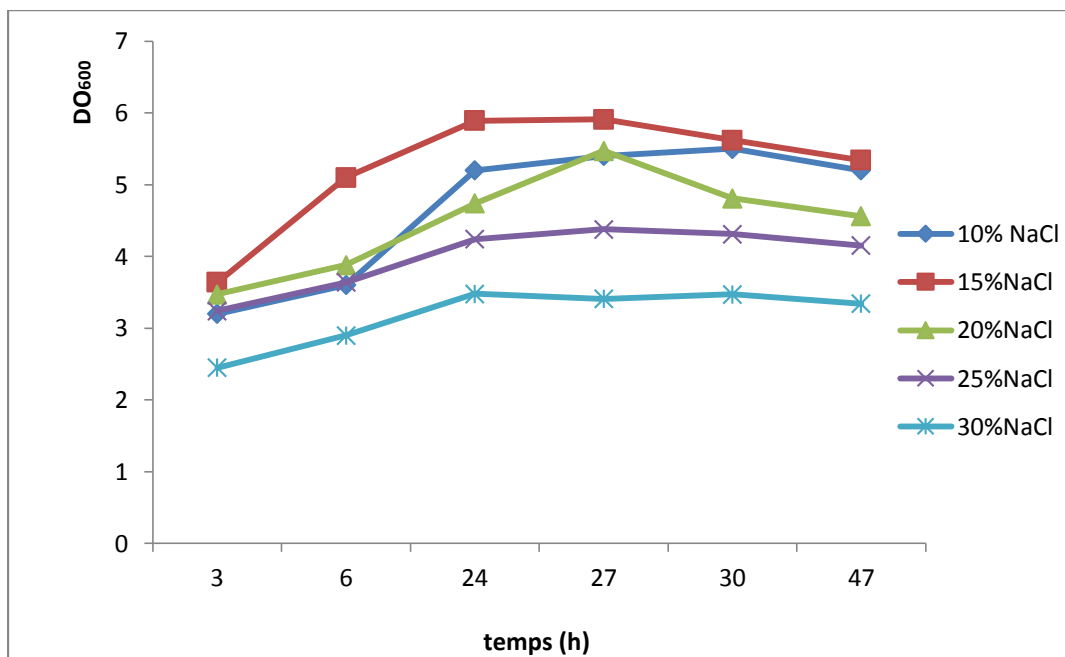


Croissance des souches et activité des surnageants dans les milieux neufs à différentes concentration d'extrait de levure.

Bleu : milieu contenant 0,5% YE, Rouge : milieu contenant 0,05% YE



Activité antibiotique des SC de la culture SWO32 remise dans un milieu neuf à différentes concentration de NaCl



Courbes de croissance des cellules de la souche SWO32 remises dans un milieu Br à gradient de NaCl



Pigmentation des souches étudiées variant du rose à l'orange

Résumé

Les *Archaea* halophiles extrêmes sont prédominantes dans les environnements hypersalins. Elles survivent dans des milieux de très fortes concentration de NaCl (>1,5M). Cinq souches d'*Archaea* halophiles affiliées aux genres *Halorubrum* et *Haloarcula*, isolées à partir de la sebkha d'Ouaregla ont servi d'étude pour la production de bactériocines, appelées halocines. Une production optimale de substances antibiotiques a été obtenue en rajoutant aux cellules en phase exponentielle un milieu neuf contenant 0,5% d'extrait de levure. L'activité antibiotique est détectée dans les surnageants de culture et les extraits protéiques membranaires obtenus après extraction des halocines adsorbées à la surface des cellules productrices. Le pH a été un facteur crucial dans la détermination du degré d'adsorption. Les halocines exposées au dessalage par filtration sur gel séphadex G50, sont habituellement dépendantes du sel.

Mots clés : *Haloarchaea*, halocine, bactériocine, activité antibactérienne, adsorption

Abstract

Extreme halophilic *Archaea* predominate in hypersaline environments. They survive in environments with very high concentrations of NaCl (> 1.5 M). Five halophilic *Archaea* strains affiliated to the genera *Haloarcula* and *Halorubrum*, isolated from the sebkha of Ouaregla, were used to study the production of bacteriocins, specifically called halocines.. Optimal production of antibiotic substances was obtained by adding to exponential cells, fresh medium containing 0.5% yeast extract. Antimicrobial activity was detected in the culture supernatants and membrane protein extracts obtained after extraction of halocins adsorbed on the surface of producer cells. pH was a crucial factor in determining the degree of adsorption. Halocines exposed to the desalting through Sephadex G50 gel filtration, are usually dependent on salt.

Keywords: *Archaea*, *Haloarchaea*, bacteriocin, halocin, antibacterial activity, adsorption