

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 la caractérisation de
métabolites produits par quelques
souches d'haloarchées**

Présenté par Fatima zahra ATI

Soutenu le Jeudi 29 Juin 2017

Devant le Jury composé de :

M^r Abdelhamid BOUKERROUI

M.C.A

Président

M^{me} Nacera IDRES née IMADALOU

M.A.A

Rapporteur

M^{elle} Ibtissem DJINNI

M.C.B

Examineur

Année Universitaire
2016/2017

Résumé

Dans cette étude, des surnageants, des extraits protéiques ainsi que des pigments membranaires des souches d'archées halophiles ont été étudiés afin de les extraire, les purifier et les caractériser. L'éluion à travers le gel Séphadex G50 de l'extrait protéique S15 permet d'obtenir une série de fractions actives. L'étude fine des spectres par la réflexion totale atténuée a mis en évidence la structure secondaire de la protéine, qui semble être un squelette peptidique. La chromatographie liquide des fractions actives F6, F7, F8 et F9 permet de séparer les protéines. La masse de ces protéines est ensuite déterminée par l'analyse du spectre de masse au temps de rétention correspondant et qui ont données une masse molaire de 394g/mol pour la fraction F6 et de 620 g/mol pour les autres fractions.

Mots clés: Haloarché, Halocine, Métabolites, Purification, Caractérisation.

Abstract

In this study, supernatants, protein extracts as well as membrane pigments from haloarchaea strains were studied in order to extract and characterize them. Elution through Sephadex G50 of the protein extract S15 makes it possible to obtain a series of active fractions. The fine study of the spectra by the attenuated total reflexion highlighted the secondary structure of the protein, which seems to be a peptid skeleton. The liquid chromatography of the active fractions F6, F7, F8 and F9 makes possible protein separation. The mass of these proteins is then determined by the analysis of the spectrum of mass at the corresponding time of retention and which gave a molar mass of 394g/mol for the F6 fraction and 620 g/mol for the other fractions.

Key words: Haloarchaea, Halocin, Metabolite, Purification, characterization

A mes parents

A mes sœurs

A mes ami(e)s

et tous ceux qui me sont chers

« Ce n'est pas parce que les choses sont difficiles que nous n'osons pas, mais c'est parce que nous n'osons pas qu'elles sont difficiles »

Sénèque (4 avant JC-65 près JC)

« La clef de toutes les sciences est sans contredit le point d'interrogation ; nous devons la plupart des grandes découvertes au comment ? Et la sagesse de la vie consiste peut être à se demander à tout propos, pourquoi ? »

Honoré de Balzac

Remerciements

Avant toute chose, je tiens à remercier « Allah » qui m'a donné la force et la volonté pour terminer ce modeste travail.

Ce travail de mémoire a été réalisé au sein du laboratoire de Génie Biologique de l'université Abderrahmane Mira de Béjaia et au Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques (CRAPC), Bou-Ismaïl –Tipaza-.

Si ce travail se présente tel quel, c'est grâce à la contribution, la collaboration et à l'implication de certaines personnes à qui il convient d'adresser mes plus sincères remerciements.

Mes remerciements s'adressent tout d'abord au Dr. Redouane CHEBOUT, Directeur adjoint au CRAPC, pour m'avoir fait confiance, accueilli, soutenu, encouragé et donné les moyens nécessaires pour l'accomplissement de ce travail de mémoire dans un cadre de travail idéal.

Mes remerciements vont également à M^{me} Nacera IDRES pour son encadrement au quotidien malgré son emploi de temps très chargé, pour sa patience, son soutien moral, son aide particulière et sa compréhension durant les moments difficiles tout au long de la réalisation de ce travail.

Je remercie vivement le Dr. Abdelhamid BOUKERROUI qui a accepté de présider mon jury de mémoire ainsi que le Dr. Ibtissem DJINNI pour avoir accepté d'évaluer mon travail de mémoire.

Un grand merci à mon entourage et mes plus proches ami(e)s, même si l'éloignement géographique limite les contacts, c'est toujours un immense plaisir de vous retrouver et de vous savoir toujours nombreux à mes côtés.

Que mes remerciements aillent aussi à toute personne ayant participé de près ou de loin dans les résultats présentés dans ce mémoire.

Pour finir, je souhaite remercier ma famille pour son affection, qui m'est indispensable et me porte chaque jour. Merci à mes parents, Papa, de m'avoir transmis son goût pour les sciences, Maman, d'avoir toujours cru en moi. Mille merci pour tous vos encouragements, pour m'avoir soutenu tout au long de mes études et durant ce mémoire. Merci tout particulièrement à mes sœurs, Amina et Meriem pour la super famille que nous formons.

