

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université Abderrahmane MIRA de Béjaïa**

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Microbiologie  
Filière : Sciences Biologiques  
Spécialité : Biotechnologie Microbienne



Réf : .....

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

**MASTER**

*Thème*

**Contribution à l'étude des potentialités  
biotechnologiques de quelques souches  
halophiles extrêmes**

**Présenté par :**

**DAHMANI Fatiha & IKHLEF Nabila**

Soutenu le : 22 Juin 2017

**Devant le Jury composé de :**

**M<sup>me</sup> OUKIL**

**M.C.A**

**Présidente**

**M<sup>elle</sup> DJINNI**

**M.C.B**

**Examinatrice**

**M<sup>me</sup> IDRES. N**

**M.A.A**

**Promotrice**

*Année Universitaire*  
**2016/2017**



# *Remerciements*

**A**vant tout, nous remercions ALLAH, le miséricordieux, le tout puissant et le plus clément qui nous aide et nous donne le courage de tout faire.

**N**ous tenons à exprimer nos sentiments de reconnaissance à toutes les personnes qui ont participé à ce travail, qui nous ont appris une infinité de choses et qui nous ont aidé, conseillé et soutenu à tout moment afin de réaliser ce travail dans les meilleures conditions.

**E**n premier lieu, nous adressons nos vifs et sincères remerciements à **M<sup>me</sup> IDRES. N**, notre promotrice et directrice du Laboratoire de Génie Biologique de nous avoir accueilli au sein de son laboratoire et pour l'intérêt qu'elle a porté à notre travail ; mais également pour nous avoir fait l'honneur pour son encadrement et ses orientations. Nous lui devons beaucoup pour la confiance qu'elle nous a témoigné ainsi que ses encouragements et les conseils qu'elle nous a prodigué. Nous ne saurions la remercier assez pour son soutien et son suivi scientifique le long de la réalisation de ce travail. Qu'elle reçoive l'expression de nos vives gratitude.

**I**l nous est particulièrement agréable d'exprimer, également, nos remerciements à l'ensemble des membres du jury, pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant d'examiner et de juger ce travail.

**U**n immense merci, également, aux techniciens du laboratoire de Génie Biologique pour leur gentillesse, leurs précieux conseils, leur disponibilité et d'avoir fourni une aide matérielle et technique, ou tout simplement humaine.

**E**nfin, nos sincères remerciements à nos familles et nos amis(es).

*Fatiha & Nabila*

# *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail*

*À*

*Ceux qui, grâce à leurs encouragements, leur présence, leurs conseils, leur soutien et leur persévérance j'ai pu dépasser tous les obstacles, à mes très chers parents que je ne saurai remercier*

*À*

*Ceux qui ont toujours été là pour moi, mes frères "Brahim " et "Hocine "*

*À mes sœurs "Rebiha, Saida, Hania et fazia "*

*À*

*Toute ma famille, en particulier mes cousins et cousines qui ont montré une totale disponibilité à chaque sollicitation*

*À*

*Mon binôme et amie, Nabila, qui m'a beaucoup aidé à qui je dis bon courage et bonne continuation*

*À*

*Tous mes amis(es) et tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin*

*Fatiha*

# *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail*

*À*

*Ceux qui m'ont donné la vie, qui m'ont élevé et tant appris, qui seront à jamais mes modèles et que j'aime tant, mes très chers et précieux parents les bien aimés*

*À*

*Celles qui sont les plus belles à mes yeux, aux jeunes filles qu'elles sont devenues et qui inspirent joie et bonne humeur, dont je suis fière et que j'aime tant mes sœurs "Kahina " et "Maïssa "*

*À*

*Ceux qui ont toujours eu une pensée pour moi, à mes tantes et oncles, à mes cousins et cousines que j'aime et à toute la famille IKHLEF*

*À*

*Ma seconde famille, ceux qui m'ont encouragé et soutenu, ceux qui ont toujours été là pour moi, ceux qui m'ont offert leur aide quand j'en avais besoin, ceux avec qui j'ai passé de merveilleux moments, à mes amis(es)*

*À*

*Toi Fatiha, mon binôme et amie, avec qui j'ai partagé la joie et les difficultés relatives au suivi de ce travail, à qui je souhaite beaucoup de réussite*

*À*

*Tous mes enseignants et toute la promotion 2017 de Biotechnologie Microbienne*

*Nabila*

*« Quel que soit le critère auquel on se réfère, les bactéries furent dès le début, sont aujourd'hui et resteront les organismes les plus réussis de la terre »*

*S.J.Gould (1977), "L'éventail du vivant». Ed du seuil, ISBN 2-02-04093, p55*

# **Sommaire**

## Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

**Introduction** ..... 1

### **PARTIE I : Revue Bibliographique**

I. Archaea halophiles extrêmes.....	2
I.1. Microorganismes Extrêmophiles .....	2
I.2. Halophiles .....	2
I.2.1. Définition .....	2
I.2.2. Diversité métabolique .....	2
I.3. Archaea .....	3
I.3.1. Définition et Caractéristiques .....	3
I.3.2. Découverte des Archaea .....	3
I.3.3. Classification des Archées .....	3
I.4. Haloarchaea.....	4
I.4. 1. Généralités .....	4
I. 4.2. Classification.....	4
I.4.3. Archées halophiles extrêmes.....	4
II. Antibiotiques de nature protéique.....	6
II.1. Bactériocines .....	6
II.1.1. Historique .....	6
II.1.2. Définition.....	6
II.1.3. Classification .....	6
II.1.4. Production des bactériocines .....	7
II.1.5. Mode d'action.....	7
II.1.6. Intérêt et Applications .....	7
II.2. Halocines .....	7
II.2.1. Définition.....	7
II.2.2. Caractéristiques des halocines décrites.....	8
II.2.3. Spectre d'activité .....	9
II.2.4. Mode d'action.....	9
II.2.5. Intérêts et Applications .....	9



## **PARTIE II : Partie Pratique**

### **Matériel et Méthodes**

I. Matériel .....	10
I.1. Matériel biologique .....	10
I.2. Appareillages et réactifs.....	11
I.3. Milieux de culture .....	11
II. Méthodes .....	11
II.1. Culture des souches halophiles.....	11
II.1.1. Préparation de la pré-culture.....	11
II.1.2 .Culture .....	11
II.2. Estimation de la croissance.....	11
II.3. Recherche d'un milieu optimal pour la croissance des souches halophiles .....	12
II.4.Caractérisation phénotypique .....	12
II.5. Caractérisation physiologique des souches .....	12
II.5.1. La croissance des souches à différentes T° .....	12
II.5.2. La croissance des souches à différents pH .....	12
II.5.3. La croissance des souches à différentes concentrations de NaCl.....	12
II.5.4. La croissance des souches à différentes concentrations de MgSO4.....	13
II.5.5. Détermination de la concentration minimale en NaCl empêchant la lyse cellulaire .....	13
II.6. Caractérisation biochimique des souches .....	13
II.6.1. Utilisation de quelques substrats carbonés par les souches d'haloarchées.....	13
II.6.2. Croissance sur le milieu mannitol-mobilité.....	13
II.6.3. Production d'indole .....	13
II.6.4- Sensibilité des souches d'haloarchées à quelques antibiotiques .....	13
II.7. Recherche de substances extracellulaires produites par les souches d'haloarchées.....	14
II.7.1. Production de substances antibiotiques .....	14
II.7.2. Recherche de l'activité enzymatique .....	17
II.8. Extraction des pigments membranaires .....	18

### **Résultats et discussion**

III.1. Recherche d'un milieu optimal pour la croissance des souches halophiles.....	20
III.2. Caractérisation des souches <i>d'Haloarchaea</i> .....	21
III.3. Caractérisation physiologique des souches .....	22
III.3.1. La croissance des souches à différentes T° .....	22
III.3.2. Croissance des souches à différents pH .....	23
III.3.3. La croissance des souches à différentes concentrations de NaCl.....	23
III.3.4.La croissance des souches à différentes concentrations de MgSO4 .....	24

III.3.5. Détermination de la concentration minimale en NaCl empêchant la lyse cellulaire..	25
III.4. Caractérisation biochimique des souches.....	26
III.4.1. Utilisation de quelques substrats carbonés par les souches d'haloarchées .....	26
III.4.2. Croissance sur le milieu mannitol-mobilité .....	27
III.4.3. Production d'indole .....	28
III.4.4- Sensibilité des souches d'haloarchées à quelques antibiotiques.....	29
III.5. Recherche de substances extracellulaires produites par les souches d'haloarchées .....	30
III.5.1. Production de substances antibiotiques.....	30
III.5.1.1. Spectre d'activité antibiotique.....	30
III.5.1.2. Recherche de phage.....	31
III.5.1.3. Extraction des protéines totales.....	31
III.5.2. Recherche de l'activité enzymatique.....	32
III.6. Extraction des pigments membranaires.....	34
<b>Conclusion.....</b>	<b>35</b>

Référence bibliographiques

Annexes

# *Liste des abréviations*

**Amy** : Amykacin

**Amp** : Ampiciline

**ARN 16S** : Acide Ribo Nucléique

**ATB** : Antibiotique

**Cefo** : Cefotaxime

**Chlo** : Chloramphénicol

**Clin** : Clindamycin

**DO** : Densité Optique

**DSMZ** : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen

**Eryt** : Erythromycin

**Gent**: Gentamicin

**M Br** : Milieu Brown

**MC** : Milieu Complexe

**MH** : Milieu *Halobacterium*

**Oxa** : Oxacillin

**pH** : potentiel d'Hydrogène

**Rifa** : Rifampicin

**rpm** : rotation par minute

**Tetr** : Tetracyclin

**Vanc** : Vancomycin

**ZI** : Zone d'Inhibition

## Liste des tableaux

---

Tableau	Titre du tableau	Page
I	Caractéristiques des halocines décrites	8
II	Les souches d'haloarchées utilisées	10
III	La croissance des haloarchées sur différents milieux	20
IV	Caractérisation macroscopique et microscopique des souches haloarchées	21
V	Croissance des souches d'haloarchées à différentes températures	22
VI	Croissance des souches à différentes concentrations de MgSO <sub>4</sub>	24
VII	Résultats de la croissance sur certains carbohydrates	26
VIII	Détermination de la dégradation du mannitol et la mobilité des souches d'haloarchées	27
IX	Détermination de la production d'indole par les souches d'haloarchées	28
X	Sensibilité des souches d'haloarchées aux antibiotiques	29
XI	Antagonisme entre souches halophiles	30
XII	Action des surnageants de culture sur <i>H. salinarum</i> DSMZ 3754	31
XIII	Activité antibiotique des extraits protéiques de la surface cellulaire des souches d'haloarchées	32
XIV	Absorbance des différents extraits acétone méthanol sur le milieu MA	34

## La liste des figures

---

<b>Figure</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>1</b>	Protocole d'extraction des protéines membranaire	16
<b>2</b>	Protocole d'extraction acide et à froid des protéines totales du surnageant de culture	17
<b>3</b>	Protocole d'extraction des pigments membranaires	19
<b>4</b>	Croissance des souches d'haloarchées en fonction du pH	23
<b>5</b>	Croissance des souches d'haloarchées en fonction de la concentration du NaCl	23
<b>6</b>	Effet de la salinité sur la stabilité des souches d'haloarchées	25
<b>7</b>	Croissance de quelques souches d'haloarchées sur le milieu exempté d'indole	28
<b>8</b>	Enzymes hydrolytiques produites par différentes souches d'haloarchées	33
<b>9</b>	Activité enzymatique des souches d'haloarchées sur milieu additionné d'amidon, de Tween 20 et de lait écrémé	33
<b>10</b>	Hydrolyse de la gélatine par 16 souches d'haloarchées	34

# **Introduction**

## Introduction

---

L'amélioration des processus industriels exige des molécules robustes qui restent actives et stables dans des conditions extrêmes de pH, de température et de la pression ionique. Par conséquent, la recherche de nouvelles sources pour de nouvelles molécules est fondamentale pour élargir les possibilités biotechnologiques. Les milieux extrêmes tels que les écosystèmes hypersalins contenant des concentrations en sel neuf à dix fois plus élevé que celles de l'eau de mer (30-35 contre 3,5 % de NaCl) sont largement distribués dans le monde et ont une population microbienne diverse composée par des organismes halophiles des trois domaines de la vie. Depuis la dernière décennie, des micro-organismes florissant dans ces milieux ont été explorés comme une source de nouveaux composés vue la capacité de leurs macromolécules à rester actives à des concentrations ioniques de NaCl de plus de 2M, des températures plus de 40°C et, parfois, à des valeurs de pH supérieures à 9 (Margesin et Schinne 2001; Oren 2010; Litchfield 2011; Delgado-Garcia *et al.*, 2012 ; Moreno *et al.*, 2013 ).

Les protéines halophiles sont riches en acides aminés acides qui confèrent une charge négative en surface. Ces protéines interagissent avec les ions de chlorure et de sodium pour former des ponts en sel. Cette caractéristique contribue à la solubilité et à la stabilité structurale des protéines halophiles dans des milieux à faible activité d'eau (Fou-NRE *et al.* 2000 ; Marhenda-Egea et Bonete 2000 ; Richard *et al.* 2000). Des enzymes telles que les hydrolases, les protéases et les nucléases de glycoside des halophiles ont été analysées comme candidats pour des applications industrielles dans différents champs (Marhenda-Egea et Bonete 2000 ; Oren 2010 ; Litchfield 2011 ; Delgado-Garcia *et al.* 2012 ; Moreno *et al.* 2013) bien que la variété et la large diversité microbienne de profils hydrolytiques fassent appel à d'autres criblages approfondis dans les milieux hypersalins.

Ce travail rentre dans le cadre d'une étude ayant pour objectif principal l'étude des potentialités biotechnologiques de quelques souches halophiles extrêmes (Haloarchées) isolées à partir de milieux hypersalins Algériens.

Dans une première partie, la synthèse bibliographique montrant l'intérêt du travail est tracée en deux chapitres : le premier porte sur l'étude des Archaea halophiles extrêmes, le deuxième porte sur les antibiotiques protéiques (Bactériocines et Halocines).

Dans la deuxième partie, les travaux ont portés sur la caractérisation morphologique, physiologique et biochimique de 16 souches d'haloarchées extrêmes.

**Partie I**

**Revue bibliographique**



## **I. Achaea halophiles extrêmes**

### **I.1. Microorganismes Extrêmophiles**

Les microbiologistes utilisent le terme « extrêmophile » pour décrire les microorganismes qui vivent dans des conditions extrêmes dans lesquelles d'autres formes de vie ne peuvent pas résister, tandis que Wainwright (2003) a proposé le terme « extrêmodure » pour décrire les microorganismes qui peuvent survivre, mais ne croient pas dans ces environnements. La notion d'extrêmophiles est différente de celle de la résistance aux conditions extrêmes, elle implique que les cellules se développent et fonctionnent de manière optimale dans ces conditions (Alber *et al.*, 2001). Les premiers microorganismes extrêmophiles isolés font partie des halophiles (du grec halo, sel), découverts dans un environnement qu'on croyait dépourvu de vie, d'où son nom : la mer morte. Ils vivent dans des concentrations en sels très élevées.

