

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A.MIRA-Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Filière : Sciences biologiques
Option : Génie Biologique



Réf :

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Détermination de la stabilité des antibiotiques
des souches halophiles vis-à-vis de certains
paramètres physico -chimiques**

Présenté par : BENNAI Meriem et OUAKKOUCHE Imène Zinèbe

Soutenu le : 22/06/2017

Devant le jury composé de :

M^{me} KHETAL

Présidente

M^{me} IDRES

MAA

Encadreur

M^r NOURI

MCB

Examineur

Année universitaire : 2016/2017

REMERCIEMENTS

Avant tout, nous remercions ALLAH le méricordieux, le tout puissant et le plus clément qui nous aide et nous donne le courage de tout faire

Au terme de ce travail réalisé aux laboratoires de génie biologiques de l'université A. Mira de Bejaia, nous tenons d'abord à exprimer notre gratitude à notre promotrice Mme Idres N. pour ses conseils précieux et sa disponibilité, son orientation et ses qualités humaines ainsi que ses encouragements

On tient également à exprimer notre honneur et nos vifs et sincères remerciements à Mme Khetal d'avoir accepté de présider le jury et à Mr Nouri d'avoir accepté d'examiner notre travail

Nos remerciements vont également, aux techniciennes du laboratoire de génie biologique pour leur gentillesse, leurs précieux conseils et leurs disponibilités

Et enfin, à tous ceux et celles qui ont participé de près ou le loin à l'élaboration de ce travail.

Liste des Abréviations

% : pourcentage

°C : degré Celsius

µg : microgramme

µl : microlitre

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen

EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique

EP : extrait protéique

H: heur

KDa: kilodalton

MH:milieu *Halobacterium*

MC: milieu complexe

min: minute

mm:millimeter

ml:milliliter

NaCl:chlorure de sodium

nm :nanometre

Do : densité optique

rpm : tours par minute

SDS : sulfate de dodécyl de sodium

SS :solution saline

SC :surnageant de culture

SC_E : surnageant de culture extrait

UA : unité arbitraire

v/v : volume/volume

Z I : zone d'inhibition

Liste des tableaux

Tableau	Titre du tableau	Page
I	Echantillons utilisés pour l'isolement des halophiles extrêmes	07
II	Détermination de l'activité antibiotique sur <i>H.salinarum</i> DSMZ3754 dans les surnageant decultures(SC), les extraits protéiques (EP), et dans les surnageant (SC _E) après. Extraction	16
III	Activités des Ep et SC _E à différents PH	17
IV	activités des Ep. SCE et SC ajusté à PH 6	17
V	activités antibiotiques des surnageant SC 15 et SC 8 extrait à l'acétone	18
VI	Détermination du titre des extraits protéiques	19
VII	Activité des Ep et SC après traitement à la chaleur à 60°C, 80°C, 100°C et 120°C	20
VIII	Résultats des activités de quelques solvants seuls comme témoins	21
IX	effet des solvants organiques et détergents sur l'activité antibiotiques des surnageant et des Ep	22
X	Résultats des activités de SC8 et SC15 testé sur DSMZ 3754 seuls comme Témoin et après ajout de quelques protéases	22
XI	Résultats des activités des surnageant de culture S1, S15 et S10 récupérés dans un gradient de NaCl allons de 0% à 25% et testé sur DSMZ 3754	23

Liste des figures

Figure	Titre de la figure	Page
1	Protocole d'extraction acide et à froid des proteins	10
2	protocole de l'extraction acide et à froid des protéines totales a partir des cellules	11
3	Activités des surnageant SC 15 et SC8 après ajout de l'acétone	18
4	l'effet de la température à 80°C	21

Sommaire

Liste d'abréviation	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction.....	01
chapitre I : Synthèse bibliographique	
Les halobacteriaceae.....	03
Taxonomie	03
Intérêt biotechnologique	03
Halocines	04
Définition	04
Historique.....	04
Classification	04
Production des halocines	04
Spectre et mode d'action	04
Chapitre II : Matériels et Méthode	
I. Matériels.....	07
I.1. Matériels biologique.....	07
I.1.1 Germes producteurs	07
I.1.2.Germe cible.....	07
I.1.3Réactifs et appareillage.....	07
I.1.4 Milieux de culture.....	07
II Méthodes	08
II.1. Culture des souches halophiles.....	08
II.1.1.Préparation de la pré-culture.....	08
II.1.2.Culture	08
II.2. Extraction des substances actives	08
II.2.1.Extraction acide et a froid.....	08
II.2.1.1. Effet de PH.....	08
II.2.1.2. Effet du PH de la culture sur l'extraction des protéines totales	08
II.2.1.3. Détermination de la durée d'extraction.....	09
II.2.2.Extraction a l'acétone	12
II.3. Stabilité des extraits et surnagent actifs a différents agents physico chimique.....	12
II.3.1. Effet de la température.....	12
II.3.2.Effet des solvants.....	12
II.3.3.Effet des protéases.....	12
II.3.4.Stabilité des surnagent actifs à faible salinité	12
II.3.5.Stabilité des extraits actifs à de faibles salinités	13
II.4. détermination du titre des extraits protéique.....	13

Chapitre III : Résultats et Discussion

I. Extraction des protéines.....	15
I.1. extraction acide et à froid	15
I.1.2 effet du PH de l'extraction.....	17
I.1.3. Effet du PH de culture avant l'extraction.....	17
I.1.4. Détermination de la durée d'extraction	17
I.2. Extraction par l'acétone	18
II. Détermination du titre des extraits protéiques.....	18
III. Effet de quelques facteurs physico chimiques sur les substances actives.....	19
III.1.Effet de la température sur les surnagent	19
III.2. Effet de quelques solvants sur certains Ep. et surnageant SC.....	21
III.3. Effet des protéases	22
III.4. stabilité des extraits actifs à de faible osmolarité	23
Conclusion	25
Références bibliographiques	
Annexes	