Sommaire

Introduction.....	1
--------------------------	----------

Partie théorique

Les archées halophiles et ses métabolites

I. Habitats et généralités.....	2
II. Stratégies d'adaptations aux conditions salines extrêmes.....	3
II.1. Adaptation cellulaire au sel des archées halophiles osmoprotecteurs.....	3
II.2. Accumulation de sel	4
II.3. Adaptation moléculaire des protéines halophiles.....	6
III. Métabolites des archées halophiles.....	7
III.1. Les Archéocines.....	7
III.1.1. Les Sulfolobicines.....	8
III.1.2. Les Halocines.....	8
III.1.2.1. Halocine H4.....	9
III.1.2.2. Halocine S8.....	9
III.1.2.3. Halocine H6/H7.....	10
III.1.2.4. Halocine C8.....	10
III.1.2.5. Halocine A4.....	11
III.1.2.6. Halocine H1.....	11
III.1.2.7. Halocine R1.....	12
III.1.2.8. Halocine Sech7a.....	12
III.1.2.9. Halocin KPS1.....	12
III.1.3. Mode d'action des halocines.....	13
III.1.4. Application des halocines.....	13
III.2. Les caroténoïdes.....	13
III.2.1. Structure biochimique.....	13
III.2.2. Propriétés biologiques et biochimiques.....	14

Partie pratique

I. Matériel et méthodes.....	15
I.1. Extraction des protéines.....	15
I.1.1. Extraction à l'acide phosphorique (5%).....	15
I.1.2. Extraction à l'acétone.....	15
I.2. Extraction de pigments membranaires.....	15
I.3. Recherche de l'activité antibiotique.....	15

I.4. Chromatographie par perméation sur gel de Dextrane "Sephadex G50" de l'extrait protéique S15.....	16
I.5. Caractérisation des fractions et extraits protéiques actifs.....	17
I.5.1. Étude des fractions et extraits actifs par la réflexion totale atténuée (RTA).....	17
I.5.1.1. Principe.....	17
I.5.1.2. Conditions d'analyse.....	19
I.5.2. Identification des extraits protéiques par la chromatographie en phase liquide couplée à la spectromètre de masse LC/MS.....	19
I.5.2.1. Séparation et caractérisation des molécules produites.....	19
I.5.2.1.1. La détection spectrophotométrique.....	19
I.5.2.1.2. L'analyse par spectrométrie de masse.....	20
I.5.2.2. Conditions opératoires de l'analyse.....	20
II. Résultats et discussion.....	21
II.1.Extraction des protéines.....	21
I.1.1. Extraction à l'acide phosphorique (5%).....	21
II.1.2. Extraction à l'acétone.....	22
II.2. Purification sur colonne Sephadex G 50.....	22
II.3. Caractérisation des fractions et extraits protéiques actifs.....	23
II.3.1. Étude des fractions et extraits actifs par la réflexion totale atténuée (RTA).....	23
II.3.2. Identification des extraits protéique par la chromatographie en phase liquide couplée à la spectromètre de masse LC/MS.....	28
Conclusion.....	34
Bibliographie.....	35
Annexe.....

Liste des tableaux

Tableau I. Activités antibiotiques dans les différentes fractions après extraction à l'acide phosphorique.....	21
Tableau II. Activités antibiotiques après précipitation à l'acétone des surnageants de culture.....	22
Tableau III. Activités antibiotiques des fractions éluées sur colonne Sephadex G50.....	23

Liste des figures

Figure 1. Représentation schématique des transporteurs membranaires de <i>Halobacterium salinarum</i> permettant le contrôle de l'osmolarité intracellulaire.....	5
Figure 2. Figure montrant la préparation de la colonne de Sephadex G-50.....	16
Figure 3. Figure montrant l'élution des différentes fractions sur la colonne de Sephadex G-50.....	17
Figure 4. Principe de la réflexion totale atténuée (RTA).....	18
Figure 5. Spectrophotomètre ALPHA de Bruker, CRAPC, Bou Ismail-Tipaza-	19
Figure 6. Chromatographie en phase liquide couplé au spectromètre de masse LC/MS, CRAPC , Bou Ismail-Tipaza.....	20
Figure 7. Activité antibiotique des extraits protéiques (Ep).....	21
Figure 8. Activité sur <i>H. salinarum</i> des Fractions obtenues après élution sur gel sephadex G50.....	22
Figure 9. Spectre différentielle infrarouge dans la région spectrale comprise entre 3500 et 500 cm ⁻¹	28
Figure 10. Chromatogramme et spectre de masse des fractions purifiées.....	31
Figure 11. Chromatogramme des surnageants et des extraits protéiques.....	33