### **I.2. Halophiles**

#### **I.2.1. Définition**

Le mot *halophile* est composé de deux parties « Halos = sel », et « phil = aime ». Les halophiles sont un groupe de microorganismes qui vivent dans les environnements hypersalins et exigent dans beaucoup de cas la salinité pour survivre. Ils incluent une grande diversité d'organismes, comme les bactéries aérobies modérément halophiles, les cyanobactéries, les bactéries sulfo-oxydantes, les bactéries hétérotrophes, les bactéries anaérobies, les Archaea, les protozoaires, les mycètes, les algues et les eucaryotes multicellulaires (Das Sarma, 2001). Les microorganismes halophiles sont répartis dans les trois domaines du vivant. On retrouve des bactéries halophiles (*Salinibacter ruber*), des eucaryotes halophiles (l'algue halophile *Dunaliella*) et des archées halophiles (Oren, 2000).

#### **I.2.2. Diversité métabolique**

La diversité phylogénétique dans les milieux hypersalins s'accompagne d'une diversité métabolique (Oren, 2011).

La plupart des microorganismes halophiles et halotolérants décrits sont des hétérotrophes aérobies, retrouvés dans les trois domaines de la vie (Oren, 2006).

Certaines Archaea halophiles (*Haloarcula marismortui*, *Haloarcula vallismortis*, *Haloferax mediterranei*) peuvent croître également de façon anaérobie sur le nitrate s'il est présent, en formant l'azote gazeux et/ou le protoxyde d'azote (Mancinelli et Hochstein, 1986).

### I.3. Archaea

#### I.3.1. Définition et Caractéristiques

Ce sont des microorganismes qui se développent de façon optimale dans des milieux hypersalins, à haute pression et à pH très faible (Das Sarma et Arora, 2002). Du point de vue morphologique, elles sont de forme sphérique, bâtonnets, spiralées, lobées ou aplaties. Certaines sont des cellules isolées alors que d'autres forment des filaments ou des agrégats avec un diamètre variant de 0,1 à 15µm. Certains filaments atteignent 200µm. Leur multiplication cellulaire se fait par fission binaire, bourgeonnement ou par fragmentation. Les cellules des archées contiennent des lipides reliés au glycérol par des liaisons éther au lieu de liaisons ester. Elles peuvent être aérobies facultatives ou anaérobies strictes, chimiolithotrophes ou organotrophes (Prescott *et al.*, 2003). En dépit de leurs similitudes morphologiques avec les bactéries, les archées utilisent les mécanismes eucaryotiques pour la transcription et la traduction (Patou, 2004).

#### I.3.2. Découverte des Archaea

Depuis la découverte des microorganismes extrêmophiles, les Archaea ont été les plus identifiées dans les environnements extrêmes, surtout associées à des sources thermales (Woese *et al.*, 1978). À l'époque, plusieurs chercheurs supposaient que celles-ci étaient d'ailleurs confinées à des écosystèmes hostiles. Les Archaea étaient même parfois considérées comme étant les seuls microorganismes pouvant survivre dans ce genre d'écosystème. Cependant, de nombreuses études ont démontré qu'il existe, dans les autres domaines de la vie (Bacteria et Eukarya) des microorganismes qui sont également capables de survivre dans des environnements extrêmes (Weber *et al.*, 2004).

#### I.3.3. Classification des Archées

D'après la phylogénie moléculaire basée sur l'ARN ribosomal 16S, quatre divisions principales ont été décrites :

- ❖ **Crenarchaeota** : regroupe les organismes thermophiles soufre-dépendants (Sulfolobales, Thermoproteales).
- ❖ **Euryarchaeota** : comprenant les Thermococcales, les Methanococcales et les halophiles extrêmes.
- ❖ **Korarchaeota** : vivent dans les sédiments des sources chaudes.
- ❖ **Nanoarchaeota** : microorganismes de petite taille vivant en symbiose avec les Crenarchaea thermophiles. (Ana *et al.*, 2008).

## **I.4. Haloarchaea**

### **I.4. 1. Généralités**

L'ordre Halobacteriales avec une seule famille *Halobacteriaceae* consiste tout à fait des halophiles. Les microorganismes exigeants le sel et ceux le tolérant sont le plus souvent retrouvés dans cette famille (Oren, 2002). La famille *Halobacteriaceae* regroupe les halophiles obligatoires. Ces derniers occupent une variété d'environnements hypersalins, et toutes leurs fonctions biochimiques doivent fonctionner dans un milieu presque saturé en sel (Robinson *et al.*, 2005).

### **I.4.2. Classification**

La famille Halobacteriaceae contient actuellement 96 espèces dont les noms ont été publiés et classifiés en 27 genres (De la Haba *et al.*, 2011). Récemment, de nouvelles espèces ont été ajoutées aux genres établis.

**Classe :** Halomebacteria

**Ordre :** Halobacteriales

**Famille :** Halobacteriaceae

**Genres et Espèces :** (Annexe III).

### **I.4.3. Archées halophiles extrêmes**

#### **I.4.3.1. Définition**

Les halophiles du domaine Archaea appartiennent à trois familles : Halobacteriaceae, Methanospirillaceae et Methanosarcinaceae. La famille des Halobacteriaceae (haloarchaea ou halobactéries) de l'ordre des Halobacteriales est composée entièrement de membres halophiles extrêmes et aérobies. Les représentants de cette famille se développent dans des environnements où la concentration saline est très élevée ( $\approx 5M$ ) et dont leur optimum de croissance varie de 3,4 à 4,2M (20-25%, p/v). Ils exigent la présence de sel pour leur croissance. Leur paroi cellulaire, ribosomes et enzymes sont stabilisés par l'accumulation de KCl (Yachai, 2009).

#### **I.4.3.2. Caractéristiques**

Les archées halophiles extrêmes sont caractérisées par : chimioorganotrophes, croissance dans un milieu contenant des acides aminés ou d'extrait de levure (Kis-papo *et al.*, 2003). Présentent un temps de génération relativement long (3-4h pour *Haloferax volcanii*), aérobies, immobiles ou mobiles avec des flagelles lophotriches, présentent une forme cocci, pléomorphe.

Une caractéristique physiologique intéressante est la présence, chez certaines espèces d'halobactéries, d'un photopigment membranaire (la bactériorubérine) qui permet la production

d'ATP, quand la teneur en oxygène dans le milieu extérieur est trop faible. Ce composé formé d'une protéine (bactériorhodopsine) associée à un photopigment semblable à un caroténoïde (rétinal) est responsable de la couleur rouge des saumures (Oren, 2002a).

#### **I.4.3.3. Adaptation des microorganismes halophiles et halotolérants**

Les microorganismes vivant en milieux salins et hypersalins rencontrent différentes difficultés qui sont la déshydratation, le stress osmotique et la faible activité d'eau, pour cela ils ont développé plusieurs stratégies adaptatives. Ils présentent de ce fait un répertoire de voies métaboliques et de biomolécules originales leur permettant non seulement de survivre dans ces conditions, mais aussi de se développer souvent de manière optimale.

De ce fait, pour être capable de vivre à hautes concentrations de sels et puisque toutes les membranes biologiques sont perméables à l'eau, les microorganismes halophiles et halotolérants doivent maintenir leur cytoplasme en iso-osmose avec le milieu extérieur. Pour atteindre cet équilibre osmotique deux stratégies existent, elles sont basées sur le principe de créer une haute pression osmotique dans le cytoplasme tout en gardant une faible concentration en ions sodium ( $\text{Na}^+$ ) (Oren, 2002), en l'expulsant grâce à un antiport  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  localisé au niveau de la membrane cytoplasmique (Oren, 2001).

#### **I.4.3.4. Biotechnologie des halophiles**

Ces dernières années un intérêt croissant est porté aux microorganismes halophiles. Leur utilisation est envisagée dans différents secteurs :

- Enzymes : amylases, protéases, xylanases, cellulases, estérases et lipases, nucléase H.
- Solutés compatibles
- Production de biopolymères
- Production de  $\beta$ -carotène par *Dunaliella*
- Bactériorhodopsine
- Production de sel : Les pigments de caroténoïdes absorbent l'énergie lumineuse, et soulèvent de ce fait la température de l'eau, en menant à des taux accrus d'évaporation. (Davis et Giordano, 1996).
- Fermentation des aliments : la sauce à poissons et la sauce de soja, implique l'activité d'une variété de microorganismes halophiles et/ou fortement halotolérants (Oren, 2002a).
- Traitement des eaux usées salines
- Production de Biocarburants
- Biodégradation

## II. Antibiotiques de nature protéique

### II.1. Bactériocines

#### II.1.1. Historique

La production bactérienne de substances antagonistes aux autres bactéries a été connue depuis 1925, avec la découverte d'antagonisme entre les espèces d'*Escherichia coli*, ces substances ont été nommées « Colicines ». Le deuxième cas fut découvert en 1927 par *Lactococcus lactis*, dénommée « Nisine ». Plusieurs décennies plus tard, de nombreuses peptides eucaryotes (Eucaryocins) ont été décrits (O'Connor et Shand, 2002).

#### II.1.2. Définition

Différentes définitions des bactériocines ont été données au cours du temps. Cependant, la définition qui reste la plus largement acceptée est celle de Klaenhammer (1988) qui définit les bactériocines comme des protéines, ou complexes de protéines, avec une activité bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice. Les bactériocines représentent une large classe de substances antagonistes qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre d'action et de leur mode d'action (Klaenhammer, 1988). Toutes les bactériocines produites par des bactéries lactiques décrites jusqu'à présent ont une activité dirigée contre les bactéries Gram<sup>+</sup>. Aucune bactériocine produite par des bactéries lactiques avec une activité contre des bactéries Gram<sup>-</sup> n'a été décrite, la membrane externe des bactéries Gram<sup>-</sup> ne permettant pas aux bactériocines d'atteindre la membrane interne, siège de leur activité.

#### II.1.3. Classification

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont réparties en quatre classes, comme proposé par Klaenhammer (1993):

**Classe I : Les lantibiotiques :** peptides de taille inférieure à 5 kDa, stables à la chaleur et qui contiennent des acides aminés inhabituels soufrés formés post-traductionnellement.

**Classe II :** Peptides de taille inférieure à 10 kDa, stables à la chaleur, ne contenant pas d'acides aminés modifiés. Leur point isoélectrique varie entre 8 et 10.

**Classe III :** Protéines de taille supérieure à 30 kDa et sensibles à la chaleur. La structure et le mode d'action de ces bactériocines diffèrent complètement des autres bactériocines produites par les bactéries lactiques.

**Classe IV :** Peptides requérant une partie carbohydratée ou lipidique pour avoir une activité.

#### **II.1.4. Production des bactériocines**

Les bactériocines sont généralement produites à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire de croissance. Elles peuvent ensuite être dégradées par les protéases produites par la bactérie lactique productrice ou être adsorbées à sa surface, ce qui mène à la baisse de la concentration de bactériocines dans la culture. Les facteurs influençant la production de bactériocines sont principalement la souche productrice, la température, le pH, la composition du milieu et la technologie de fermentation employée (Savijoki *et al.*, 2006).

#### **II.1.5. Mode d'action**

Les bactériocines ont différents mécanismes d'action. Généralement les bactériocines, comme les autres peptides antimicrobiens induisent des changements violents dans la perméabilité de la membrane cytoplasmique des cellules sensibles, qui créent l'épuisement de la force de mouvement des protons et la perte de petites molécules telles que les minéraux, ATP, sucres et acides aminés. Leurs mécanismes bactéricides varient et incluent la formation de pores (Etivier *et al.*, 2001).

#### **II.1.6. Intérêt et Applications**

L'application des bactériocines dans l'industrie agroalimentaire se résume dans l'utilisation de la nisine dans certains aliments comme agent de conservation alimentaire puisqu'elle est dotée d'une activité bactéricide ou bactériostatique vis-à-vis des spores de *Clostridium* et de *Bacillus*. Les bactériocines sont également utilisées comme source probiotique dans le domaine pharmaceutique et clinique, c'est le cas de la lacticine 3147 utilisée pour le traitement des inflammations des glandes mammaires chez la vache (Martin, 2000).

### **II.2. Halocines**

#### **II.2.1. Définition**

Les halocines sont des antibiotiques protéiques produits par les bactéries halophiles extrêmes où elles détruisent ou inhibent d'autres haloarchaeons (Price L.B et Shand R.F, 2002). Elles ont été découvertes pour la première fois par F.Rodriguez-Valera en 1982 (Rodriguez-Valera F *et al.*, 1982). La production de peptides ou de protéines antibiotiques est connue dans les trois domaines du vivant ; les bactéries produisent des bactériocines, les eucaryotes des eucaryocines, les Archaea des archaeocines dont les halocines des Archaea halophiles (O'Connor et Shand, 2002 ; Shand et Leyva, 2007).

### **II.2.2. Caractéristiques des halocines décrites**

### II.2.3. Spectre d'activité

Les études d'antagonisme au sein des *Haloarchaea* (Rodriguez- Valez *et al.*, 1982 ; Torreblanca *et al.*, 1994 ; Kis-Papo et Oren, 2000) montrent que les halocines ont un spectre d'activité large, agissant sur des espèces de différents genres et parfois sur des souches d'autres phylum (Haseltine *et al.*, 2001). En effet, les halocines R1, A4 et S8 ont une activité inhibitrice sur *Sulfolobus ssp* (hyperthermophiles du phylum des Crenarchaeota), mais actuellement aucune halocine décrite n'a d'activité inhibitrice sur des bactéries (Shand et Leyva, 2007).

### II.2.4. Mode d'action

Sur l'ensemble des halocines caractérisées, il y a que HalH7 dont le mode d'action est connu, elle induit un déséquilibre du gradient énergétique, entraînant une lyse cellulaire en agissant sur l'antiport  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (Meseguer *et al.*, 1995).

Le traitement des cellules de *Halobacterium halobium* avec la H4 induit un gonflement des cellules qui deviennent sphériques (Meseguer *et al.*, 1986).

### II.2.5. Intérêts et Applications

Les halocines ont un rôle écologique exerçant un effet de sélection qui permet l'émergence d'organismes résistants, et donc d'augmenter la diversité (Torreblanca *et al.*, 1994). L'utilisation des halocines comme agents chimiothérapeutiques, actifs contre les germes pathogènes humains ou animaux n'a pas été encore concrétisée, mais vu les centaines de différentes halocines qui restent encore non caractérisées, suggère que d'autres halocines puissent avoir des applications cliniques (Shand et Leyva, 2007).