Introduction

Introduction

La production de peptides et de protéines antibiotiques est une caractéristique quasi universelle des organismes vivants, indépendamment de la classification phylogénétique. Les bactériocines, protéines antimicrobiennes du domaine *Bacteria* ont été étudiées depuis plus de 75 ans et les eucaryocines protéines antimicrobiennes du domaine *Eucarya* depuis le début des années 1960. Cependant, le domaine *Archaea*, qui comprend les hyperthermophiles, des halophiles extrêmes et des méthanogènes, commence juste à être étudié pour la production d'antibiotiques de nature protéique. (O'Connor et Shand ; 2002)

Le mot halophile est composé de deux parties « halos » qui veut dire le sel et « phil » qui veut dire aime, de ce fait les microorganismes halophiles sont définis comme étant des organismes qui requièrent du sel pour leur croissance (Ebel *et al* ; 2004). Les archées halophiles extrêmes sont très fréquentes dans les lacs salés et les salines ou mares préparées pour l'évaporation de l'eau de mer conduisant à l'obtention de sel marin, dans les sédiments salés. Elles peuplent aussi les lacs hypersalés, les lacs alcalins, les sols salés et le sable marin. La plupart des haloarchées sont aérobies, chimio-organotrophes (Ochsenreiter *et al* ; 2002) .En raison de la tolérance à ces facteurs de stress environnementaux, les protéines de ces organismes sont très recommandées en biotechnologie pour leur stabilité et leur capacité à fonctionner où d'autres protéines sont carrément dénaturées (Charlesworth *et al* ;2015) .

Notre travail, porte sur l'étude de la stabilité de certaines substances antibiotiques produites par des souches halophiles extrêmes isolées de milieux hypersalins algériens. Dans la première partie nous avons abordés une synthèse bibliographique sur les dernières données relatives aux protéines antibiotiques les plus connues à savoir les bactériocines. Dans la deuxième partie nous avons présentés les haloarchées comme étant une nouvelle source de nouvelles molécules bioactives de nature protéiques et en fin la dernière partie comporte les données récentes sur les halocines connues.

Dans la partie expérimentale, nous avons tentés d'extraire des substances actives à partir des cultures de souches halophiles extrêmes. Par la suite les molécules actives récupérées sont testées pour leur stabilité vis-à-vis de certains paramètres physico chimiques.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

Les halobacteriaceae

Les *Halobacteriaceae* sont des archéobactéries extrêmement halophiles qui habitent des milieux hypersalins aquatiques. (Rodriguez *et al* ; 1982, Meseguer *et al* ; 1986). Tous les membres de la famille ont une forte exigence de sel, et la plupart se développent de manière optimale à des concentrations de sel supérieures à 150-200 g / l. La plupart des espèces sont pigmentées rouge-rose par des pigments caroténoïdes et ont un métabolisme chimiohétérotrophe aérobie. Certains ont la capacité de se développer de manière anaérobie par la fermentation, la respiration anaérobie ou à l'aide de bactériorhodopsine pour absorber la lumière en tant que source d'énergie. (Aharon Oren ; 2014).

Taxonomie

La famille *Halobacteriaceae*, proposée pour la première fois par Gibbons en 1974, est affiliée au phylum archéotique *Euryarchaeota* ; En juin 2014, la famille *Halobacteriaceae* contenait 47 genres et 179 espèces. (A oren ; 2014).

Intérêt biotechnologique

En comparaison avec d'autres groupes de microorganismes extrémophiles tels que les thermophiles et les alcaliphiles, les halophiles des trois domaines ont été relativement peu exploités dans les procédés biotechnologiques, avec des exceptions notables de β -carotène de *Dunaliella*, de bactériorhodopsine d'*Halobacterium* et d'ectoïne d'*Halomonas*. L'attention aujourd'hui est attirée vers les métabolites secondaires des halophiles ainsi que la bioremédiation et la production de biocarburants.

Une des réussites de la biotechnologie halophile est la production et l'application de l'ectoïne de soluté compatible, actuellement produite à grande échelle. (Yanhe Ma ;2010).

Plusieurs autres applications présentes ou potentielles des halophiles sont examinées, y compris la production de polymères (polyhydroxyalcanoates et polysaccharides), des enzymes et l'utilisation de ces extrémophiles dans la récupération accrue du pétrole, la détection du cancer, le dépistage des médicaments et la biodégradation des résidus et Composés toxiques.

Halocines

Définition

Les halocines sont des antibiotiques protéinés qui sont produits par des membres extrêmement halophiles du domaine Archaea et sont extériorisés dans l'environnement, où ils tuent ou inhibent d'autres haloarchaeons. En tant que tel, les halocines sont l'équivalent halogénale des antibiotiques protéiques bien caractérisés appelés bactériocines. (Price et Shand ; 2000).

Historique

Le terme «halocine» a été inventé en 1982 par Francisco Rodriguez-Valera, qui a supposé que ces substances étaient des bactériocines et qui appliquaient logiquement une nomenclature similaire (Rodriguez-Valera *et al* ; 1982).

Classification

Les halocines peuvent être divisées en deux classes en fonction de la taille: les petites micro-halocines qui peuvent être aussi petites que 3,6 kDa aux halocines plus grandes de 35 kDa ; Les microhalocines sont hydrophobes et robustes, résistent à la chaleur, au dessalage et à l'exposition aux solvants organiques. (O'Connor and Shand ; 2002.)