Les écosystèmes hypersalins, qu'ils soient naturels (lacs salés, mers intérieures, stromatolithes marins, mines de sels) ou d'origine anthropique (marais salants, tables de cristallisation, aliments conservés par le sel) sont nombreux sur notre planète. Ces environnements hostiles à la vie sont néanmoins colonisés par de nombreux microorganismes ayant développé des mécanismes d'adaptation (**Oren, 2006 a**). Si des membres appartenant aux trois domaines de la vie (*Bacteria*, *Archaea*, *Eukarya*) sont capables de croître en présence d'une forte concentration saline, des études s'intéressant à la biodiversité de ces écosystèmes, qu'elles soient basées sur une approche moléculaire ou culture-dépendante, montrent que les archées dominent (**Baati et al., 2010**). Les archées halophiles extrêmes, c'est-à-dire pouvant croître exclusivement en présence de concentrations salines très élevées (entre 1,5 et 5 M NaCl), forment un groupe phylogénétiquement cohérent, constituant l'ordre des *Halobacteriales* (**Oren, 2006 b**).

Les peptides antimicrobiens sont des substances de l'immunité innée, universellement produits dans les trois domaines du vivant. Si, chez les bactéries et les eucaryotes, ces composés sont bien connus et très étudiés pour leurs propriétés antibiotiques contre des microorganismes pathogènes, ce n'est pas le cas chez les archées. En effet, de composés antimicrobiens de nature protéique ou peptidique appelés halocines ont été décrits, généralement de manière peu approfondie (**Shand, 2007**).

L'objectif de notre travail est de caractériser quelques métabolites produits par des souches d'haloarchées locales. Dans une première partie, nous avons abordé la synthèse bibliographique par la caractérisation des haloarchées ainsi que les halocines. Dans la partie pratique, nous avons d'abord extrait la substance antibiotique (halocine) et le pigment membranaire et en second lieu, nous avons caractérisé les substances récupérés par la réflexion suivie d'une chromatographie liquide.

I. Habitats et généralités

Les microorganismes halophiles peuvent être classées en trois catégories : les légèrement halophiles (optimum de croissance entre 2 et 5% p/v de NaCl) ; les halophiles modérées (optimum de croissance entre 5 et 20% p/v de NaCl) ; et les halophiles extrêmes (optimum de croissance entre 20 et 30% p/v de NaCl).

Les organismes halophiles ont été isolés dans des lacs, des étangs salés, dans des marais salants ou dans des sédiments marins. Ils peuvent être par exemple rencontrés dans le grand lac salé en Utah, le lac Owens en Californie, la mer morte, les estuaires de la baie de San Francisco, le lac Magadi au Kenya, la lagune de Venise en Italie.

La concentration en sel dans les environnements hyper-salés (comme la mer morte ou les grands lacs salés) est proche de la saturation (**Litchfield,1998**). L'évaporation à la surface de l'eau provoque un rapprochement des molécules de sel entre elles, ce qui provoque la formation de petits cristaux de sel qui flottent à la surface de la saumure. Ces petits cristaux croissent ensuite par l'ajout de nouvelles molécules de sel sur leurs bords. Comme le cristal devient plus lourd, il ne flotte plus et s'enfonce progressivement plus bas dans la saumure. Ce phénomène entraîne la formation de grosses pyramides cristallines. Enfin, ces pyramides continuent de croître jusqu'à la surface. Quand ces pyramides de cristaux salins se forment, de petites poches de saumure sont piégées dans la structure. Comme le taux de croissance du cristal augmente, la quantité des inclusions fluidiques augmente également. De plus la quantité d'inclusions fluidiques est plus importante dans le centre du cristal (**Andrawes et al., 1984**). Dans ces inclusions sont parfois piégés des archées halophiles, qui restent viable du fait de la présence d'eau libre, pendant de nombreuses années (**Vreeland et al., 2000 ; Stan-Lotter et al.,1993**).

Diverses espèces d'archées halophiles ont été remises en culture à partir de cristaux de sel anciens (**Vreeland et al., 2000 ; Stan-Lotter et al.,1993**). La quantité de cristaux anciens qui abritent les halophiles viables est toutefois faible. Dans une étude de 52 cristaux de sel vieux de 250 millions années, seulement 2 cristaux étudiés contenaient des archées ayant survécues à la « dormance » (**Vreeland et al., 2000**).