Halocine H7 a de multiples applications dans le domaine médical-pharmaceutique comme diurétique, antihypertensif, agent protecteur contre l'ischémie cardiaque et nerveuse, agent pour réduire la résistance à l'insuline et inhibiteur de la sécrétion d'acide chlorhydrique dans la membrane de la muqueuse gastrique (Escoms *et al.*, 1996).

Elles peuvent servir de traitement pour le myocarde contre les effets nocifs de l'ischémie en diminuant la taille de l'infarctus. Ceci sert d'application pour la réduction des dommages liés à la transplantation d'organes (O'Connor et Shand, 2002 ; Shand et Leyva, 2007).



## II.2.2. Caractéristiques des halocines décrites

**Tableau I :** Caractéristiques des halocines décrites (Shand, 2006)

Halocine	H4	C8	G1	H1	H2	H3	H4	H5	H6/H7 <sup>1</sup>	R1	S8
Poids Moléculaire (KDa) <sup>2</sup>	7,4	6,3	-	31	-	-	34,9	-	32	3,8	3,6
Dépendance au sel	Non	Non	-	Oui	-	-	Partiellement <sup>3</sup>	-	Non	Non	Non
Spectre d'activité	Large <sup>4</sup> Sulfolobus ssp.	Large	Large	Large	Large	Large	Étroit	Étroit	Étroit	Large Sulfolobus ssp., Methanosarcina thermophila	Large Sulfolobus ssp.
Souche productrice	Souche TuA4	<i>Halobacterium</i> souche AS7092	<i>Halobacterium</i> souche GRB	<i>Haloferax</i> <i>mediterranei</i> Xai3	Souche GLA22	Souche GAA12	<i>Haloferax</i> <i>mediterranei</i> R4	Souche MA220	<i>Haloferax</i> <i>gibbonsii</i> Ma2,39	<i>Halobacterium</i> souche GN101	Souche S8a
Milieu d'isolement	Saline, Tunisie	Grand lac salé Chaida, Chine	Saline, France	Saline, Espagne	Saline, Espagne	Saline, Espagne	Saline, Espagne	Saline, Espagne	Saline, Espagne	Saline, Mexique	Grand lac salé, Utah, USA

<sup>1</sup> L'halocine H7 est classée comme une halocine H6, mais produite par un mutant de *Haloferax gibbonsii* Ma 2.39 renommée *Haloferax gibbonsii* SPH7.

<sup>2</sup> Poids moléculaire de la protéine mature.

<sup>3</sup> Perez (2000) : H4 résiste au dessalage jusqu'à 150 mM de NaCl.

<sup>4</sup> Activité inhibitrice sur les haloarchaea.

# **Partie II**

## **Partie Pratique**

# **Matériel et Méthodes**

## I. Matériel

### I.1. Matériel biologique

- **Germes producteurs**

Les souches productrices utilisées dans notre étude sont des archées halophiles extrêmes isolées de différentes salines d'Algérie (**Tableau II**).

**Tableau II** : Les souches d'haloarchées utilisées

Souches	Source	Année d'isolement	Conditions d'isolement	Genre affilié (Gene ARNr 16S)
S1	Sabkha d'Ouargla	1999	37°C, pH7	<i>Haloarcula</i> sp
S2	Sabkha d'Ouargla	1999	43°C, pH7	<i>Halorubrum tebenquichens</i>
S3	Sabkha d'Ouargla	1999	43°C, pH7	<i>Haloarcula</i>
S4	Sabkha d'Ouargla	2010	40°C, pH7	<i>Halorubrum chaoviator</i>
S5	Sabkha d'Ouargla	2010	40°C, pH7	<i>Halorubrum ezzamoulens</i>
S6	Sabkha d'Ouargla	1999	40°C, pH7	<i>Haloarchée</i>
S7	Saline d'Ichekaben	2003	40°C, pH7	<i>Haloarchée</i>
S8	Sel d'Ichekaben	2009	40°C, pH7	<i>Natrinema</i>
S9	Saline de Batna	2010	40°C, pH7	-
S10	Saline de Batna	2010	40°C, pH7	-
S11	Saline d'Oran	2010	40°C, pH7	<i>Haloarcula</i> sp
S12	Saline d'Oran	2010	40°C, pH7	<i>Haloarcula</i> sp
S13	Saline d'Oran	2010	40°C, pH7	<i>Haloarcula</i> sp
S14	Saline d'Oran	2010	40°C, pH7	<i>Haloarcula</i> sp
S15	Saline de Batna	2010	40°C, pH7	-
S16	Saline de Batna	2010	40°C, pH7	-

- : non caractériser

- **Germe cible**

Les souches qui vont servir de cibles pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne sont : la souche de référence *Halobacterium salinarum* (DSMZ 3754) ainsi que les différentes souches halophiles (S1,..., S16).

## **I.2. Appareillages et réactifs**

Les appareils et les réactifs utilisés sont cités dans l'**Annexe I**.

## **I.3. Milieux de culture**

### ➤ **Milieux utilisés pour la croissance des souches halophiles**

Nous avons utilisé des milieux complexes : le milieu MA, le milieu Brown (Br), le milieu complexe (MC) et le milieu DSMZ 372.

### ➤ **Milieux utilisés pour les germes cibles**

Pour la mise en évidence de l'activité antimicrobienne vis-à-vis de la souche de référence, nous avons utilisé le milieu MH semi-solide. Et pour les autres souches halophiles testées, nous avons utilisé le milieu MC.

La composition des milieux de culture est mentionnée en **Annexe II**.

## **II. Méthodes**

### **II.1. Culture des souches halophiles**

#### **II.1.1. Préparation de la pré-culture**

Une colonie d'une culture fraîche est inoculée dans 2 ml de milieu liquide en tube, celui-ci est incubé à 40°C sous agitation de 200 rpm pendant 24 à 48 h. Après deux à trois repiquages dans les mêmes conditions, l'inoculum est prêt (Shand, 2006).

#### **II.1.2 .Culture**

1% de la pré-culture est inoculé dans des tubes à essai contenant 2 ml de milieu ou dans des Erlen de 250 ml contenant 50 ml de milieu. L'incubation est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment pendant 20 jours.

## II.2. Estimation de la croissance

La croissance des souches halophiles est estimée par la mesure de la densité optique (DO) des cultures diluées au 1/10<sup>ème</sup> dans une solution saline (SS) (**annexe II**). Les absorbances sont mesurées à 600 nm. Parfois, dans les tests utilisant plusieurs cultures, la croissance et la pigmentation sont estimées à l'œil nu (Extremophiles Handbook).

## II.3. Recherche d'un milieu optimal pour la croissance des souches halophiles

Différents milieux MA, MC, Br et DSMZ 372 sont utilisés. Après inoculation des tubes à essai puis incubation à 40°C pendant 15 jours avec une agitation (200 rpm), la croissance et la pigmentation des cultures sont estimées à l'œil nu.

## II.4. Caractérisation phénotypique

### ➤ Caractéristiques macroscopiques

La morphologie des colonies est observée sur un milieu solide, l'aspect, le contour, le diamètre et la pigmentation sont déterminés.

### ➤ Caractéristiques microscopiques

- **La coloration de Gram**

Après fixation des cellules avec de l'acide acétique à 2% pendant 5 min, la coloration de Gram est effectuée selon la technique classique. Une observation au microscope optique à grossissement 10X100 est réalisée.

## II.5. Caractérisation physiologique des souches

### *II.5.1. La croissance des souches à différentes températures*

800µL du milieu Br sont inoculés avec 10µl de la pré-culture et sont incubés à différentes températures (28°C, 30°C, 35°C et 40°C) sous agitation (200 rpm). La croissance et la pigmentation sont estimées à l'œil nu.

### *II.5.2. La croissance des souches à différentes valeurs de pH*

La croissance des souches est testée à différents pH (6, 7, 8, 9 et 10). 10µl de la pré-culture sontensemencés dans le milieu Br. Après incubation à 40°C sous agitation pendant 15 jours. La croissance est estimée par la mesure de la densité optique à 600nm et la pigmentation est notée à l'œil nu.

### ***II.5.3. La croissance des souches à différentes concentrations de NaCl***

20 µl de la préculture sont inoculés dans des tubes contenant 2 ml du milieu Br à différentes concentrations de NaCl (10%, 15%, 20%, 25% et 30%). L'incubation est réalisée à 40°C avec agitation de 200 rpm pendant 20 jours. La croissance est estimée par la mesure de la densité optique (600 nm) et la pigmentation est notée à l'œil nu (Extremophiles Handbook).

### ***II.5.4. La croissance des souches à différentes concentrations de MgSO<sub>4</sub>***

1ml du milieu Br à différentes concentrations du MgSO<sub>4</sub> (0%, 0.5%, 1%, 2% et 10%) est inoculé avec 10 µl de la pré-culture puis incubé à 40°C avec agitation de 200 rpm pendant 15 jours. La croissance et la pigmentation sont estimées à l'œil nu.

### ***II.5.5. Détermination de la concentration minimale en NaCl empêchant la lyse cellulaire***

Une culture bactérienne est répartie en 5 volumes égaux, après centrifugation à 5500 rpm/ 20 minutes, les culots sont repris dans un gradient de NaCl (15%; 10% ; 7.5%; 3.75% et 0%). Après 24h à température ambiante, les absorbances sont mesurées à 600nm.

## **II.6. Caractérisation biochimique des souches**

### ***II.6.1. Utilisation de quelques substrats carbonés par les souches d'haloarchées***

25 g/l des substrats carbonés (cellobiose, xylose, mannose et rhamnose) sont ajoutés à la base minérale dépourvue de toute source organique, additionnée de NH<sub>4</sub>Cl (20 g/l), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (5g/l) et de F<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,2g/l). Les tubes sont ensuite incubés à 40°C avec agitation pendant 16 jours. Les résultats se manifestent par l'apparition de trouble ainsi que la pigmentation.

### ***II.6.2. Croissance sur le milieu mannitol-mobilité***

La mobilité bactérienne et archéenne ainsi que la fermentation du mannitol sont étudiées en ensemençant le milieu semi-solide mannitol-mobilité par pique centrale à l'aide d'une anse de platine. La mobilité est révélée par un envahissement plus ou moins grand du milieu à partir de la pique d'inoculation. L'utilisation du mannitol se manifeste par un virage de couleur de rouge au jaune. Trois essais ont été réalisés.

### ***II.6.3. Production d'indole***

Nous avons utilisé le milieu eau peptonée exempte d'indole modifié par ajout de quantités appropriées de NaCl et de MgSO<sub>4</sub>. Les différentes souches sont inoculées et incubées à 40°C avec agitation à 200 rpm pendant 20 jours. La présence d'indole est révélée par l'ajout de quelques gouttes de réactif KOVACS. L'apparition d'un anneau rouge en surface indique un test positif.

### ***II.6.4- Sensibilité des souches d'haloarchées à quelques antibiotiques***

Les souches halophiles inoculées dans la gélose molle (MC) puis versées en double couche sur les boîtes contenant le même milieu solide, les disques d'antibiotiques Amikacine (30µg), Gentamicine (10µg), Ampicilline (10µg), Oxacilline (1µg), Cefotaxime (30µg), Rifampicine (5µg), Chloramphénicol (30µg), Tétracycline (10µg), Clindamycine (2µg), Vancomycine (30µg) et Erythromycin (15µg) sont ensuite déposés sur la gélose molle solidifiée. Les boîtes sont incubées à 40°C après diffusion de 2h à température ambiante. La sensibilité se manifeste par l'apparition d'une zone claire autour du disque.

## **II.7. Recherche de substances extracellulaires produites par les souches d'haloarchées**

### ***II.7.1. Production de substances antibiotiques***

#### ***II.7.1.1. La mise en évidence de l'activité antibiotique***

Il s'agit de mettre en évidence la capacité d'une souche à produire ou non des substances antimicrobiennes (halocines) contre les différentes souches halophiles et vis-à-vis de la souche de référence *H. salinarum* DSMZ 3754 et donc souligner l'activité antagoniste. Pour cela nous avons utilisé la méthode de diffusion en double couche d'agar. Une couche fine de milieu solide est coulée sur une boîte de Pétri. Après solidification, elle est additionnée d'une autre couche du même milieu semi-solide ensemencé par le germe cible à 1%. Après solidification, 5µl de surnageants ou d'extraits protéiques sont déposés à la surface des boîtes, après séchage des spots, les boîtes sont incubées à 40°C jusqu'au développement du germe cible. Un résultat positif se manifeste par l'apparition d'une zone claire autour du spot (Shand, 2006).