Production des halocines

L'activité halocine est d'abord détectable dans les surnageants de culture au début de la transition en phase stationnaire, associée à une induction de la transcription du gène structurel.(O'Connor and Shand ;2002) .À ce jour, tous les gènes d'halocine connus sont codés sur les mégaplasmides (>100kbp) et possèdent des régions typiques de promoteur TATA et BRE de haloarchéal.Les transcriptions d' Halocines sont sans direction et utilisent la double translocation d'arginine (Tat)Les préprotéins traduits ou les préproprotéines sont exportés.(Karthikeyan ; 2013).

Spectre et mode d'action

L'activité antimicrobienne des halocines peut également varier, avec certaines halocines ayant une portée étroite d'activité affectant seulement des proches, par opposition à une halocine A4 plus large activement capable d'inhiber la croissance de *Sulfolobus solfataricus*, un représentant d'un autre phylum d'archaea (Haseltine ; 2001). On a signalé

mécanisme d'action de l'halocine peut impliquer une modification De perméabilité cellulaire ou d'inhibition de l'anti-pore Na^+ / H^+ et du flux Proton (Price et Shand ; 2000)

Chapitre II

Matériels et méthodes

I. Matériels :

I.1. Matériels biologique

I.1.1 Germes producteurs

Les Haloarchées utilisées dans cette étude font partie de la collection de souches du laboratoire de Génie Biologique (Tableau I).

Tableau I Echantillons utilisés pour l'isolement des halophiles extrêmes

Souches	Source	Année d'isolement	Conditions d'isolement	Genre affilié (Gène ARNr 16S)
S1	Sebkha d'Ouargla	1999	37°C, pH7	<i>Haloarcula sp</i>
S8	Sel d'Ichekaben	2009	40°C, pH7	<i>Natrinema</i>
S15	Saline de Batna	2010	40°C, pH7	-

- : non caractériser

I.1.2. Germe cible

Afin de mettre en évidence l'activité antimicrobienne, la souche de référence *Halobacterium salinarum* DSMZ37545 (MACAM.MNHN, France) est utilisée comme germe cible.

I.1.3 Réactifs et appareillage

Les réactifs et appareillage utilisés sont dans l'annexe II.

I.1.4 Milieux de culture

Les milieux MB, MF et MA ont été utilisés pour la croissance des souches productrices des antibiotiques. Pour la mise en évidence de l'activité antimicrobienne nous avons utilisé le milieu MH et MC. La composition de ces milieux est dans l'annexe I.

II Méthodes

II.1. Culture des souches halophiles

II.1.1.Préparation de la pré-culture

Une colonie fraîchement obtenue est inoculée dans un milieu liquide en tube, celui-ci est incubé à 40°C sous agitation (200rpm) pendant 24 à 48 h. Après deux à trois repiquages dans les mêmes conditions, la pré-culture est prête à utiliser.

II.1.2.Culture

La pré-culture est inoculé dans des tubes à essai contenant 2 ml de milieu ou dans des Erlen de 250ml contenant 50 ml de milieu. L'incubation est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment pendant 7 à 14 jours.

II.2. Extraction des substances actives

II.2.1.Extraction acide et a froid

Les cultures sont centrifugées à 14000rpm pendant 10min, les surnageant et les cellules récupérés sont traités avec une solution d'acide phosphorique à 5% à PH 1 puis mis à 4°C pendant 1h30 puis centrifugé pour récupérer les protéines précipités.

II.2.1.1. Effet de PH

Le surnageant de la culture de la souche S15 est répartis en 3 volumes égaux puis ajusté à PH 1,1.5 et 2 (acide phosphorique à 5%) après 1h30 à 4°C les EP sont récupéré et leur activité antibiotique est testée.

II.2.1.2. Effet du PH de la culture sur l'extraction des protéines totales

le PH de certaines culture a été ajusté à 6 avant de faire l'extraction ,l'activité est testée et comparée a celle des culture dont le PH est non ajusté.

II.2.1.3. Détermination de la durée d'extraction

A fin de déterminer la durée nécessaire pour extraction, les surnageant centrifugées sont ajustés à PH1 (acide phosphorique à 5%) mis à 4°C pendant 1h et une nuit L'activité est ensuite testée