Les effets de l'épuisement des ressources peuvent également être observés dans les cristaux de sel récemment formés. En effet, il a été constaté que certaines archées halophiles ayant une forme de bâtonnet en conditions normales de croissance, deviennent sphériques dans les deux

ou trois semaines après la formation des cristaux. Ce pléomorphisme est typique des archées halophiles en forme de bâtonnet dans des états de carence (**Norton et Grant,1988**)

En plus d'un milieu riche en sel, ces organismes sont soumis à d'autres types de stress, comme les UV.

La plupart des archées halophiles sont colorées en rouge orangé. Cette couleur est due à l'incorporation de caroténoïdes dans leur membrane cellulaire. Ces molécules (antioxydante) contribuent à la photo protection, permettant aux cellules de vivre dans un environnement avec d'intenses radiations UV. Les autres moyens de protection contre les UV utilisés par ces organismes sont un système de réparation de l'ADN efficace et un faible nombre de « cibles » UV dans leurs génomes (thymines).

Certaines espèces ont aussi une couleur pourpre, dans ces cas là, la membrane incorpore de la bactériorhodopsine (chromo protéine pourpre) ou d'autres rhodopsine chromo protéines (**Dassarma et al.,2001**). L'exposition à la lumière UV est nécessaire pour l'activation de la bactériorhodopsine. Le rôle de cette protéine est de créer un gradient de proton entre le cytoplasme et le milieu extracellulaire afin de synthétiser de l'ATP.

II. Stratégies d'adaptations aux conditions salines extrêmes

En général, les organismes non halophiles tolèrent des niveaux de NaCl à 0,2 mol/L. Les effets d'une forte concentration en sel sur ces organismes non adaptés sont : la précipitation des biomolécules, une forte pression osmotique, une déshydratation cellulaire et donc une dessiccation. Les archées halophiles se développent cependant dans des niveaux de NaCl à plus de 3,5 mol/L. Quels sont les mécanismes mis en jeu par les organismes pour vivre dans un environnement hyper salé ?

II.1. L'adaptation cellulaire au sel des archées halophiles osmoprotecteurs

L'exclusion du sodium et la synthèse ou l'accumulation de solutés compatibles sont des réponses au stress hyper-osmotique adoptés par de nombreux microorganismes eucaryotes et bactériens, mais aussi par des archées halophiles méthanogènes (**Dassarma et al.,2001**).

Les solutés compatibles peuvent être des sucres (saccharose, tréhalose), des dérivés de sucres (sulfotréhalose, glucosylglycérol), certains acides aminés et dérivés (proline, acide glutamique, glutamine, glycine bêtaïne), éctoïne (et dérivés) ou des polyalcools (glycérol, arabitol, mannitol). L'osmoprotecteur le plus fréquemment observé est la glycine bêtaïne (**Courtenay et al., 2000**). Il est utilisé par de nombreux microorganismes halophiles et

halotolérants tels que les cyanobactéries, les bactéries aérobies hétérotrophes et les archées méthanogènes.

Les archées halophiles qui utilisent cette stratégie ont des pompes transmembranaires ions-sélectives efficaces ainsi que des voies spécifiques pour la synthèse d'osmolytes.

Les voies de biosynthèse des solutés organiques, à l'exception de celle de la glycine bêtaïne, dérivent de la synthèse du glutamate et de l'aspartate. Le mode d'action des osmoprotecteurs est loin d'être clair. Ils pourraient n'être que des solutés compatibles permettant de maintenir l'osmolarité de la cellule vis à vis de l'environnement ou ils pourraient aussi jouer un rôle protecteur actif en interagissant avec les protéines en les protégeant (**Zabner et al.,2000**), de tel sorte que leur présence dans le cytoplasme n'exige pas une adaptation particulière des protéines cellulaires.

II.2. Accumulation de sel

La seconde stratégie, adoptée par la plus part des archées halophiles, est l'accumulation intracellulaire de KCl (**Oren,2008 ; Lanyi,1974 ; Christian et Waltho,1962**). Une concentration en ion K^+ de 5,0 M a été mesurée chez *Halobacterium salinarum* lorsque la croissance a lieu à 4,0 M en ion Na^+ (**Christian et Waltho,1962**). L'exclusion du Na^+ du cytoplasme se fait grâce à un antiport Na^+/H^+ (nommé nhaC chez *Halobacterium salinarum* (voir schéma 1), localisé au niveau de la membrane cytoplasmique. Généralement, les ions K^+ entrent passivement via un système uniport (nommés trkAH chez *Halobacterium salinarum*) sous l'impulsion du potentiel de membrane. Ce système permet de remplacer une partie du sodium cellulaire par du potassium. De multiples systèmes de transport actif des ions K^+ (nommés kdpABC chez *Hs*) ont également été détectés dans le génome de *Halobacterium sp.* NRC-1 (**Oren,2002**) (voir Figure 1).