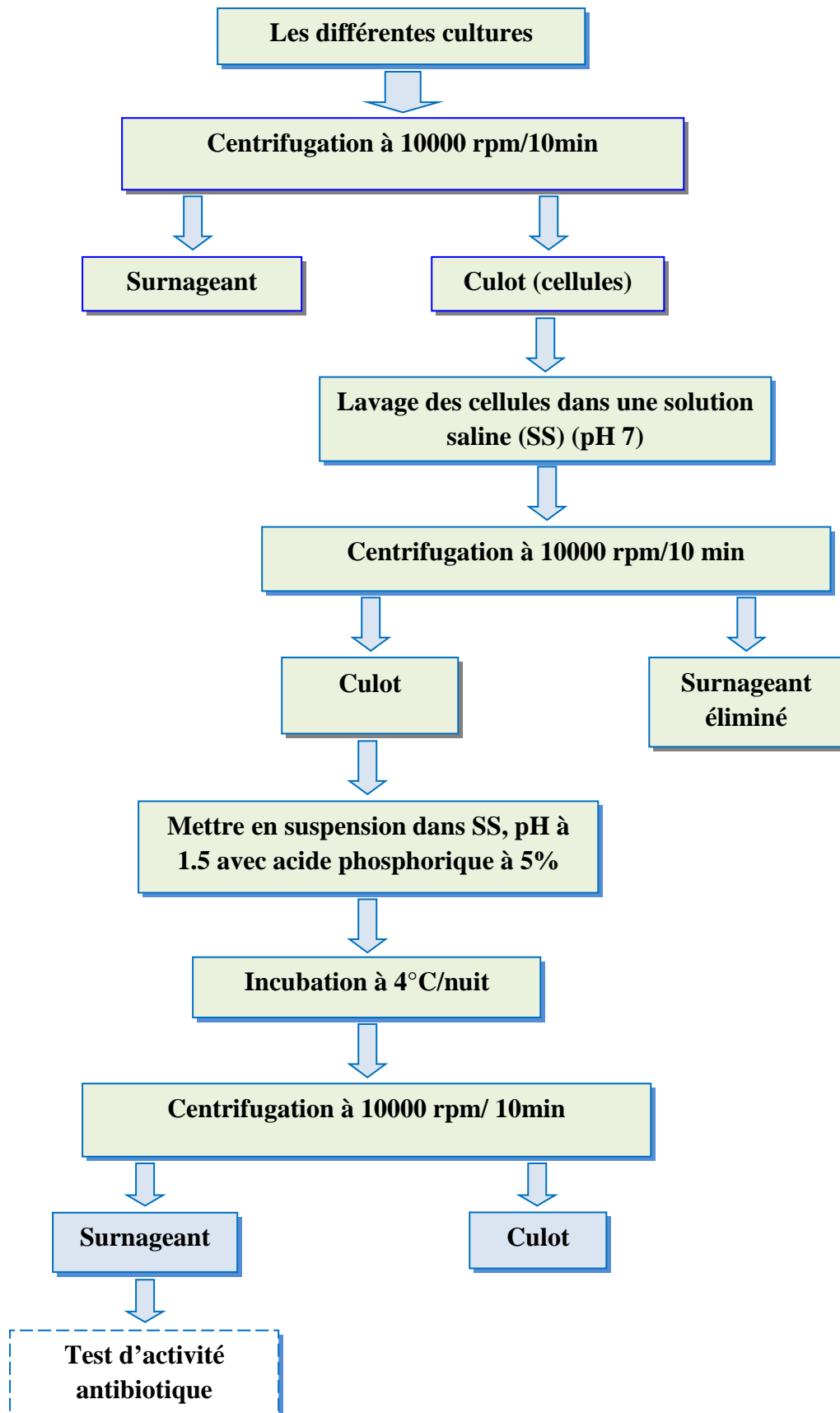


### ***II.7.1.2. Recherche de phage***

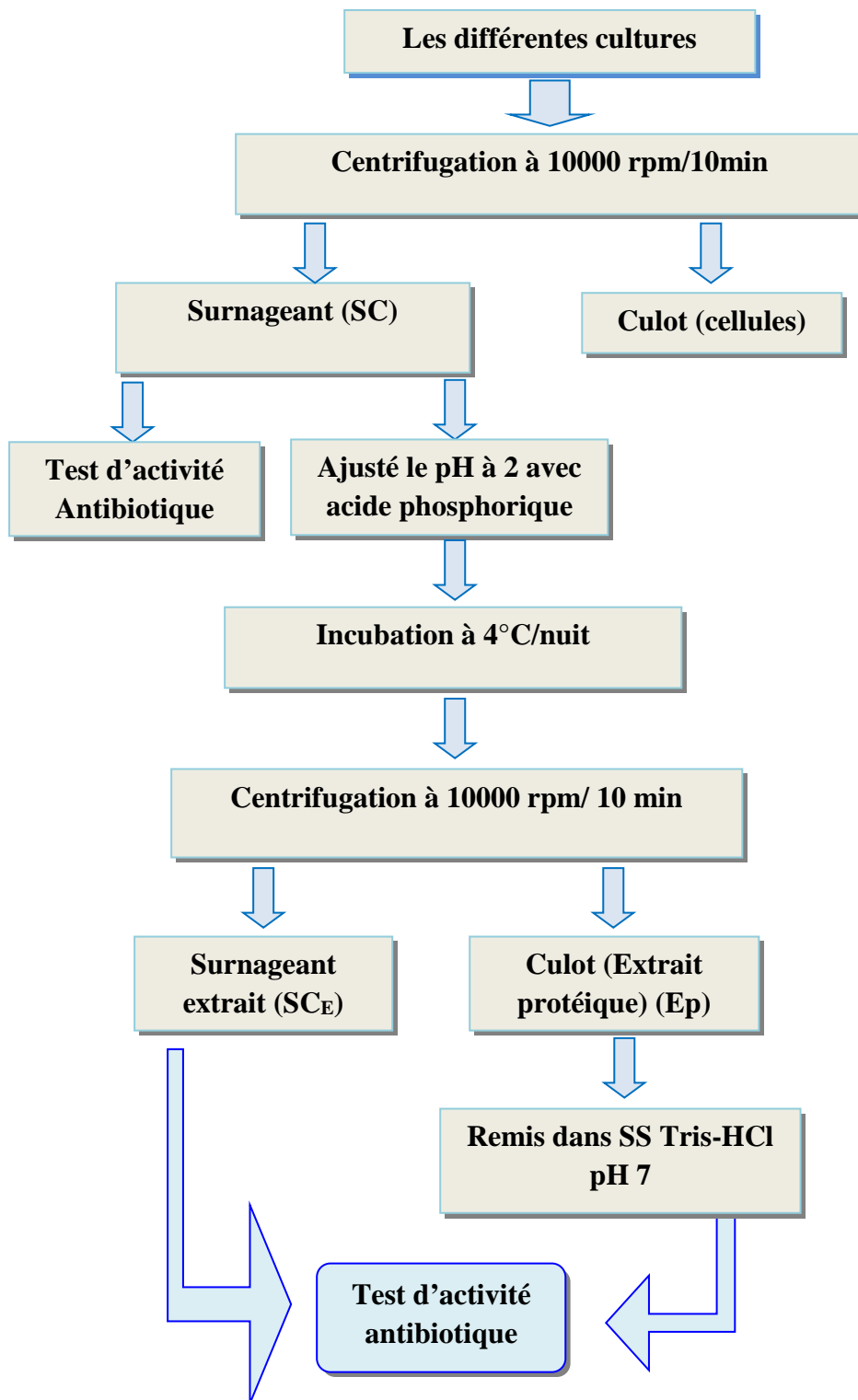
Le test de phages est réalisé suivant la méthode décrite par Torreblanca *et al*, (1994). Un cylindre d'agar est découpé dans la zone d'inhibition puis mélangé à une suspension fraîche de la souche de référence *H. salinarum DSMZ 3754*. Après incubation à 40°C pendant une nuit, 5µl de la suspension sont déposés sur le milieu MH et les boîtes sont incubées à 40°C. L'absence de phages se manifeste par une croissance uniforme de la souche de référence.

### ***II.7.1.3. Extraction des protéines totales***

Le surnageant de culture et le culot cellulaire sont soumis à une extraction acide et à froid avec l'acide phosphorique (5%) pour extraire les protéines totales (**figure 1 et 2**).



**Figure 1:** Protocole d'extraction des protéines membranaire (Yang *et al.*, 1992).



**Figure 2:** Protocole d'extraction acide et à froid des protéines totales du surnageant de culture (Yang *et al.*, 1992).

## ***II.7.2. Recherche de l'activité enzymatique***

### **II.7.2.1. Détermination de l'activité protéolytique**

#### **◆ Hydrolyse de lait écrémé**

L'activité protéolytique est déterminée en déposant en spots les surnageants de cultures sur le milieu Br additionné de lait écrémé 1% (p/v). Les boîtes sont ensuite incubées à 40°C. Des halos clairs autour des colonies sont considérés comme une activité protéolytique. Deux essais ont été réalisés avec deux surnageants de cultures de différents milieux.

#### **◆ Hydrolyse de la gélatine**

Les surnageants sont déposés par spots sur le milieu SG supplémenté de 2% (p/v) de gélatine. Les boîtes sont ensuite incubées à 40°C. L'hydrolyse est révélée par addition de 3ml du TCA. Une zone claire indique la production d'une gélatinase. Quatre essais ont été réalisés avec deux surnageants de cultures de différents milieux.

### **II.7.2.2. Détermination de l'activité amylolytique**

La présence de l'action d'amylase extracellulaire est déterminée en utilisant le milieu SG additionné de 1% (p/v) d'amidon soluble. Les surnageants sont déposés en spots. Après incubation à 40°C, les boîtes sont inondées avec une solution de Lugol. L'hydrolyse de l'amidon se manifeste par l'apparition d'une zone claire autour de colonies. Quatre essais ont été réalisés avec deux surnageants de cultures de différents milieux.

### **II.7.2.3. Détermination de l'activité lipolytique**

Le milieu SG additionné de 1% de Tween 20, Tween 80 et Tween 60 pour mettre en évidence la présence de l'activité lipolytique. L'ensemencement des souches est effectué par la méthode des spots et après incubation à 40°C, le développement d'un précipité autour des souches témoigne la présence d'une lipase. Quatre essais ont été réalisés avec deux surnageants de cultures de différents milieux.

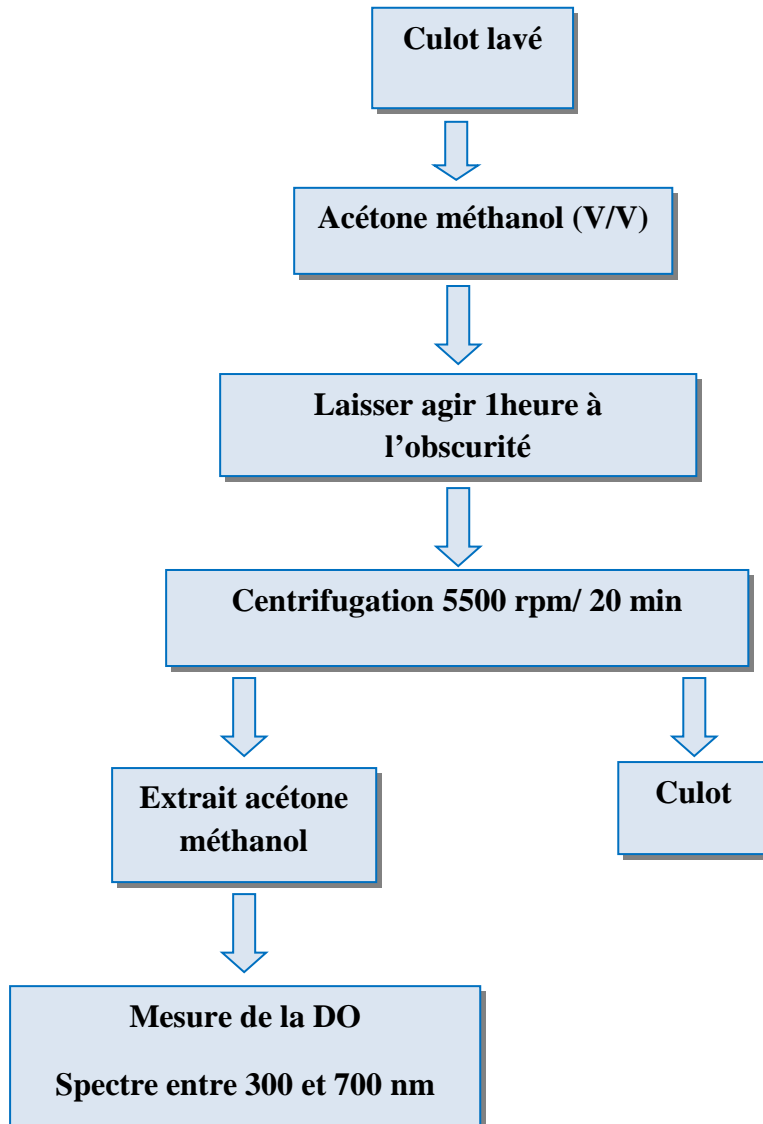
### **II.7.2.4. Détermination de l'activité cellulosique**

La présence d'une cellulase est examinée sur milieu SG contenant 1% (p/v) de Carboxy Méthyl Cellulose (CMC). Après incubation à 40°C, les boîtes sont pulvérisées avec

une solution de Lugol. Après 10 à 12 minutes, l'apparition de zones claires autour des spots signifie un résultat positif indiquant la présence de la cellulase. Deux essais ont été réalisés avec deux surnageants de cultures de différents milieux.

### II.8. Extraction des pigments membranaires

Les différents culots récupérés de cultures ont subi un traitement avec l'acétone / méthanol (v/v) puis incubés à l'obscurité pour extraire les pigments membranaires (**figure 3**).



**Figure 3:** Protocole d'extraction des pigments membranaires

(Oren et Rodriguez-Valera 2001).

# **Résultats et Discussion**

### III.1. Recherche d'un milieu optimal pour la croissance des souches halophiles

La croissance des souches à été réalisée sur différents milieux. Après incubation à 40°C, les résultats de la croissance sont estimés à l'œil nu (**Tableau III**).

**Tableau III** : La croissance des haloarchées sur différents milieux

Souches	MA		MC		DSM372		Br	
	C	P	C	P	C	P	C	P
<b>S1</b>	+++	++	+++	+++	+++	++	/	/
<b>S2</b>	+++	+++	+++	+++	+++	++	/	/
<b>S3</b>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	/	/
<b>S4</b>	-	-	+++	+++	+++	+++	/	/
<b>S5</b>	+++	+++	-	-	+++	++	++	+
<b>S6</b>	+++	++	+++	+++	+++	++	+	+
<b>S7</b>	+++	+++	-	-	+++	++	++	+
<b>S8</b>	+++	++	+++	+++	+++	++	++	+
<b>S9</b>	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	-
<b>S10</b>	+++	++	+++	+++	+++	++	+	+
<b>S11</b>	+++	+++	+	+	+++	++	+	-
<b>S12</b>	++	+	-	-	+++	++	+	-
<b>S13</b>	+++	++	++	+	+++	+++	++	+
<b>S14</b>	+++	++	++	++	+++	++	++	+
<b>S15</b>	+++	+	++	++	+++	+++	++	+
<b>S16</b>	+++	+++	++	+	+++	++	++	+

C : Croissance      P : Pigmentation

- : absence.    + : présence.    ++ : Bonne.    +++ : Meilleure, / : Non réalisé

Nous avons remarqué que toutes les souches se développent et pigmentent sur le milieu DSM372, Br, MA à l'exception de la souche S4. Le même résultat est obtenu avec le milieu MC à l'exception de S5, S7 et S12.

La pigmentation de la plupart des espèces des archées halophiles se manifeste par l'apparition de la couleur rouge rose due à la présence de pigments caroténoïdes dans leur membrane cellulaire (Oren, 2009).

### III.2. Caractérisation des souches d'*Haloarchaea*

L'aspect global des colonies, leur diamètre ainsi que la pigmentation varient en fonction des milieux de culture. L'observation macroscopique est effectuée sur un milieu solide (MA) ou (MC) après 20 jours d'incubation à 40°C (**Tableau IV**).