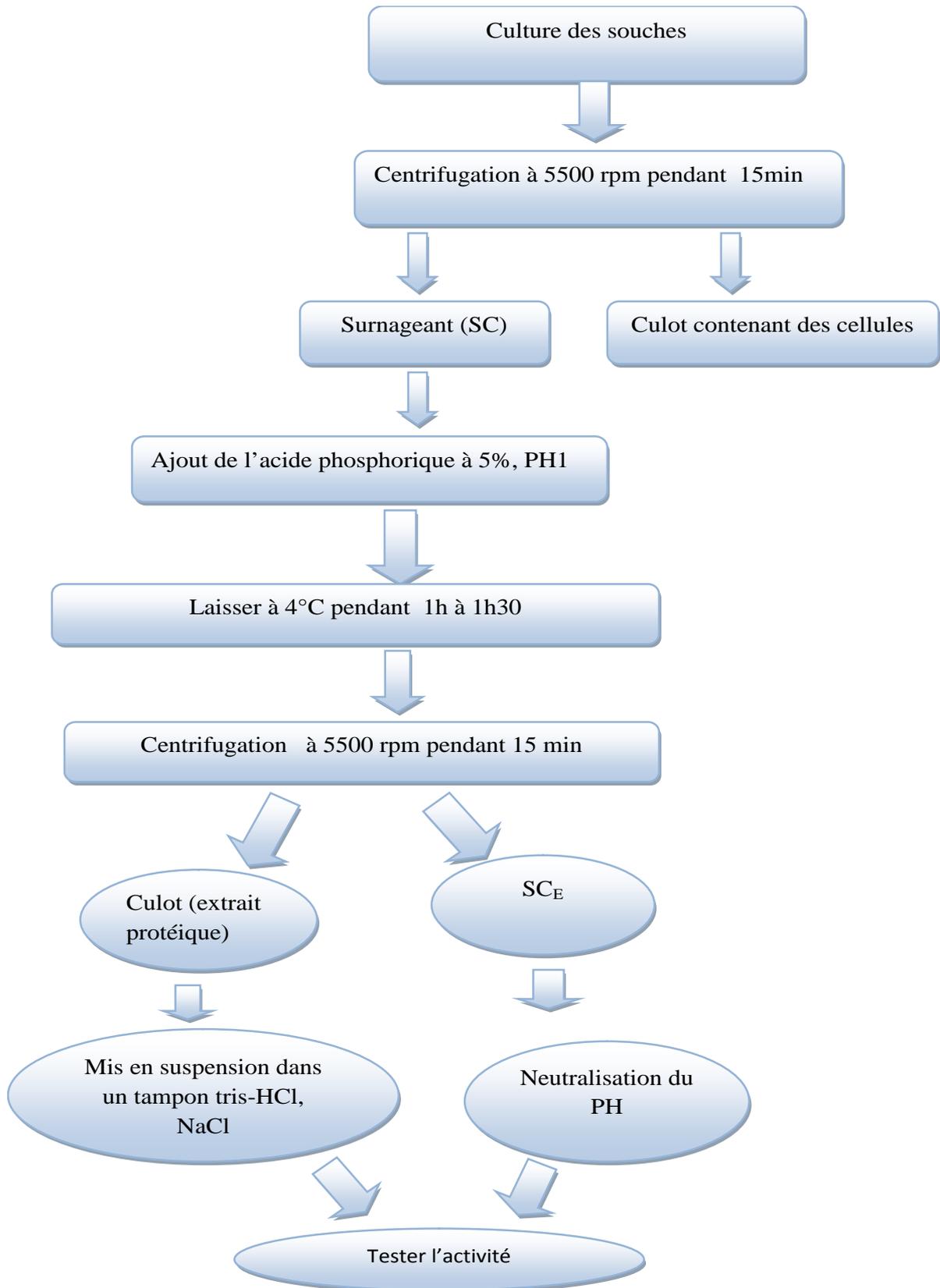


Figure 1 : protocole de l'extraction acide et a froid des protéines totales a partir de surnageant de culture

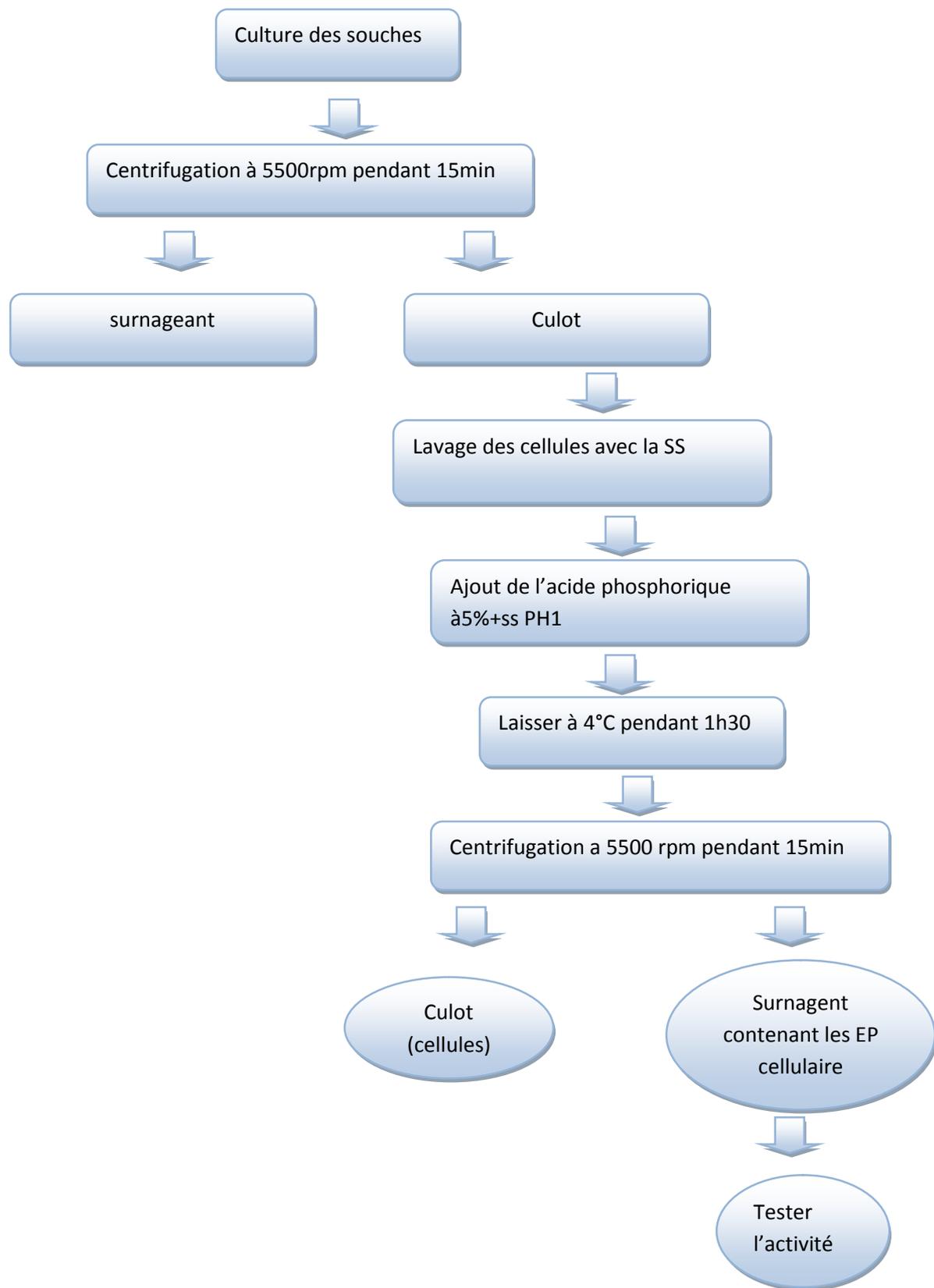


Figure 2 : protocole de l'extraction acide et à froid des protéines totales a partir des cellules (Yang et al ; 1992)