La source principale d'énergie, pour l'expulsion du Na^+ et l'accumulation de K^+ dans les cellules d'archées, est la différence de potentiel électrochimique des protons. Le potentiel de repos (pour *Hs* environ de -100 à -125 mV) est la polarisation électrique en situation physiologique de repos d'une membrane plasmique. En introduisant une électrode de mesure à l'intérieur de la cellule (méthode de patch-clamp), il a été constaté une différence de potentiel : l'intérieur de la cellule est négatif et l'extérieur est positif (**Bogomolni,1977 ; Michel et Oesterhelt,1976**).

Cette différence de potentiel est due à la fois au transport des électrons dans la chaîne respiratoire, ainsi que par le gradient de protons formé lors de la synthèse de l'ATP par les ATPase membranaires et les antiporteurs de K^+ (KdpABC).

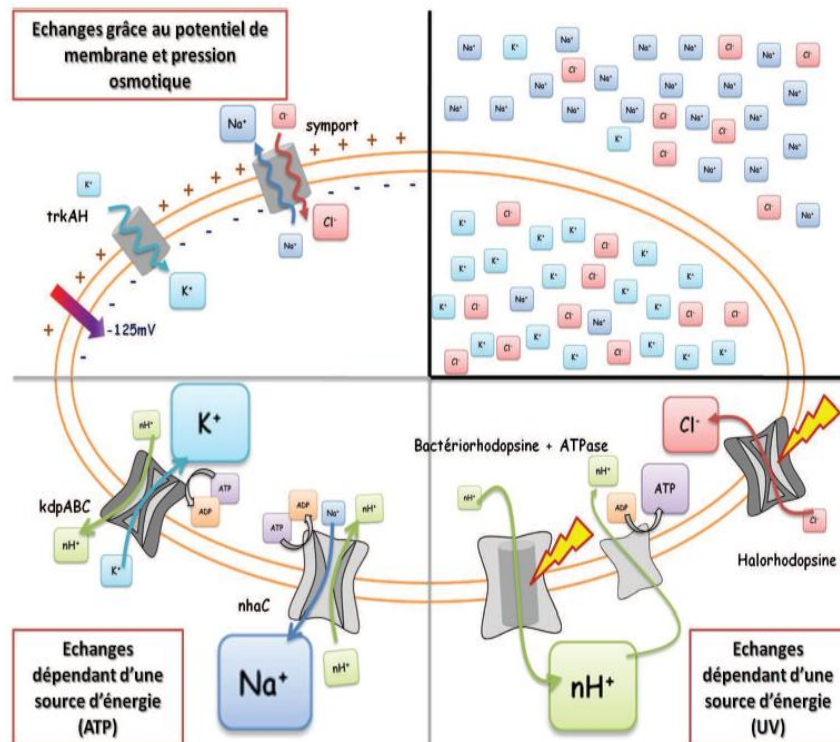


Figure 1. Représentation schématique des transporteurs membranaires de *Halobacterium salinarum* permettant le contrôle de l'osmolarité intracellulaire. En haut à droite, représentation schématisée de la localisation intracellulaires et extracellulaires des ions Na^+ , K^+ et Cl^- . En haut à gauche, transporteurs dont l'action dépend de la pression osmotique et du potentiel de membrane. En bas à gauche, transporteurs dont l'action dépend d'une source d'énergie chimique de type ATP. En bas à droite, transporteurs dont l'action dépend d'une source d'énergie physique de type UV.

L'afflux de cations doit être compensé par un nombre équivalent d'anions. Le mouvement d'anions tel que le chlorure est couplé à l'énergie du potentiel de membrane.

Il pénètre grâce à un symport Na^+/Cl^- . L'illumination des membranes actionne également une pompe qui fait entrer les ions Cl^- dans la cellule. Cette dernière fonction revient à une protéine contenant du rétinol appelé halorhodopsine chez *Halobacterium salinarum* (Marwan *et al.*, 1995).