**Tableau IV** : Caractérisation macroscopique et microscopique des souches haloarchées

Les Souches	Milieu approprié	Gram	Couleur de la colonie	Forme de cellules	D (mm) de colonies	Aspect de colonies	Contour de colonies
S1	MC	-	Saumon	/	< 1	Rondes plates	Régulier
S2	MC	-	Saumon	pléomorphe	< 1	Rondes plates	Régulier
S3	MC	-	Rouge	/	0,5 - 1	Rondes bombées	Régulier
S4	MA	-	Rouge	/	1 - 1,5	Rondes bombées	Régulier
S5	MA	-	Saumon	pléomorphe	0,5 - 2	Rondes plates	Régulier
S6	MA	-	Rouge	pléomorphe	0,5 - 2	Rondes bombées	Régulier
S8	MA	-	Saumon	/	< 1	Rondes plates	Régulier
S9	MA	-	Saumon	pléomorphe	0,5 - 1	Rondes plates	Régulier
S10	MA	-	Rouge	pléomorphe	0,5 - 1	Rondes plates	Régulier
S15	MA	-	Rouge	pléomorphe	0,5 - 2	Rondes plates	Régulier

Nous remarquons que ces souches sont à Gram négatif et les cellules sont de forme pléomorphe. L'aspect des colonies est rond plat ou bombé avec un diamètre variant entre 0,5 et 2 mm et de couleur saumon ou rouge.



### III.3. Caractérisation physiologique des souches

#### III.3.1. La croissance des souches à différentes T°

La gamme de température explorée varie de 28°C à 40°C. Les 16 souches tolèrent des variations de température et la majorité des souches ont une croissance à partir de 30°C.

**Tableau V:** Croissance des souches d'haloarchées à différentes températures

T° (C)	28°C		30°C		35°C		40°C	
	T	P	T	P	T	P	T	P
<b>S1</b>	-	-	++	-	+++	++	+++	++
<b>S2</b>	-	-	+/-	-	++	+	++	+
<b>S3</b>	++	-	+++	++	+++	++	+++	++
<b>S4</b>	++	-	+++	+++	+++	++	+++	++
<b>S5</b>	++	-	++	-	++	+	++	+
<b>S6</b>	-	-	-	-	++	+	++	+
<b>S7</b>	++	-	++	++	+++	-	+++	++
<b>S8</b>	++	-	++	-	++	++	++	+
<b>S9</b>	++	-	++	+	+++	++	+++	++
<b>S10</b>	++	-	++	-	++	++	++	++
<b>S11</b>	++	-	+++	++	+++	+++	+++	+++
<b>S12</b>	-	-	-	-	+++	+	+++	++
<b>S13</b>	++	-	++	-	++	-	++	+
<b>S14</b>	++	-	++	-	+	-	+	-
<b>S15</b>	+	-	+	-	++	+	++	+
<b>S16</b>	++	-	+++	-	++	+	+++	++

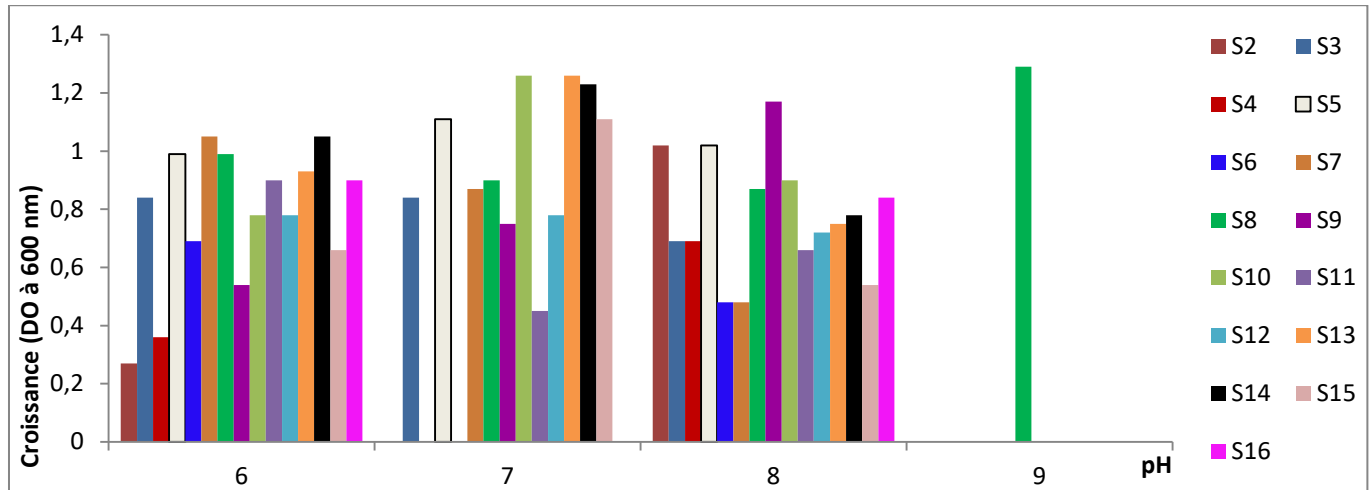
T : Trouble      P : Pigmentation

- : absence. +/- : faible    + : présence. ++ : Bonne. +++ : Meilleure

Nous remarquons que toutes les souches se développent à partir de la température 30°C et pigmentent à partir de 35°C sauf la S3, S4, S7, S9 et S11 qui peuvent pigmentées à 30°C. Par contre, nous constatons une meilleure croissance et une meilleure pigmentation à 40°C à l'exception de S14.

### III.3.2. Croissance des souches à différents pH

L'intervalle de pH testé pour la croissance de l'ensemble des souches se situe entre 6,0 et 9,0. (Figure 4).

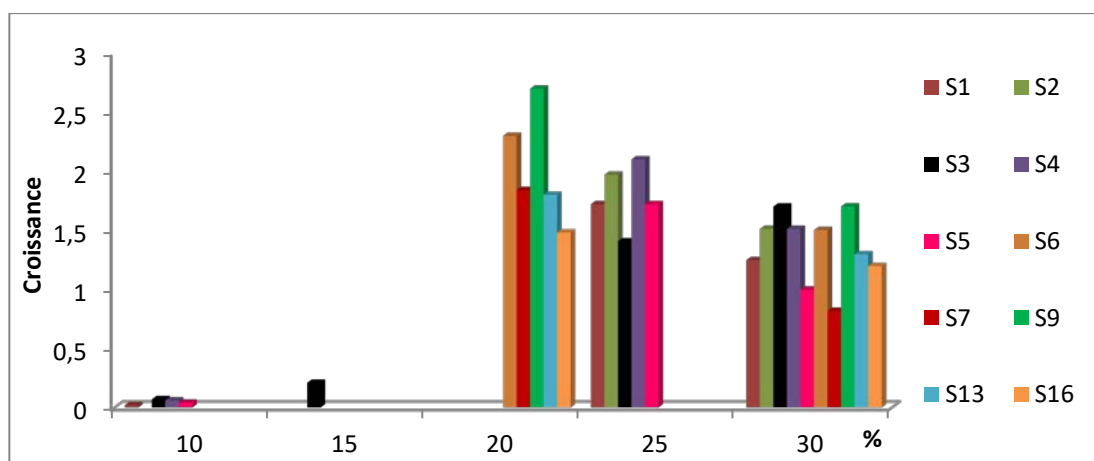


**Figure 4 :** La croissance des souches d'haloarchées en fonction du pH

Nous avons remarqué que toutes les souches se développent entre pH 6- 8 avec un optimum de pH7 pour S3, S5, S10, S13, S14 et S15. Un optimum de pH9 pour la souche S8 par contre S2, S4 et S9 présentent un optimum de pH8.

### III.3.3. La croissance des souches à différentes concentrations de NaCl

La croissance des souches d'haloarchées a été testée à des concentrations de NaCl allant de 10% à 30% sur le milieu Br. Nous constatons que toutes les souches se développent entre 20% et 25% de NaCl sauf la souche 3 qui exige une concentration de 30% (Figure 5).



**Figure 5 :** La croissance des souches d'haloarchées en fonction de la concentration de NaCl

L'optimum de croissance varie en fonction des souches, nous constatons que S6, S7, S9, S16 et S13 présentent un optimum à 20% de NaCl. Les souches S1, S2, S4 et S5 présentent une bonne croissance à 25% de NaCl par contre, S3 présente un optimum de croissance à 30% de NaCl.

### *III.3.4. La croissance des souches à différentes concentrations de MgSO4*

Nous avons remarqué que presque toutes les souches peuvent se développer en absence de MgSO4 à l'exception de S2, S3, S7, S10 et S11 qui exigent un minimum de 0,5% de MgSO4 (Tableau VI).

Le magnésium joue un rôle clé dans la physiologie des cellules d'haloarchées, il joue un rôle comme un cofacteur pour certaines réactions enzymatiques telles que l'hydrolyse de l'amidon (Enache, 2009).

**Tableau VI :** Croissance des souches à différentes concentrations de MgSO4

[MgSO4]	0%		0.5%		1%		2%		10%	
	T	P	T	P	T	P	T	P	T	P
S1	+	-	++	+	++	+	++	++	+	+
S2	-	-	+	+	++	++	++	++	+	+
S3	-	-	+	+	++	++	+	+	+	++
S4	+	-	++	+	++	++	+	+/-	+	++
S5	+	-	+	+	++	++	++	++	+	+/-
S6	+	-	++	+	++	+	++	++	+	++
S7	-	-	+	+	++	++	+	+	+	+
S8	+	+/-	++	-	++	+	+	-	+/-	-
S9	+	-	+	-	++	++	+	-	+	++
S10	-	-	+	+	++	+	++	+	+/-	+/-
S11	-	-	+	+	++	+	++	+	+	+
S12	+	-	+	-	+	+/-	+	+	+/-	+/-
S13	+	-	++	-	++	++	++	+	+	+
S14	+	-	+	+	++	+	++	+	+	++
S15	+	+/-	++	-	++	+	+	-	++	++
S16	+	-	++	++	++	++	++	++	++	++

[MgSO4] : la concentration de MgSO4

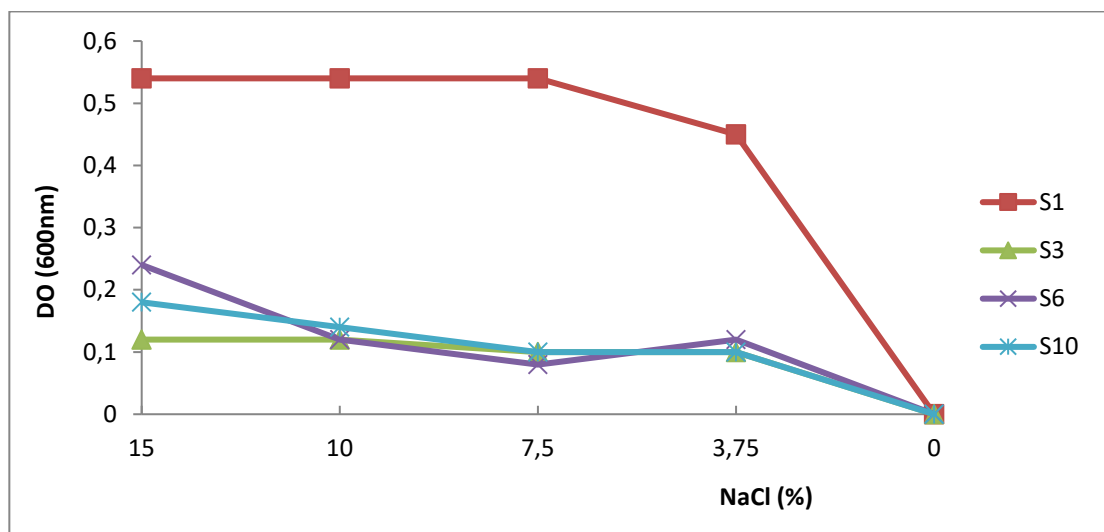
T : Trouble

P : Pigmentation

- : absence. +/- : faible présence. + : présence. ++ : Bonne.

### III.3.5. Détermination de la concentration minimale en NaCl empêchant la lyse cellulaire

Les différents culots ont été mis dans un gradient de NaCl (15% ; 10% ; 7,5% ; 3,75% ; 0%) après 24 heures à température ambiante, les absorbances sont mesurées à 600nm (**Figure 6**).



**Figure 6** : Effet de la salinité sur la stabilité des souches d'haloarchées

Nous avons remarqué que la S1 exige un minimum de 7,5% de NaCl et en dessous de cette concentration, il y a une lyse. Les souches S3, S6 et S10 exigent un minimum de 3,75% de NaCl.

Les haloarchées exigent des concentrations élevées de NaCl pour leurs croissances, elles peuvent maintenir leurs stabilités et leurs fonctionnements à des concentrations saturantes. Dans les solutions de faible salinité, les cellules sont irréversiblement endommagées et elles se lysent (Dworkin, 2006).

### III.4. Caractérisation biochimique des souches

#### III.4.1. Utilisation de quelques substrats carbonés par les souches d'haloarchées

Certains carbohydrates ont été testés sur la croissance des souches d'haloarchées. Après 16 jours d'incubation à 40°C, nous avons obtenu les résultats suivants (**Tableau VII**).

**Tableau VII** : Résultats de la croissance sur certains carbohydrates

Sucres	Rhamnose		Cellobiose		Xylose		Mannose	
	C	P	C	P	C	P	C	P
<b>S1</b>	++	+	-	-	-	Jaune	-	-
<b>S2</b>	++	+	-	-	-	Jaune	++	+
<b>S3</b>	++	+	-	-	-	Jaune	+	+/-
<b>S4</b>	+	-	-	-	-	Jaune	+	-
<b>S5</b>	++	+	-	-	-	Jaune	+++	+
<b>S6</b>	++	+	-	-	-	Jaune	-	-
<b>S7</b>	++	+	-	-	-	Jaune	-	-
<b>S8</b>	++	-	+++	++	-	Jaune	+	-
<b>S9</b>	++	+	-	-	-	Jaune	+	-
<b>S10</b>	++	+	-	-	-	Jaune	-	-
<b>S11</b>	+	+	-	-	-	Jaune	-	-
<b>S12</b>	+	+	-	-	-	Jaune	-	-
<b>S13</b>	+	+	-	-	-	Jaune	-	-
<b>S14</b>	+	+	-	-	-	Jaune	-	-
<b>S15</b>	++	+	-	-	-	Jaune	++	+
<b>S16</b>	++	+	-	-	-	Jaune	-	-

C : Croissance P : Pigmentation

- : absence. +/- : faible présence. + : présence. ++ : Bonne. +++ : Meilleure

Nous avons remarqué que toutes les souches dégradent le rhamnose. Sept souches seulement (S2, S3, S4, S5, S8, S9 et S15) dégradent le mannose et la S8 présente une bonne dégradation du cellobiose. Par contre, aucune souche ne se développe en présence de xylose mais un virage au jaune est apparu.

### **III.4.2. Croissance sur le milieu mannitol-mobilité**

Les résultats montrent que toutes les souches sont mobiles et fermentent le mannitol (Tableau VIII ; figure 7).