II.2.2.Extraction a l'acétone

L'acétone est ajouté aux surnagent (V/V) et mélangé. Après un moment on a remarqué l'apparition de 2 phase : la phase supérieure qui correspond a l'acétone+l'extrait protéique et une phase inférieure qui correspond au surnagent ; l'activité de ces dernières est testée.

II.3. Stabilité des extraits et surnagent actifs a différents agents physico chimique

II.3.1. Effet de la température

Afin d'évaluer leur stabilité thermique ; les surnagent et les EP actifs ont été incubés à différentes températures : 60°C ,80°C, 100°C, et 120°C .l'activité de chaque échantillon est vérifiée en déposant des spots sur le germe cible après, 30min, 60min et 1h de traitement.

II.3.2.Effet des solvants

Des solvants organiques et des détergents ont été ajoutés aux extraits et surnagent actifs (V/V)des souches S15, S8et S4.Après 1h de contacte à température ambiante , l'activité de chaque extrait et surnagent est testée, en présence du solvant seul comme témoins négatif.

Les solvants et détergents utilisés sont : méthanol, propanole, butanol, acétone, acetonitrile, éthanol, SDS, EDTA, triton X100, tween 20, tween 80

II.3.3.Effet des protéases

Les surnagent actifs de de S8 et S15 et les EP de S6, S1, S3et S4ont été traités avec différentes protéases, la trypsine, la papaine, pepsine a des concentrations finale de, 4mg/ml et 10mg/ml pour chaque protéase. Après 1h d'incubation a 37°C, suivie d'un chauffage à100°C pendant 10min, les échantillons sont testés pour l'activité résiduelle.

II.3.4.Stabilité des surnagent actifs à faible salinité

Après extraction acide et à froid des surnageant, les extraits ont été récupérés dans un gradient de NaCl : 0%,5%,10%,15%,25%.Nous avons testé les surnageant des fractions S1, S15 et S10.

II.3.5. Stabilité des extraits actifs à de faibles salinités

Une série de dilution allant de la dilution $\frac{1}{2}$ jusqu'à la dilution $\frac{1}{64}$ est réalisée pour les EP actifs dans de l'eau distillée. L'activité antibiotique est en suite déterminée pour chaque dilution.

II.4. détermination du titre des extraits protéique

Des dilutions en cascade des extraits protéique dans la solution SS sont réalisées .L'activité antibiotique est testée sur *H.salinarum* DSMZ3754.

Chapitre III

Résultats et Discussion

❖ Résultats et Discussion

I. Extraction des protéines

I.1. extraction acide et à froid

Après extraction des surnageant de culture et du culot cellulaire avec de l'acide phosphorique (5%), les résultats montrent (Tableau II). Sur 22 surnageant de culture, 12 sont actifs et 11 activités sont retrouvées dans les extraits protéiques. Nous remarquons qu'après extraction, une faible activité persiste dans le surnageant (SC_E), c'est peut-être dû au PH d'extraction qui est très acide.

Pour les SC_E , on a remarqué une activité de toutes les cultures dont la meilleure est S2A.

Les Extraits de culture S3BM et S4A ont donné une meilleure activité sur DSMZ par rapport au surnageant SC de leur culture et au SC_E . Alors que le SC_E de la culture S2A a donné une activité contrairement a son extrait Ep. et son surnageant SC dont on n'a pas remarqué d'activités, on peut donc dire qu'il ya pas eu d'extraction.

Tableau II : Détermination de l'activité antibiotique sur *H.salinarum* DSMZ3754 dans les surnageant de cultures(SC), les extraits protéiques (EP),et dans les surnageant (SC_E)après.

Extraction

Activité EP	Volume (ml)	PH	Activité de SC (mm)	PH après addition de l'acide phosphorique	Activité d'EP sur DSMZ (mm)	Volume d'EP (ml)	Activités Des SC _E sur DSMZ (mm)
S2BM	-10	7.55	6	1.07	-	1.4	6
S3BM	10	7.48	5	1.04	16 (st)	3	6
S3Br10		7.00	-	1.08	-	2	9
S33 (2J)	3.5	7.63	-	1.00	-	-0.5	5
S1A	-2	8.20		1.08	8	0.5	7
S1B	4	7.75	16	1.06	15	-0.5	7
S2A	-3	7.94	-	1.07	-	-0.5	14
S2B	2	7.99	-	1.08	-	-0.5	4
S3A	15	7.57	-	0.99	-	0.6	4
S3B	15	7.52	-	1.01	-	0.5	4
S3A+B	15	7.63	-	1.09	-	1	5
S4A	15	7.62	+	1.07	15	1.4	3
S4B	12	7.64	16	1.06	17	0.6	5
S6A	3	8.08	-	1.04	17	0.5	8
S6B	15	7.50	20	1.06	20(nette)	-0.5	3
S7A	1	8.02	4	1.08	-	-0.5	8
S7B	1	7.66	4	1.02	8	-0.5	6
PC S1	2	7.62	7	1.01	7(st)	0.6	6
PC S2	12.5	7.72	14	1.00	-	1.3	6
PC S3	12.5	7.64	6	1.02	-	0.8	4
PC S4	13.5	7.69	13	1.00	16	1.4	4
PC S6	9.5	8.14	22	1.06	12	0.5	23

I.1.2 effet du PH de l'extraction

Tableau III: Activités des Ep et SCE à différents PH

Activité \ PH	1	1,5	2
EP	6,5	5	2
SCE	-	-	-

Nous remarquons que la meilleure extraction est obtenue à PH 1.