II.3. Adaptation moléculaire des protéines halophiles

Les organismes, accumulant dans leur cytoplasme de fortes quantités de sel (principalement du KCl), se soumettent à un nouveau stress cellulaire : le stress salin. Une force ionique élevée peut avoir deux effets sur la solubilité des protéines d'organismes non adaptés aux conditions hyper-saline : la forte concentration en ion salin va neutraliser certaines charges ioniques requises en surface pour le maintien de la solubilité des protéines et rentrer en compétition avec les protéines pour les molécules d'eau disponibles en solution. Quand la concentration en sel est assez élevée pour priver une protéine des molécules d'eau qui l'hydratent, celle-ci précipite.

Cependant, les organismes halophiles ne semblent pas connaître ce stress, leurs protéines sont non seulement solubles et fonctionnelles (stables, actives et flexibles) à de telles salinités, mais en plus elles se dénaturent dès que la concentration en KCl diminue en dessous de 1,0 à 2,0 M. Elles sont en ce sens qualifiées de protéines halophiles (**Oren,2008 ; Madern et al., 2000 ; Brown-Peterson,1994**).

Le travail réalisé sur les systèmes protéiques au cours des 15 dernières années a mis en évidence plusieurs caractéristiques générales de l'adaptation moléculaire halophile via la stratégie de l'accumulation de KCl. Du fait de la présence d'une forte concentration en sel dans le cytoplasme, les protéines halophiles ont nécessairement développé des mécanismes spécifiques pour la rétention de leur conformation native et de leur activité en milieu saturé en sel. Tout d'abord, l'analyse statistique de 26 séquences de protéines halophiles a montré que la plupart des protéines halophiles (24 sur 26) sont très acides (excès de résidus acide par rapport au basique) par rapport aux non-halophiles (**Madern et al.,1995**), avec un potentiel isoélectrique moyen (pI) pour le protéome halophiles proche de 5.

L'utilisation de résidus d'acides aminés chargés négativement conduit à une organisation des ions salins en réseau à la surface des protéines, qui renforce à la fois les interactions faibles particules-particules (répulsion) et les interactions protéine-solvant. La sélection d'une surface acide est donc nécessaire pour maintenir la solubilité des protéines dans un environnement en sel élevé.

De plus, de nombreuses protéines halophiles ont des sites de liaison aux ions, souvent à l'interface de sous-unité. La formation de ponts salins avec d'autres résidus va permettre d'augmenter la stabilité des protéines.

Il a aussi été démontré qu'une hydrophobicité relativement faible à la surface des protéines ainsi que dans les parties enfouies (cœur de la protéine) était une autre forme d'adaptation

aux conditions salines. En réduisant l'hydrophobicité de la surface externe de la protéine, l'attraction hydrophobe protéine-protéine est également diminuée (**Costenaro *et al.*, 2002**).

Ainsi la réduction des résidus chargés positivement (principalement la lysine) permet d'améliorer la solubilité des protéines en augmentant la charge négative de la surface (déjà forte grâce aux résidus acides). La diminution de la surface hydrophobe enfouie entre les monomères est de plus susceptible de favoriser une plus grande flexibilité des sous unités. Pour l'enzyme malate déshydrogénase halophile, cette dernière caractéristique augmente la flexibilité des sous unités actives, lui permettant de garder une activité enzymatique correcte.

Pour la composition des protéines halophiles en particulier pour la composition de la surface des protéines, il y a donc une forte utilisation des résidus Asp, Glu (résidus chargés négativement), Thr (résidus hydrophiles) et une diminution de l'utilisation des résidus Lys, Met, Leu, Ile, et Cys.

Une étude récente de mutagenèse dirigée a souligné qu'une diminution de la surface accessible au solvant d'une protéine est aussi une caractéristique de l'adaptation halophile (**Coquelle *et al.*, 2013**).

Enfin, au niveau structure secondaire des protéines halophiles (par rapport aux protéines non halophiles), il y a une plus grande tendance à la formation de structure de type pelote statique (random coil) et une plus faible tendance à la forme de structure de type hélicoïdales (hélices et feuillettes). Un pourcentage plus élevé de la structure de type hélice, permet une augmentation globale de la rigidité de la protéine, par conséquent une diminution du pourcentage de structure de type hélice chez les protéines halophiles rend probablement plus souples ces protéines.

III. Métabolites des archées halophiles

III.1. Les Archéocines

Les substances de type bactériocine produites par le domaine Archaea sont connues sous le nom d'archéocines et sont de deux types, les halocines produites par haloarchées et les sulfobocines produites par sulfobus.