**Tableau VIII :** Détermination de la dégradation du mannitol et la mobilité des souches d'haloarchées

Les souches	Tube 1		Tube 2		Tube 3	
	Mobilité	Mannitol	Mobilité	Mannitol	Mobilité	Mannitol
<b>S1</b>	+	++	+	++	+	++
<b>S2</b>	+	++	+	+	+	+
<b>S3</b>	+	++	+	++	+	+
<b>S4</b>	+	+	+	+	+	+
<b>S5</b>	-	-	+	+	+	+
<b>S6</b>	+	++	+	++	+	+
<b>S7</b>	+	++	+	++	+	+
<b>S8</b>	+	++	+	+	+	+
<b>S9</b>	-	-	+	+	+	+
<b>S10</b>	+	+	+	++	+	+
<b>S11</b>	+	+	+	+	+	+
<b>S12</b>	+	+	+	+	+	+
<b>S13</b>	+	++	+	-	+	+
<b>S14</b>	+	+	+	+	+	+
<b>S15</b>	+	+	+	+	+	+/-
<b>S16</b>	+	++	+	+	+	+

- : absence de dégradation ou de mobilité. +/- : faible. + : présence de dégradation ou mobilité ++ : Bonne dégradation du mannitol

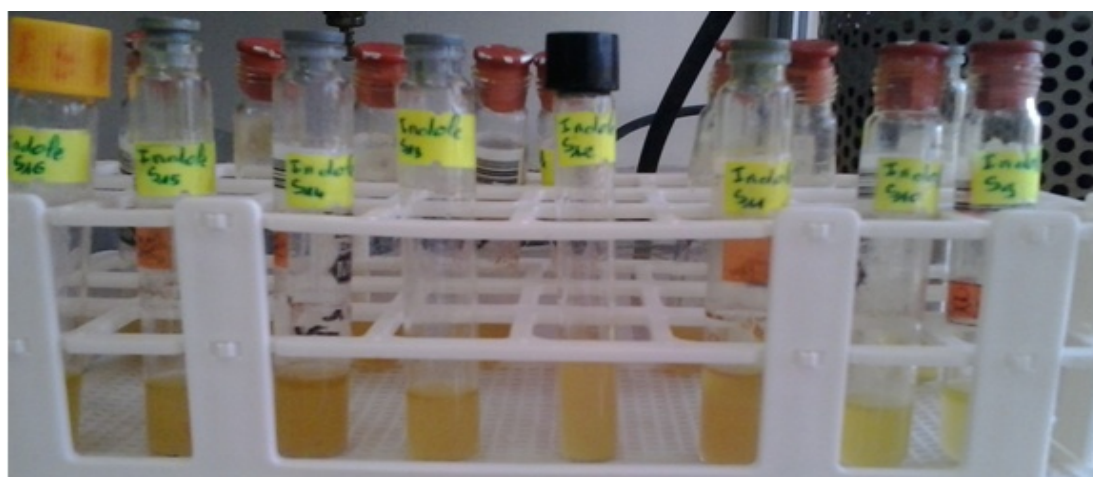
### III.4.3. Production d'indole

Nous avons remarqué qu'il y a croissance pour toutes les souches mais sont toutes d'indole négatif, les souches ne dégradent donc pas le tryptophane (**Tableau IX; Figure 8**).

**Tableau IX** : Détermination de la production d'indole par les souches d'haloarchées

les souches	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16
<b>C</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>I</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

C : Croissance. I : Indole



**Figure 7** : Croissance de quelques souches d'haloarchées sur le milieu exempt d'indole

### III.4.4- Sensibilité des souches d'haloarchées à quelques antibiotiques

Toutes les souches présentent une sensibilité au Chloramphénicol à l'exception de S10, S11 et S12. De même, la plupart résistent au Cefotaxime sauf la S8, S9, S10, S11 et S12. La souche 8 présente une sensibilité envers l'Ampicilline et la S1 envers Erythromycine. Toutes les souches sont résistantes aux autres antibiotiques (**Tableau X**).

**Tableau X** : Sensibilité des souches d'haloarchées aux antibiotiques

ATB	Zones d'inhibition (mm)															
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16
Vanc	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Eryt	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gent	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Chlo	14	13	14	17	17	15	12	15	12	0	0	0	9	15	12	12
Tetr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Amy	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Oxa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cefo	15	13	14	16	12	15	16	0	0	0	0	0	14	14	13	9
Amp	0	0	0	0	0	0	0	0	40	0	0	0	0	0	0	0
Clin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rifa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

0 : absence de zone d'inhibition

### III.5. Recherche de substances extracellulaires produites par les souches d'haloarchées

#### III.5.1. Production de substances bioactives

##### III.5.1.1. Spectre d'activité antibiotique

Différents surnageants ont été testés pour l'activité antibiotique sur différentes souches d'haloarchées et sur *H. salinarum* DSMZ 3754 (Tableau XI et Tableau XII). Les résultats montrent que la plupart des souches ont une activité sur la S8 et S15.



Tableau XI : Antagonisme entre les souches halophiles

	Germe producteur																
	GC	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16
Germe cible (mm)	S9	-	-	-	-	-	-	-	15	-	-	-	-	-	-	36	-
	S10	-	-	-	-	-	-	-	22	-	-	-	-	-	-	32	-
	S11	-	-	-	-	-	-	-	20	-	-	-	-	-	-	34	-
	S12	-	-	-	-	-	-	-	34	-	-	-	-	-	-	27	-
	S13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	28	-
	S14	-	-	-	-	-	-	-	34	-	-	-	-	-	-	35	-

GC : Germe cible

GP : Germe producteur

Diamètre : mm

- : Absence

Tableau XII : Action des surnageants de culture sur *H. salinarum* DSMZ 3754

Germe producteur	<i>H. salinarum</i> DSMZ 3754
S1	-
S2	-
S3	-
S4	-
S5	-
S6	-
S7	-
S8	30 mm
S9	-
S10	-
S11	-
S12	-
S13	-
S14	-
S15	25 mm
S16	30 mm

Nous remarquons que les souches S8, S15 et S16 donnent des zones d'inhibition importantes sur la *DSMZ3754*.

### **III.5.1.2. Recherche de phage**

La recherche de phages a permis d'observer une croissance du germe cible *H. salinarum DSMZ 3754* sur le milieu MH solide et aucune plage de lyse n'a été obtenue ce qui élimine la possibilité que les zones d'inhibition soient dues à un phage.

### **III.5.1.3. Extraction des protéines totales**

#### **➤ Extraction à partir de surnageants de cultures**

Après extraction de surnageants des souches (S1, S3, S6 et S10) avec de l'acide phosphorique à 5%, aucune de ces souches présentent une activité sur la souche *H. salinarum DSMZ 3754*.

#### **➤ Extraction à partir des cellules**

Les différentes cellules ont été soumises à une extraction acide et à froid afin d'extraire les protéines qui se trouvent à la surface cellulaire. Les résultats montrent que tous les extraits protéiques des cellules testés ont une activité antibiotique de diamètres variés (**Tableau XIII**).

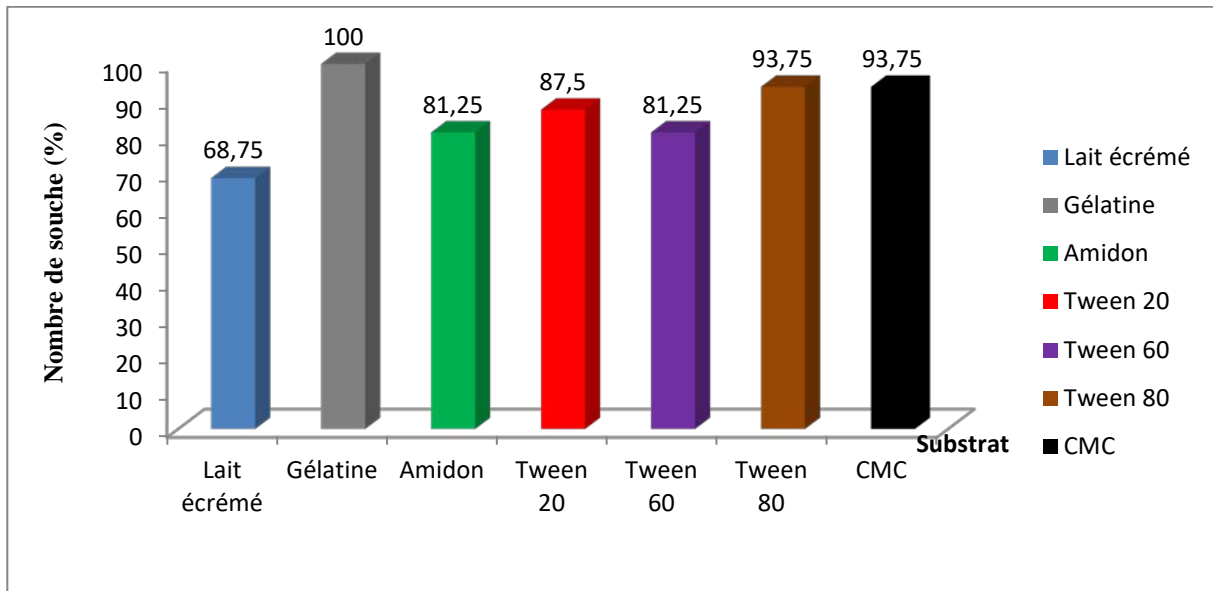
**Tableau XIII :** Activité antibiotique des extraits protéiques de la surface cellulaire de souches d'haloarchées

<b>Extraits Protéiques de la surface cellulaire</b>	<b>Activité sur <i>H. salinarum</i> DSMZ3754 (ZI : mm)</b>
<b>S1</b>	6
<b>S2</b>	5
<b>S3</b>	4
<b>S7</b>	6
<b>S15</b>	5
<b>S33 (2011)</b>	6
<b>SM5 (2011)</b>	8
<b>S15</b>	6.5

Comme les bactériocines de bactéries lactiques (Todorov *et al.*, 2015), les substances antibiotiques produites par les souches haloarchées s'adsorbent à la surface cellulaire.

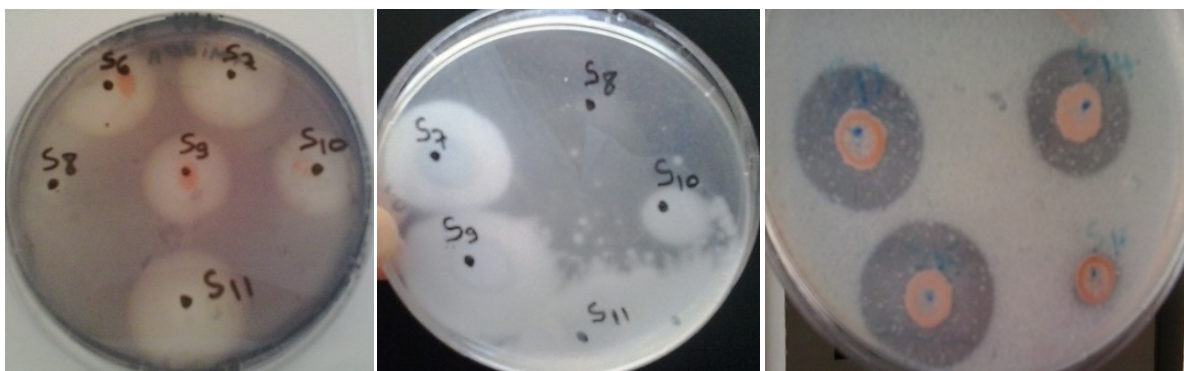
### III.5.2. Recherche de l'activité enzymatique

La caractérisation des enzymes produites par des souches d'haloarchées est réalisée sur le milieu SG et Br. L'activité enzymatique vis-à-vis des substrats est illustrée dans l'histogramme ci-dessus.

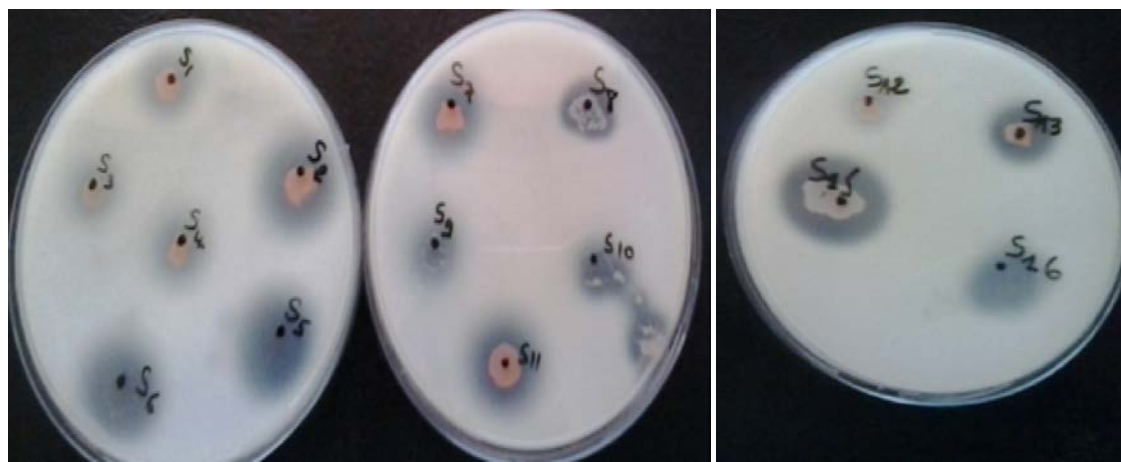


**Figure 8 :** Enzymes hydrolytiques produites par différentes souches d'haloarchées

Nous avons observé que toutes les souches présentent une activité protéolytique avec une bonne dégradation pour la gélatine. L'activité amylolytique est observée chez toutes les souches sauf la S15 et S16 qui n'hydrolysent pas l'amidon. L'hydrolyse de Tween 20, Tween 60 et Tween 80 est observée chez toutes les souches. L'activité cellulosique est observée chez toutes les souches à l'exception de S8.



**Figure 9 :** Activité enzymatique des souches d'haloarchées sur un milieu additionné d'amidon, de Tween 20 et de lait écrémé respectivement



**Figure 10 :** Hydrolyse de la gélatine par 16 souches d'haloarchées

### III.6. Extraction des pigments membranaires

Après traitement avec de l'acétone méthanol des différents culots, les absorbances des extraits acétone méthanol sont données dans le **Tableau XIV**.

**Tableau XIV :** Absorbance de différents extraits acétone méthanol sur milieu MA à 300-700 nm

Souche	Pick	Absorbance
S1	487.0	0,12
S2	537.0	0,07
S3	537.0	0,06
S4	599.0	0,05
	490.0	0,12
S5	598.0	0,04
	489.0	0,09
S6	604.0	0,04
	439.0	0,12
S7	523.0	0,12
	490.0	0,15
S8	487.0	0,08
S9	489.0	0,08
S10	537.0	0,09
	462.0	0,13
S11	604.0	0,03

S12	598.0	0,05
S13	598.0	0,11
S14	598.0	0,07
S15	537.0	0,07
S16	537.0	0,05

Les pigments membranaires d'haloarchées ont des pics de 378, 466, 488 et 525 qui correspondent à la bactérioruberine.