I.1.3. Effet du PH de culture avant l'extraction

Le PH de certaines cultures a été ajusté à 6 avant l'extraction, l'activité testée a été comparée à celle des cultures dont le PH est non ajusté, les EP extrait à partir des cultures dont on a ajusté le PH à 6 avant l'extraction ont donné une activité plus importante par rapport à ceux obtenus à partir des cultures où le PH est non ajusté (tableau IV). par conséquent l'adsorption de la substance active produite dépend du PH de la culture.

Tableau IV: activités des Ep. SCE et SC ajusté à PH 6

souches	PH de la culture	Volume		Activité sur <i>H.salinarum</i> DSMZ3754 (mm)			
		SC	EP	EP de SC	SCE	SC	EP cellulaire
S10(MA)	Ajusté à 6	37ml	0.6ml	-	-	-	4
S9(MF)	Ajusté a 6	13ml	1ml	-	-	-	10
S8(MA)	Non ajusté	38ml	1.5ml	28	-	25	-
S11(MA)	non ajusté	5	-	-	-	-	-

I.1.4. Détermination de la durée d'extraction :

Deux volumes égaux des surnageant ont été extrait à l'acide phosphorique l'un est mis 1h à l'acide phosphorique et l'autre une nuit à 4°C .Après récupération des extraits protéiques l'activité est beaucoup plus importante lorsque l'extraction dure une nuit .Le surnagent S8 est mis au contacte de l'acide phosphorique pendant 1 nuit tandis que le S11 le contacte a

l'acide phosphorique a duré 1h, les résultats montre que l'activité de EP de S8 est beaucoup plus importante par rapport a celle de EP S 11

I.2. Extraction par l'acétone :

L'acétone est ajouté aux surnageant SC15et SC8 (v/v) après 1h de contacte à température ambiante on remarqué l'apparition de deux phase : une phase supérieure qui correspond a un mélange de liquide et une phase inférieure qui correspond aux protéines précipitées. L'activité des antibiotiques des deux phases est vérifiée, les résultats obtenues montrent qu'il ya eu extraction par l'acétone mais elle est faible cela pourra s'expliquer par le temps de contacte qui est insuffisant.

Tableau V: activités antibiotiques des surnagent SC 15 et SC 8 extrait à l'acétone

SC	Activité H.salinarum (mm)		
	témoin	phase1	phase2
SC S15	23	7	7
SC S8	14	5	2



Figure 3: Activités des surnageant SC 15 et SC8 après ajout de l'acétone

II. Détermination du titre des extraits protéiques

Pour chaque EP et surnageant actif on a réalisé une série de dilution allant de la dilution 1/2 jusqu'à la dilution 1/64 dans la solution saline, l'activité de chaque dilution est testée.

Unité arbitraire (UA), est définie comme étant la réciproque de la première dilution à laquelle disparaît toute trace d'activité inhibitrice (Cheung et al, 1997). ainsi les trois extraits sont de 8 UA (tableau VI)

Tableau VI : Détermination du titre des extraits protéiques

EP dilution	Activité (mm)		
	EP S15	EP S1	Sc8
0	6	8	11
½	6	6	10
¼	4	4	8
1/8	0	0	0
1/16	0	0	0
1/32	0	0	0
1/64	0	0	0

III. Effet de quelques facteurs physico chimiques sur les substances actives

III.1. Effet de la température sur les surnageants

Après traitement de certains Ep actifs et surnageant à différentes températures (60°C, 80°C, 100°C et 120°C) l'activité a été testée après 10min, 30min et 1h de contact. Les résultats montrent, l'activité inhibitrice de l'EP S1PC disparaît dès le premier traitement thermique donc elle est thermolabile, l'activité des EP : S1B, S4B, S7B, S6B et S6PC persiste à de hautes températures allant jusqu'à 120°C, donc ces EP sont thermorésistants, l'activité des EP : S1A, S4A, S4PC, S6A disparaît à 100°C donc ils sont résistants à 80°C ; le SC 15 a été traité à 60°C et 100°C où il montre une activité résistante à ces températures. (tableau VII).

Tableau VII: Activité des Ep et SC après traitement à la chaleur à 60°C, 80°C, 100°C et 120°C

T° EP	60			80			100			120	EP témoin
	10min	30min	1h	10min	30min	1h	10min	30min	1h		
S1B	9	10	7	4	4		12	12	12	9	15
S6B	9	10	8	6	-	-	3	-	-	8	20
S1PC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7
S4B	13	12	9	9	9	10	11	11	11	11	17
S7B	12	10	9	8	8	6	4	4	4	4	8
S1A	10	10	8	4	4	4	-	-	-	-	8
S4A	12	9	8	6	6	3	-	-	-	3	15
S4PC	12	10	8	7	7	7	-	-	-	-	16
S6PC	11	7	7	4	4	4	4	3	3	2	12
S6A	14	16	12	8	8	8	-	-	-	-	17
SC15	9	7	4	-	-	-	10	6	4	-	23



Figure 4: l'effet de la température à 80°C

III.2. Effet de quelques solvants sur certains Ep. et surnageant SC

L'effet de certains solvants sur EPSC15 et SC8 ainsi que Ep4 et après test d'activité de ces dernies ainsi que les solvants seul comme témoin les résultats suivants sont obtenus (tableau VIII, IX)

Tableau VIII: Résultats des activités de quelques solvants seuls comme témoins

Solvant	activité (mm)
Butanol	15
Méthanol	-
Acétone	-
Acetonitrile	-
Propanole	15
Ethanol	-
TritonX100	-
Tween20	15
Tween80	16

Tableau IX : effet des solvants organiques et détergents sur l'activité antibiotiques des surnageant et des Ep.