III.1.1. Les Sulfolobocines

Prangishvili *et coll.* (2000) ont été les premiers à signaler les sulfolobocines par *Sulfolobus islandicus*. La sulfolobocine inhibe *S. solfataricus* P1, *S. shibatae* B12 et six souches non productrices de "*S. Islandicus*". On a signalé que l'activité des sulfolobocines était archéocide. **(Prangishvili *et al.*, 2000)**. Comme cela a été observé avec certaines bactériocines, la sulfolobocine n'est pas libérée des cellules productrices sous forme soluble dans un milieu liquide mais, elle est restée liée aux membranes des cellules. Cette caractéristique fait de la sulfolobocine un type spécial d'archéocine. Le surnageant de culture n'a montré aucun antagonisme mais, en le concentrant 100 fois, il a montré un antagonisme. La purification de la sulfolobocine a été réalisée en récoltant des cellules en phase stationnaire tardives suivies d'une sonication. Les débris cellulaires sont précipités par centrifugation à grande vitesse et la libération de sulfolobocine est obtenue par l'addition de TritonX100. L'activité de la sulfolobocine purifiée est restée stable pendant 6 mois à 4 ° C et reste active pendant 5 jours à 85°C et pH 3,5 à 6,5 **(Prangishvili *et al.*, 2000)**. La nature chimique de la sulfolobocine a été étudiée en incubant le composé purifié avec des enzymes glycolytiques, lipolytiques et protéolytiques. Aucune diminution de l'activité de la sulfolobocine n'a été détectée après traitement par des enzymes glycolytiques ou lipolytiques. L'incubation des enzymes protéolytiques testées a conduit à la perte complète de l'activité de la sulfolobocine, ce qui indique qu'une protéine intacte est requise pour l'activité. **(Prangishvili *et al.*, 2000)**. Sulfolobocine présente des caractéristiques classiques de bactériocine, car elles sont protéiques et sont dirigés contre des souches étroitement liées à la souche productrice. Bien que certaines souches productrices contiennent des plasmides conjugués, ni la production de sulfolobocine ni l'immunité n'a été transférée à des souches non productrices, suggérant que les gènes de sulfolobocines peuvent être situés sur le Chromosome **(Prangishvili *et al.*, 2000)**.

III.1.2. Les Halocines

Les Haloarchées ont été les premiers membres d'Archaea à produire des bactériocines qui sont libérées dans l'environnement et c'est une caractéristique universelle des bactéries halophiles **(Rodriguez-Valera *et al.*, 1982)**. Ces bactériocines protéiniques, appelées halocines, agissent contre des espèces apparentées et sont généralement produites par les archées halophile **(Torreblanca *et al.*, 1994)**. Les Halocines pourrait être classé en deux types, microhalocine, peptides dont la taille est inférieur ou égale à 10kDa, halocine protéinique dont la taille est supérieur ou égale 10kDa.

Bien que plusieurs Archées halophiles soient explorées pour la production d'halocine, très peu d'halocines ont été étudiées jusqu'au niveau moléculaire. Leur mode d'action contre les halophiles en tant que défense reste à comprendre Clairement (**Tamar et Aharon, 2000; Meseguer et Rodriguez Valera, 1986**).

Halocin A4, G1, R1, H1, H2 (**O'Connor et Shand, 2002**); H3, H5(**Rodriguez-Valera et al., 1982; O'Connor et Shand, 2002**); H4 (**Sun et al., 2005; Gonzalo et al., 2002; O'Connor et Shand, 2002**); H6 / H7 (**O'Connor et Shand, 2002; Li et al., 2003**); S8 (**O'Connor et Shand, 2002**); C8 (**Li et al., 2003, Sun et al., 2005**), Sech7a (**Pasi et al., 2008**) et KPS1 (**Kavitha et al., 2011**) sont quelques halocines signalées jusqu'à ce jour.

III.1.2.1. Halocine H4

Halocine H4 (HalH4) produite par *Haloferax mediterranei* R4 (ATCC 33500) isolée des lacs solaires d'Espagne, a été la première halocine découverte (**Rodriguez-Valera et al., 1982**). La masse moléculaire de cette halocine a été déterminée comme 28 kDa par SDS-PAGE (**Meseguer et Rodriguez Valera, 1985**) et comme 34,9 kDa par clonage et expression du gène (**Cheung et al., 1997**). On a signalé que ce HalH4 de 34,9 kDa était traité à partir d'une préprotéine de 39,6 kDa qui contient la séquence signal N-terminal Tat de 46 acides aminés (**Cheung et al., 1997**). Halocine H4 est codée par un cadre de lecture ouvert de 1 080 pb qui correspond à un polypeptide de 359 résidus (**Cheung et al., 1997**). On a également constaté que l'HalH4 contient une région hydrophobe qui aurait un rôle majeur dans la liaison au site cible (**Shand et al., 1999**). Le site cible réel d'HalH4 n'est pas déterminé (**Meseguer et al., 1995**). En présence de l'halocine H4, les cellules sensibles *Halobacterium salinarum* gonflent et deviennent sphériques en raison du déséquilibre ionique et de la lyse (**Meseguer et Rodriguez Valera, 1986**).