La plupart des espèces d'archées halophiles (famille Halobacteriaceae) sont colorées en rouge rose due au contenu élevé de pigments de caroténoïde dans leur membrane cellulaire. Quelques espèces telles que *Natrialba asiatica* ne montrent pas de couleur rose. L'intensité de la pigmentation dépend de la salinité dans laquelle les cellules sont développées, *Haloferax mediterranei* est faiblement pigmentée à haute salinité, mais une production élevée de pigment est atteinte à des concentrations de sel optimales pour la croissance (Oren, 2009).

# Conclusion

## Conclusion et Perspectives

---

L'analyse effectuée dans cette étude montre les multiples potentialités des microorganismes halophiles, en tant que un large éventail (spectre) des activités enzymatiques et des métabolites d'application biotechnologique. Tous les halophiles testés pouvaient produire plusieurs, de ce fait renforçant l'idée d'examiner les environnements extrêmes comme source de nouvelles molécules potentiellement utiles et originales applicables dans la biotechnologie et l'industrie.

Notre objectif été de caractériser quelques souches halophiles extrêmes et de montrer leur potentiel biotechnologique en mettant en évidence les produits élaborés. Ainsi la plupart des souches sont productrices d'enzymes hydrolytiques telles que les amylases, cellulases, protéases, gélatinases, lipases et les estérases. Ces souches sont également douées d'activités antibiotiques et sont productrices de pigments caroténoïdes qui sont des colorants naturels pouvant remplacer les colorants de synthèse.

- ◆ L'étude physiologique (T°, pH, NaCl et MgSO<sub>4</sub>) des différentes souches montre que la plupart se développent à partir de 30°C pour la température, un minimum de 0% pour le MgSO<sub>4</sub> et toutes les souches présentent une croissance à partir de 20% de NaCl. Nous avons noté surtout la présence de souches neutrophiles.
- ◆ Toutes les souches sont mobiles et fermentent le mannitol.
- ◆ Aucune souche ne dégrade l'indole.
- ◆ Toutes les souches sont caractérisées par une forte activité enzymatique amylolytique, protéolytique, gélatinolytique, activité lipolytique et même cellulosique.
- ◆ Toutes les souches présentent une résistance remarquable aux antibiotiques à l'exception du chloramphénicol et cefotaxime.
- ◆ Différentes souches sont actives contre la souche *H. salinarum* DSMZ 3574 avec des zones d'inhibitions remarquable donc sont potentiellement productrices d'halocines.
- ◆ La plupart des souches produit des pigments caroténoïdes.

En perspective, vue que le potentiel que possède certaines souches pour la production d'enzymes ou d'halocines, nous proposons d'abord d'optimiser les conditions de croissance et de production en étudiant certains facteurs clés (T°, pH, NaCl...), pour qu'ensuite extraire et purifier ces substances d'intérêt.

# **Références**

# **Bibliographiques**



## Références Bibliographiques

---

### A

- ♦ **Albarracin VH, Pathak GP, Douki T, Cadet J, Borsarelli CD, Gartner W, Farais ME, (2012).** Extremophilic *Acinetobacter* strains from high-altitude lakes in Argentinean Puna: remarkable UV-B resistance and efficient DNA damage repair. *Orig Life Evol Biosph* 42: 201-221.
- ♦ **Alber S., Vossenberg J., Driessen A and Konings W, (2001).** Bioenergetics and solute uptake under extreme conditions, *Extremophiles*, 5: 285-294.
- ♦ **Ana C., Ncebakazi G., Gillian C., Baker William D., Grant., Shaun H., Brian J., Ma Y., Ventosa A., Blamey J., Don A., Cowan. (2008).** Nanoarchaeal 16S rRNA gene sequences are widely dispersed in hyperthermophilic and mesophilic environment. *Extremophiles* 12 : 651-656.

### B

- ♦ **Baati H, Guermazi S, Gharsallah N, Sghir A, Ammar E. (2010).** Microbial community of salt crystals processed from Mediterranean seawater based on 16S rRNA analysis. *Can J Microbiol* vol 56, pp 44-51.
- ♦ **Belfiore C, Ordonez OF, Farias ME. (2013).** Proteomic approach of adaptive response to arsenic stress in *Exiguobacterium sp. S17*, an extremophile strain isolated from a high-altitude Andean Lake stromatolite. *Extremophiles* 17: 421-431.

### D

- ♦ **Das Sarma S. (2001).** Halophiles. *Encyclopedia of Life Sciences*: 1-9.
- ♦ **Das Sarma S. and Arora P. (2002).** Halophiles, *encyclopedia of life sciences*. London. 8: 458-466.

## Références Bibliographiques

---

- ♦ **Davis J.S., Giordano M. (1996).** Biological and physical events involved in the origin, effects, and control of organic matter in solar saltworks. *Int J Salt Lake Res* 4: 335–347.
- ♦ **Delgado-Garcia M, Valdivia-Urdiales B, Aguilar-Gonzalez C, Contreras-Esquivel J, Rodriguez-Herrera R. (2012).** Halophilic hydrolases as a new tool for the biotechnological industries. *J Sci Food Agric*.
- ♦ **De la Haba R.R., Sánchez-Porro C., Marquez M. C., Ventosa A. (2011).** Taxonomy of halophiles, In: Horikoshi K. (ed.), *Extremophiles Handbook*, Springer. P. 1248.

### *E*

- ♦ **Enache, M., Popescu, G., Dumitru, L. et Kamekura M. (2009).** The effect of Na<sup>+</sup>/Mg<sup>2+</sup> ratio on the amylase activity of Haloarchaea isolated from tichirghiol lake, Romania, a low sal environment. *Biology*.
- ♦ **Escoms B, Meseguer I, Torreblanca M, Valiente F, Carballo I. (1996).** Applications of halocine H7. Organization mundial de la propiedad intelectual oficina internacional. solicitud internacionalen virtud del tratado de cooperation en materiade patentes (PCT).
- ♦ **Etivier A.M, Boyaval P, Duffes F, Dousset X, Compoin J.P, Marion D. (2001).** Triton X-114 phase partitioning for the isolation of a pediocin-like bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. *Letters in Applied Microbiology* 30: 42-46.

### *H*

- ♦ **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, 287-291.

## Références Bibliographiques

---

### *K*

- ◆ **Kis-Papo T, Oren A., Wasser S.P., Nevo E. (2003).** Survival of filamentous fungi in hypersaline Dead Sea water. *Microb Ecol* 45:183-190.
- ◆ **Kis-Papo T et Oren A. (2000).** Halocins : are they involved in the competition between halobacteria insaltern ponds. *Extremophiles*. 4 : 35-41.
- ◆ **Klaenhammer T.R. (1988).** Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70 : 337-349.

### *L*

- ◆ **Litchfield CD. (2011).** Potential for industrial products from halophilic Archaea. *J Int Microbiol Biotechnol* 38: 1635-1647.

### *M*

- ◆ **Madern D, Ebel C, Zaccai G. (2000).** Halophilic adaptations of enzyme. *Extremophile* 4: 92-98.
- ◆ **Margesin R and Schinner F. (2001).** Potential of halotolerant and Halophilic micro-organisms for biotechnology.
- ◆ **Martin L. (2000).** Purification et caractérisation d'une bactériocines produite par *Lactococcus lactis* sp. *Lactis* MJS15. Université Laval Canada, pp 4-14.
- ◆ **Moreno M.L, Pérez D, Garcia M.T, Mellado E. (2013).** Halophilic bacteria as a source of novel hydrolytic enzymes. *Life* 3: 38-51.
- ◆ **Marhuenda-Egea F.C, Bonete M.J. (2000).** Extreme halophilic enzymes in organic solvents. *Curr Opin Biotechnol* 13: 385-389.

## Références Bibliographiques

---

- ♦ **Meseguer I and Rodriguez –Valera F. (1985).** Production and purification of halocin H4. FEMS. Microbiol. Lett., vol. 28, pp. 177-182.
- ♦ **Meseguer I, Rodriguez –Valera F and Ventosa A. (1986).** Antagonistic interactions among Halobacteria due to halocin production. FEMS. Microbiol. Lett., vol. 36, pp. 177-182.
- ♦ **Meseguer I, Torreblanca M et Konishi T. (1995).** Specific inhibition of the halobacterial Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter by halocin H6. J Biol. Chem. 270 : 6450-6455.

### O

- ♦ **Oren A. (2002a).** Diversity of halophilic microorganisms : environments, phylogeny, physiology, and applications. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 28: 56-63.
- ♦ **Oren A. (2002b).** Halophilic microorganisms and their environments. In: Seckbach J (ed) Cellular Origin and Life in Extreme Habitats. Kluwer Academic, Dordrecht. P. 595.
- ♦ **Oren A. (2006).** The order Halobacteriales. In The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria Volume 3. 3rd edition. Edited by : Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E. New York: Springer. 113-164.
- ♦ **Oren A. (2006).** Life in high salt concentrations. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (eds) The Prokaryotes: a handbook of the biology of bacteria. Springer, New York, 3rd edn, vol.2, pp 263-282).
- ♦ **Oren A. (2008).** Correct names of taxa within the family *Halobacteriaceae*. Meeting of the ICSO Subcommittes on the taxonomy of Halobacteriaceae and Halomonadaceae, Colchester, UK.

## Références Bibliographiques

---

- ◆ **Oren A. (2009).** Microbial diversity and microbial abundance insalt-saturated brines : Why are the waters of hypersaline lakes red ? DigitalCommons@USU, 2009.
- ◆ **Oren A. (2010).** Industrial and environmental applications of halophilic micro-organisms. Environ. Technol. 31: 825-834.
- ◆ **O'Connor EM et Shand RF. (2002).** Halocins and sulfolobocins: The emerging story of archaeal protein and peptide antibiotics. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 28: 23-31.

### P

- ◆ **Patou M. (2004).** Mise en évidence de transfert de gènes au sein des archaebactéries. Maitrise de biologie des populations et des écosystèmes, option systématique, biodiversité et évolution. Université Pierre et Marie Curie, Paris VI.
- ◆ **Platas G, Meseguer I and Amils R. (2002).** Purification and biological characterization of halocin H1 from *Haloferax mediterranei* M2a, Int. Microbiol., Vol. 5 PP.15-19.
- ◆ **Platas G, Meseguer I and Amils R. (1996).** Optimisation of the production of a bacteriocin from *Haloferax mediterranei* Xia 3, Microbiologia SEM. Vol. 12, pp. 75-84.
- ◆ **Price L.B and Shand R.F.** Halocin S8: a 36-amino-acid microhalocin from the Haloarchaeal strain S8, J. Bacteriol., Vol. 182 (2000), pp.1958-4951.

### R

- ◆ **Rdest U and Sturm M. (1987).** Bacteriocins from Halobacteria, In: Protein purification: micro to macro, R. Burgess (ed.), Alan R. Liss, Inc., New York, N.Y., pp. 271-278.
- ◆ **Richard S.B, Madern D, Garcia E and Zaccai G. (2000).** Halophilic adaptation: novel solvent protein interactions observed in the 2.9 and 2.6 Å resolution structures of the wild

## Références Bibliographiques

---

type and a mutant of malate dehydrogenase from *Haloracula marismortui*. *Biochem.* 39: 992-1000.

- ♦ **Rodriguez-Valera F, Juez G and Kushner D.J. (1982).** Halocins: salt-dependant bacteriocin produced by extremely halophilic rods. *Can.J. Microbiol.*, vol. 28, pp. 151-154.

### S

- ♦ **Savijoki K, Ingmer H and Varmanen P. (2006).** Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **71**: 394-406.
- ♦ **Sergiu Fendrihan, Andrea Legat, Marion Pfaffenuemer, Claudia Gruber, Gerhard Weidler, Friedrich Gerbl, Helga Stan-Lotter. (2006).** Extremely halophilic archaea and issue of long-term microbial survival. © Springer Science+Business Media B.V. Correspondence to: Helga Stan-Lotter. Pp 125-140.
- ♦ **Shand RF. (2006).** Detection, quantification and purification of halocins : peptide antibiotics from haloarchaeal extremophiles. *Methods in Microbiology.* 35.
- ♦ **Shand R.F, Price L.B and O'Connor E.M. (1999).** Halocins: protein antibiotics from hypersaline environments. In: Oren A (ed.) *Microbiology and biogeochemistry of hypersaline environments*, CRS Press, Boca Raton, pp.295-306.
- ♦ **Shand RF et Leyva K. (2007).** Peptide and protein antibiotics from the domain Archaea : Halocins and Sulfolobocins. *Bacteriocins : Ecology and Evolution*, 93-109.

### T

- ♦ **TodorovS. D,Holzapfel w, Nero 1L. A.( 2015).** Characterisation of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*ST8SH and some aspect of its mode of action *Ann Microbiol* 12: 11-18.

## Références Bibliographiques

---

- ◆ **Torreblanca M, Meseguer I and Rogriguez -Valera F. (1989).** Halocin H6, a bacteriocin from *Haloferax gibbonsii*. J. Gen. Microbiol., vol. 135, pp. 2655-2661.
- ◆ **Torreblanca M, Meseguer I and Rogriguez -Valera F. (1990).** Effets of halocin H6 on the morphology of sensitive cells. Biochem. Cell., vol. 68, pp. 396-399.
- ◆ **Torreblanca M, Meseguer I and Ventosa A. (1994).** Production of halocin is a partially universal feature of archaeal halophilic rods. Lett Appl Microbiol, 19: 201-205.

### W

- ◆ **Weber A. P. M., Oesterhelt C., Gross W., Brautigam A., Imboden L. A., Krassovskaya I. (2004).** EST-analysis of the thermo-acidophilic red microalga *Galdieria sulphuraria* reveals potential for lipid A biosynthesis and unveils the pathway of carbon export from rhodoplasts. 55: 17-32.
- ◆ **Woese C. R., Magrum L. J. and Fox G. E. (1978).** Archaeabacteria. Journal of Molecular Evolution, 11: 245-251.

### Y

- ◆ **Yachai M. (2009).** Carotenoid production by halophilic Archaea and its applications. Thesis of Doctorat, university Prince of Songkla. P. 173.