Activité sur *Halobacterium salinarum* DSMZ3754 (mm)

EP et SC	butanol	Ethanol	Méthanol	acétone	acetonitrile	tween 20	tween80	propanole	triton X100	T	EDTA	SDS
EPS4B	6	3	-	3	-	14	-	6		17	8	27
EPS6	5	7	3	-	-	-	12	-		20	12	18
EPS3BM	-	-	-	-	-	12	11	-	-	16	-	-
SC S15	-	-	-	-	-	12	21	+	9	28	9	23
SC S8	11	-	-	-	-	11	14	-	9	27	10	19

les deux solvants : butanol et propanol ont une activité inhibitrice sur *H.salinarum* de 15mm, les détergents tween 20 et tween80 exercent aussi une activité inhibitrice sur *H.salinarum*

III.3. Effet des protéases

Les surnagent actifs : SC de S8 et SC de S15 et le EP S6 EP S1 EP S3BM et EPS4ont été traités avec différentes protéases après 1h a 37°C et 10 min a 100°C l'activité à été tester et les résultats obtenus sont les suivant (tableau X).

Tableau X: Résultats des activités de SC8 et SC15 testé sur DSMZ 3754 seuls comme

Témoin et après ajout de quelques protéases

Protéase	papaine		trypsine		pepsine		Activité des SC témoin
	4mg/ml	10mg/ml	4mg/ml	10mg/ml	4mg/ml	10mg/ml	
SC S8 (mm)	-	-	-	-	-	-	27
SC S15 (mm)	14	9	13	8	15	13	28

- : Absence d'activité

les résultats montrent que toutes les enzymes utilisées agissent sur les deux surnagent testés, en inhibant complètement l'activité de S8, par contre l'activité de S15 est réduite de :50% et 67.85% en présence de papaine a 4mg/ml et 10mg/ml

respectivement, et de 71.42% et 46.42% en présence de trypsine a 10mg/ml et 4mg/ml, la pepsine a 10mg/ml et 4mg/ml la réduit de 53.57% et 46.42% respectivement. cela nous confirme la nature protéique de ces substances testées.

III.4. stabilité des extraits actifs à de faible osmolarité

Après extraction acide et à froid, les extraits ont été récupérés dans un gradient de NaCl, les surnageant testés sont : S1, S15 et S10 les résultats obtenus : montrent que L'activité de S15 persiste a de faible salinité même a une concentration de 0% en sel .cela veut dire que la S15 est sel indépendante. Par contre la S8 perd son activité antibiotique à partir de la dilution ¼ d'eau distillée, donc la S8 contrairement a S15 elle est sel dépendante. (Tableau XI).

Tableau XI: Résultats des activités des surnageant de culture S1, S15et S10récupérés dans un gradient de NaCl allons de 0% a 25% et testé sur DSMZ 3754

Dilution culture	0%	5%	10%	15%	25%
S1	-	-	-	-	-
S15	25mm	27mm	24mm	25mm	28mm
S10	-	-	-	-	-

- : Absence de croissance

Conclusion

Conclusion

Notre travail avait pour but l'extraction des substances actives à partir de souches d'haloarchées isolées en Algérie, et la détermination de leur stabilité vis-à-vis de certains facteurs physico chimiques.

D'après les résultats obtenus, nous concluons que :

L'extraction par la méthode acide et à froid montre que la plupart des substances antibiotiques sont récupérées avec une bonne activité inhibitrice contre la souche de référence *H.salinarum* DSMZ3754. L'extraction de la substance antibiotique est meilleure à pH 1.

L'extraction acide à partir des cellules permet de retrouver l'activité antibiotique, particulièrement lorsque la culture est ajustée au préalable à pH6. Cela nous permet de dire que ces substances antibiotiques, comme les bactériocines, ont la capacité de s'adsorber à la surface cellulaire.

Une extraction maximale à d'acide phosphorique est obtenue après une incubation d'une nuit à 4°C.

Les résultats de la sensibilité à certains facteurs physico chimiques nous a révélé que :

La plupart des extraits actifs sont thermorésistants notamment, les extraits de S1, S4, S6 et S7 dont l'activité persiste même après un traitement à 120°C pendant 20 min.

L'activité de S15 est réduite en présence de protéase, cependant celle de S8 est totalement perdue.

L'activité du surnageant de la S15 n'est pas perdue en absence de NaCl, elle est donc sel indépendante. Tandis que l'activité du surnageant S8 dépend du NaCl.

Références

Bibliographiques

Références bibliographiques

A

Aharon Oren; (2014) The Family *Halobacteriaceae* the procaryote pp 41-121

A. Oren, "Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications," *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 28, no. 1, pp. 56–63, 2002.

C

Charlesworth¹ and Brendan P. Burns ,Untapped Resources: Biotechnological Potential of Peptides and Secondary Metabolites in Archaea Volume 2015 (2015), Article ID 282035, 7 pages

E

Ebel, C., and G. Zaccai. 2004. Crowding in extremophiles: linkage between solvation and weak protein-protein interactions, stability and dynamics, provides insight into molecular adaptation. *J. Mol. Recognit.* 17:382-389.

H

Haseltine, C., Hill, T., Montalvo-Rodriguez, R., Kemper, S.K., Shand, R.F and Blum, P. (2001): Secreted euryarchaeal microhalocins kill hyper thermophilic crenarchaea. *J. Bacteriol.* 183, 287-291

K

Karthikeyan, P., Bhat, S.G., and Chandrasekaran, M. (2013): Halocin SH10 production by an extreme haloarchaeon *Natrinema* sp. BTSH10 isolated from salt pans of South India. *S. J. Biol. Sci.* 2, 205-212

M

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

O

O'Connor and RF Shand Halocins and sulfobiocins: The emerging story of archaeal protein and peptide antibiotics journal of Industrial Microbiology & Biotechnology (2002) 28, 23–31

Ochsenreiter, T., Pfeifer, F., and Schleper, C. (2002): Diversity of archaea in hypersaline environments characterized by molecular-phylogenetic and cultivation studies. *Extremophiles*. 6, 267-274.

P

Price and Shand 2000 “**Halocin S8: a 36-Amino-Acid Microhalocin from the Haloarchaeal Strain S8a**” ;JOURNALS. ASM.ORG

R

RODRIGUEZ-VALERA, F., JUEZ, G. & KUSHNER, D. J. 125, 181-190. (1982). Halocins : salt-dependent bacteriocins produced by extremely halophilic rods. *Canadian Journal of Microbiology* 28, 151-154.

Y

Yanhe Ma, Erwin A. Galinski, William D. Grant, Ahron Oren, Antonio Ventosa. (Nov 2010), Meeting review Halophiles 2010 life in saline environments ; *Applied and Environmental Microbiology*. vol76 No21. P6971-6981

Annexes

Annexes I

Milieux de cultures

Tous les milieux sont ajustés à PH=7,2 avec une solution de (HCL/NaOH) ensuite stérilisé dans un autoclave à 120°C pendant 20 min

➤ Milieu MA

Eau distillée.....	1000ml
NaCl.....	250g/l
KCl.....	2g/l
MgSO ₄	20g/l
FeCl ₂	0.023g/l
Citrate de sodium.....	3g/l
Extrait de viande.....	7.5g/l
Extrait de levure.....	10g/l
Agar-Agar	20g/l

➤ Milieu MB

Eau distillée.....	1000ml
NaCl.....	125g/l
Extrait de levure.....	5g/l
MgCl ₂	50g/l
CaCl ₂	0.12g/l
Peptone.....	5g/l
K ₂ SO ₄	5g/l

➤ **Milieu MC**

Eau distillée.....	1000ml
NaCl.....	234g/l
KCl.....	6g/l
MgSO ₄	29g/l
MgCl ₂	19.5g/l
NaBr	0.8g/l
NaHCO ₃	0.2g/l
Extrait de levure.....	5g/l
Agar-agar.....	20g/l

➤ **Milieu MF**

Eau distillée.....	1000ml
NaCl.....	200g/l
KCl.....	4g/l
MgSO ₄	20g/l
Glycerol.....	2.5g/l
Acetate.....	2.5g/l

➤ **Milieu MH**

NaCl.....	250g/l
KCl.....	5g/l
MgSO ₄	10g/l
CaCl ₂	0.2g/l

Extrait de levure.....10g/l

Peptone pancréatique.....2.5g/l

Agar Agar.....20g/l

➤ **Solution saline à18%**

Eau distillée1000ml

NaCl..... 180g/l

MgSO₄10g/l

Annexes II

Appareillages et réactifs

1. Appareillage :

- Autoclave (PBI)
- Bain marie muni d'un agitateur rotatif (HMR-Lnv)
- Bain marie
- Centrifugeuse (6000 rpm (HETTICH, ZENTRIFUGEN. EBA20), 148000 rpm)
- Balance
- Vortex (VELP SCIENTIFICA)
- Etuves (TORRE PICENARDCCR, CBM)
- Plaque chauffante et agitateur magnétique (TRADE RAYPA)
- Spectrophotomètre

2. Matériels :

- Micropipette (Fortuna)
- Pipette pasteur
- Pipette
- Boîtes de Pétri
- Erlen-Meyer (25, 50, 100, 250, et 500 ml)
- Béchers
- Poires
- Bec bunsen
- Spatule
- Eprouvettes graduées
- Tubes à essai
- Falcone
- Flacons
- Embouts

3. Solvants et enzymes :

- Acide phosphorique à 5%
- Acétone
- Ethanol
- Méthanol
- Acétone nitrile
- Butanol
- Tween 20
- Tween 80
- Triton X 100
- SDS
- EDTA
- NaOH/HCl
- Protéases

Résumé

L'objectif de notre travail est l'extraction de substances d'antibiotiques produites par des souches d'*haloarchées* suivie l'étude de leur stabilité vis-à-vis de certains facteurs physico-chimiques

La méthode d'extraction testée, acide et à froid. Nous a permis d'extraire une bonne activité inhibitrice.

La plupart de ces substances antibiotiques sont thermostables, elles résistent à des températures élevées (jusqu'à 120°C).

La substance antibiotique produite par la souche S15 est active même en absence de sel, elle est sel indépendante, alors que celle produite par la souche S8 est sel dépendante.

L'antibiotique produit par la S8 est sensible à toutes les protéases testées par contre celle produite par S15 est résistante.

Mots clés : antibiotique, halophiles, extraction, sensibilité,

Abstract

The objective of our work is the extraction of antibiotic substances produced by strains of *haloarchaea*, followed by the study of their stability to some physicochemical factors.

The acidic extraction in cold enabled us to extract a good inhibitory activity.

The majority of these antibiotic substances are thermostable; they resist o high temperatures (until 120°C).

The antibiotic substance produced by the strain S15 is active even in absence of salt, it is salt independent, whereas that produced by the strain S8 is salt dependent.

The antibiotic produced by S8 is sensitive to all the proteases tested, whereas, the one produced by S15 is resistant.

Key words: antibiotic, halocin, halophiles, extraction, sensibility