# **Annexes**



## Appareillage

- ◆ Autoclave ALFA-10-plus (**PBI**International)
- ◆ Balance de précision
- ◆ Bain marie
- ◆ Bain marie HS-B20 digital, IKA labortechnik, Allemagne
- ◆ Centrifugeuse : SIGMA 1-14
- ◆ Etuve vnticell MMM
- ◆ Four pasteur RADE RAYPA
- ◆ Microscope optique
- ◆ PH-mètre Eutech ph 700
- ◆ Plaque chauffante et agitateur magnétique TRADE RAYPA AG-2 et AG-5
- ◆ Plaque agitatrice VBRAMAX 100
- ◆ Réfrigérateur
- ◆ Spectrophotomètre UV mini 1240 SHIMADZU
- ◆ Vortex VELP SCIENTIFIC, Italy

## Petit matériel

- ◆ Anse de platine
- ◆ Barreaux magnétiques
- ◆ Bec Bensen
- ◆ Bêchers
- ◆ Boîtes pétri
- ◆ Embouts
- ◆ Eprouvettes graduées
- ◆ Erlenmayer
- ◆ Fioles
- ◆ Flacons
- ◆ Lames et lamelles
- ◆ Micropipettes
- ◆ Pipettes Pasteur
- ◆ Pince en bois
- ◆ Portoirs de tubes
- ◆ Tubes à essai (10 et 20 ml)
- ◆ Spatule

## Réactifs

### Colorants

- ◆ Fushine
- ◆ Lugol (Iodo-ioduré)
- ◆ Violet de gentiane

### Les produits utilisés

- ◆ Acide acétique
- ◆ Acétone
- ◆ Ethanol (70%)
- ◆ Hydroxyde de sodium(**NaOH**)
- ◆ Chlorure d'hydrogène (**HCl**)
- ◆ Méthanol
- ◆ Réactif KOVACS
- ◆ TCA (Tri chlorure acétique)

## Annexe II

---

### La composition des milieux de culture

#### **Milieu (MA) :**

Pour 1L à pH 7,2

▪ NaCl	250g
▪ KCl	2g
▪ MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	20g
▪ FeCl <sub>2</sub>	0,023g
▪ Citrate de sodium	3g
▪ Extrait de viande	7,5g
▪ Extrait de levure	10g

**La stérilisation:** autoclavage à 120°C /30min

#### **Milieu complexe (MC) :**

Pour 1L à pH 7,2

▪ NaCl	234g
▪ KCl	3g
▪ MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	14,5g
▪ MgCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	19,5g
▪ CaCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	1,1g
▪ NaBr	0,8g
▪ NaHCO <sub>3</sub>	0,2g
▪ Extrait de levure	5g

**La stérilisation:** autoclavage à 120°C /30min

#### **Milieu pour Halobacterium :**

Pour 1L à pH 7,2

▪ NaCl	250g
▪ KCl	5g
▪ CaCl <sub>2</sub>	0,2g
▪ MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	10g
▪ Peptone pancréatique	2,5g
▪ Extrait de levure	10g

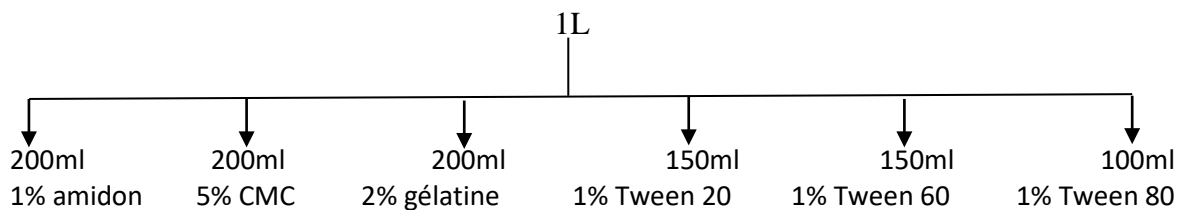
**La stérilisation:** autoclavage à 120°C /30min

## Annexe II

### Milieu SG modifié:

Pour 1L à pH 7,2

▪ NaCl	250g
▪ KCl	2g
▪ MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	20g
▪ FeCl <sub>2</sub>	0,023g
▪ Citrate tri sodique	3g
▪ Amidon	2g
▪ Gélatine	4g
▪ CMC	10g
▪ Tween 20	1%
▪ Tween 60	1%
▪ Tween 80	1%



**La stérilisation:** autoclavage à 120°C /30min

### Milieu Br + Lait écrémé :

Pour 1L à pH 7,2

▪ NaCl	250g
▪ KCl	2g
▪ MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	20g
▪ Citrate tri sodique	3g
▪ Extrait de levure	3g
▪ Lait écrémé	100ml

**La stérilisation:** autoclavage à 120°C /30min

### Milieu Br :

Pour 1L à pH 7,2

▪ NaCl	250g
▪ KCl	2g
▪ MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	20g
▪ Citrate tri sodique	3g
▪ Extrait de levure	3g

**La stérilisation:** autoclavage à 120°C /30min

## Annexe II

---

### **Milieu pour Haloarcula :**

Pour 1029 ml à pH 7,5

- Solution saline 1L
- La solution de chaque sucre 20ml
- La solution de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  5ml
- La solution de  $\text{FeSO}_4$  2ml
- La solution  $\text{k}_2\text{HPO}_4$  2ml

➤ **Composition de la solution saline**

- NaCl 200g
- KCl 4g
- $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$  36g
- $\text{CaCl}_2 (\text{H}_2\text{O})$  1g
- Tris

4g

➤ **La composition de la solution  $\text{FeSO}_4$  :100ml**

- $\text{FeSO}_4 (6\text{H}_2\text{O})$  0,2g
- HCl

1ml

➤ **La composition de la solution  $\text{k}_2\text{HPO}_4$  : 100 ml**

- $\text{k}_2\text{HPO}_4$

5g

➤ **La composition de la solution  $\text{NH}_4\text{Cl}$ : 100 ml**

- $\text{NH}_4\text{Cl}$  20g

### **Milieu DSM 370 :**

Pour 1L à pH 7,2

- NaCl 200g
- KCl 2g
- $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$  20g
- $\text{FeCl}_2$  0,036g
- $\text{MnCl}_2, 4\text{H}_2\text{O}$  0,00036g
- Citrate tri sodique 3g
- $\text{Na}$  glutamate 1g
- Peptone tripsique 5g
- Extrait de levure 5g

**La stérilisation:** autoclavage à 120°C /30min

## Annexe II

---

### **Milieu SG + Mannitol mobilité :**

Pour 1L à pH 7,2

▪ NaCl	250g
▪ KCl	2g
▪ MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	20g
▪ FeCl <sub>2</sub>	0,036g
▪ Citrate tri sodique	3g
▪ Mannitol mobilité déshydraté	26,04g

**La stérilisation:** autoclavage à 120°C /30min

### **Milieu SG + Indole :**

Pour 1L à pH 7,2

▪ NaCl	250g
▪ KCl	2g
▪ MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	20g
▪ FeCl <sub>2</sub>	0,036g
▪ Citrate tri sodique	3g
▪ Indole	15g

**La stérilisation:** autoclavage à 120°C /30min

### **Solution d'acide phosphorique:**

Pour 100 ml à pH 7,2

▪ Eau distillé	95 ml
▪ Acide phosphorique	5 ml

**La stérilisation:** autoclavage à 120°C /30min

### **Solution saline:**

▪ Eau distillée	1000 ml
▪ NaCl	180 g/l
▪ MgSO <sub>4</sub>	10 g /l

## Annexe III

**Tableau I** : Les genres et l'espèce type de la famille *Halobacteriaceae* (Oren, 2008).

Genre	Espèce Type
<i>Halobacterium</i>	<i>H. salinarum</i>
<i>Haladaptatus</i>	<i>H. paucihalophilus</i>
<i>Halalkalicoccus</i>	<i>H. tibetensis</i>
<i>Haloarcula</i>	<i>H. vallismortis</i>
<i>Halobaculum</i>	<i>H. gomorrense</i>
<i>Halobiforma</i>	<i>H. haloterrestris</i>
<i>Halococcus</i>	<i>H. morrhuae</i>
<i>Haloferax</i>	<i>H. volcanii</i>
<i>Halogeometricum</i>	<i>H. borinquense</i>
<i>Halomicrobium</i>	<i>H. mukohataei</i>
<i>Halopiger</i>	<i>H. xanaduensis</i>
<i>Haloplanus</i>	<i>H. natans</i>
<i>Haloquadratum</i>	<i>H. walsbyi</i>
<i>Halorhabdus</i>	<i>H. utahensis</i>
<i>Halorubrum</i>	<i>H. saccharovororum</i>
<i>Halosimplex</i>	<i>H. carlsbadense</i>
<i>Halostagnicola</i>	<i>H. larsenii</i>
<i>Haloterrigena</i>	<i>H. turkmenica</i>
<i>Halovivax</i>	<i>H. asiaticus</i>
<i>Natrialba</i>	<i>H. asiatica</i>
<i>Natrinema</i>	<i>H. pellirubrum</i>
<i>Natronobacterium</i>	<i>H. gregoryi</i>
<i>Natronococcus</i>	<i>H. occultus</i>
<i>Natronolimnobius</i>	<i>H. baerhuensis</i>
<i>Natronomonas</i>	<i>H. pharaonis</i>
<i>Natronorubrum</i>	<i>H. bangense</i>

## Annexe IV

---

**Tableau II :** Densité optique des cultures à différents pH

Souches	pH6	pH7	pH8	pH9
S1	/	/	0,81	/
S2	0,27	/	1,02	0
S3	0,84	0,84	0,69	/
S4	0,36	/	0,69	0
S5	0,99	1,11	1,02	0
S6	0,69	/	0,48	0
S7	1,05	0,87	0,48	/
S8	0,99	0,9	0,87	1,29
S9	0,54	0,75	1,17	/
S10	0,78	1,26	0,9	0
S11	0,9	0,45	0,66	/
S12	0,78	0,78	0,72	/
S13	0,93	1,26	0,75	/
S14	1,05	1,23	0,78	0
S15	0,66	1,11	0,54	1,5
S16	/	/	0,84	0



## Annexe V

---

**Tableau III** : Densité optique des cultures à différentes concentrations de NaCl

<b>NaCl(%)</b>	<b>10%</b>	<b>15%</b>	<b>20%</b>	<b>25%</b>	<b>30%</b>
<b>souches</b>					
<b>S1</b>	0.11	/	/	0.172	0.125
<b>S2</b>	/	/	/	0.197	0.151
<b>S3</b>	0.16	0.34	/	0.141	0.170
<b>S4</b>	0.15	/	/	0.21	0.151
<b>S5</b>	0.133	/	/	0.172	0.10
<b>S6</b>	/	/	0.23	/	0.15
<b>S7</b>	/	/	0.184	/	0.082
<b>S8</b>	/	/	0.146	/	/
<b>S9</b>	/	/	0.27	/	0.17
<b>S10</b>	/	/	/	/	0.145
<b>S11</b>	/	/	/	/	0.14
<b>S12</b>	/	/	/	/	0.12
<b>S13</b>	/	/	0.180	/	0.13
<b>S14</b>	/	/	/	/	0.12
<b>S15</b>	/	/	/	/	0.000
<b>S16</b>	/	/	0.148	/	0.12

## Annexe VI

---

**Tableau IV** : Densité optique des culots dans un gradient de NaCl

<b>NaCl(%)</b>	<b>S1</b>	<b>S3</b>	<b>S6</b>	<b>S10</b>
<b>15</b>	0,54	0,12	/	/
<b>10</b>	0,54	0,12	0,12	0,14
<b>7,5</b>	0,54	0,1	0,08	0,1
<b>3,75</b>	0,45	0,1	0,12	0,1
<b>0</b>	0	0	0	0

## Annexe VII

**Tableau V:** Le résultat des tests d'activité enzymatique

Les souches	Essai	Lait écrémé		Gélatine		Amidon		Tween 20		Tween 60		Tween 80		CMC	
		SC 1	SC2	SC 1	SC 2	SC 1	SC 2	SC 1	SC 2	SC 1	SC2	SC 1	SC 2	SC 1	SC 2
S1	1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	++	++	+++	+++	-	++	+++
	2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	++	++	++	++
S2	1	-	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++
	2	-	-	+++	+++	-	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	++	+++
S3	1	++	++	++	++	+++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	+++	+++
	2	++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+++
S4	1	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	++	+++
	2	+++	++	+++	++	+++	+++	++	+	+++	++	+	++	++	++
S5	1	+++	++	+++	++	+++	+++	++	+++	++	++	++	-	+++	+++
	2	+++	++	+++	++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	+++	+++
S6	1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	++	+++	+++	+++
	2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	++
S7	1	-	-	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	++	+++	+++	++	+++
	2	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	-	++	++	+++	+++	+++	++
S8	1	+++	+++	+++	+++	-	+++	-	++	-	++	-	+++	-	-
	2	+++	-	+++	+++	-	+++	-	+	-	+++	-	+++	-	-
S9	1	-	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
	2	-	+++	+++	+++	++	+++	+++	+	++	+++	+++	+++	++	+++
S10	1	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+	+++	++	+++	++	+++
	2	+++	-	++	++	++	+++	++	+	++	++	++	+++	-	++
S11	1	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	++	++	+++	++	+++	+++	+++
	2	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	-	++	++	++	+++	+++	++
S12	1	-	-	+++	++	+++	+++	++	+++	-	++	++	+++	+++	++
	2	-	-	+++	++	+++	+++	++	-	-	++	+++	++	+++	++
S13	1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	+++	+++
	2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	++	++	++
S14	1	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+++	+++	+++	+++
	2	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	++	++	++	+++	+++	-
S15	1	-	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	-	+++	+++	++	++	-
	2	-	+++	+++	+++	-	-	+++	++	-	++	++	+++	+	++
S16	1	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
	2	+++	-	+++	+++	-	+++	+++	+	++	+++	+++	+++	++	++

1 : Premier essai 2 : Deuxième essai - : Absence de l'activité enzymatique + : Présence de l'activité enzymatique

++ : Bonne activité enzymatique +++ : Très bonne activité enzymatique

SC1 : Surnageant des cultures sur milieu MA

SC2 : Surnageant des cultures sur milieu MC

## **Résumé**

A partir des souches halophiles extrêmes isolées de différents écosystèmes Algériens, nous avons essayé de montrer le potentiel biotechnologique. Des activités enzymatiques, antibiotiques et la production de pigments Caroténoïdes ont été déterminés dans les surnageants de culture.

Les résultats montrent que la plupart des souches sont productrices d'enzymes telles que l'amylase, cellulase, protéase, gélatinase, etc.

Les souches halophiles extrêmes isolées élaborent également des antibiotiques type Halocines et les pigments caroténoïdes emmagasinés dans leur membrane.

**Mots Clés :** Halophiles extrêmes, Bactériocines, Halocines, Extraction, Caractérisation, Antibiotique, Production.

## **Abstract**

From the extreme halophilic strains isolated from various Algerian ecosystems, we tried to show the biotechnologic potential. Enzymatic activities, antibiotic and the production of Caroténoïdes pigments were recorded in the supernatants of culture.

The results show that the majority of the strains are producing enzymes such as amylase, cellulase, protease, gelatinase, etc.

The extreme halophilic strains produce antibiotics like halocins and carotenoid pigments which they store in their membrane.

**Key words:** Extreme halophiles, Bacteriocins, Halocins, Extraction, Characterization, Antibiotic, Production.