III.1.2.2. Halocine S8

Halocine S8 (HalS8) est produite par haloarchée S8a, isolée du grand lac salé, Utah (**Price et Shand, 2000**). Elle ne contient que 36 acides aminés et est appelée microhalocine. Elle inhibe *Hbt. Salinarum* NRC817, *Halobacterium* sp. Souche GRB et *Hfx. Gibbonsii* (**Price et Shand, 2000**). HalS8 est résistante à la chaleur, à la digestion à la trypsine et au solvant organique (**Price et Shand,2000; Shand et al., 1999**). Son poids moléculaire a été déterminé comme 3,58 kDa (**Price et Shand, 2000**). L'halocine S8 est codée par un cadre de lecture ouvert de 933 pb qui produit la préprotéine de 311 acides aminés qui doit subir un

traitement en deux sites différents pour produire trois peptides : une protéine N-terminal de 230 acides aminés contenant le peptide signal Tat ; un peptide acide C-terminal et une halocine mature de 36 acides aminés (entre les deux peptides) qui est inhabituelle (**Price et Shand, 2000**). Cette préproprotéine contient 230 acides aminés dans la région N-terminal, 45 acides aminés dans la région C-terminal et cela joue un rôle majeur dans l'immunité, l'induction, la translocation et la régulation de l'halocine (**Price et Shand, 2000**). La dégradation d'Edman de l'halS8 purifié a révélé à 47% un peptide hydrophobe de 36 acides aminés et des recherches BLAST de HalS8 n'a révélé aucune homologie avec aucune protéine dans la base de données (**Price et Shand, 2000**). La séquence d'acides aminés signalée pour HalS8:

SDCNINSNTAADVILCFNQVGSCALCSPTLVGGPVP (**Price et Shand, 2000**).

III.1.2.3. Halocine H6/H7

Halocine H6 (HalH6) est produite par la souche *Haloferox gibbonsii* Ma2.39. Elle a été isolée pour la première fois de la saline solaire, Alicante, Espagne (**Torreblanca et al., 1989**). HalH6 a été purifiée en utilisant une chromatographie sur hydroxylapatite, une chromatographie par filtration sur gel sephadex G50 et HPLC avec colonne Spherogel et le poids moléculaire de HalH6 a été déterminé comme 32 kDa par SDS-PAGE (**Torreblanca et al., 1989**). Halocine H6 a conservé 100% d'activité après exposition à 90 ° C pendant dix minutes et conservé 50% d'activité après exposition à 100 ° C pendant 10 minutes, mais a perdu toute son activité lors de l'autoclave (**Torreblanca et al., 1989**). Elle est résistante à la trypsine et sensible à la pronase. Contrairement à d'autres antibiotiques, la production d'HalH6 n'a pas été induite par la lumière UV ou l'acridine orange. L'halocine est en fait une protéine de 3kDa qui est combinée avec une protéine porteuse et a montré la masse moléculaire de 32 kDa. Après les conditions de dénaturation, la protéine mature de 3 kDa a été libérée. Cette halocine est désignée sous le nom de halocine H7 (HalH7) et caractérisée comme microhalocine (**Shand et Kathryn, 2007**).

III.1.2.4. Halocine C8

Halocine C8 (HalC8) est produite par la souche *Halobacterium* AS7092 isolée du Grand lac salé de Chaidan en Chine (**Li et al., 2003; Sun et al., 2005**). Elle inhibe 16 souches d'haloarchées, dont trois halobactéries alcalines qui se développent de manière optimale au

pH 9.5. Elle a été concentré par filtration tangentielle (TFF) et purifié en utilisant une colonne de filtration sur gel Sephadex G50 et la chromatographie sur colonne de DEAE-Sephadex. Après l'électrophorèse sur Tricine-SDS –PAGE, le poids moléculaire de 6,3 kDa est obtenu (Li *et al.*, 2003). Non clair

Le clonage et l'analyse séquentielle du gène HalC8 ont montré que cette microhalocine est de 7,44 kDa et est constituée de 76 acides aminés. Elle est riche en cystéine et contient 283 acides aminés dans la région C-terminale qui est également connu sous le nom ProC8 et le traitement de cette HalC8 commence dans cette région. La région N-terminal contient la séquence leader Tat suivie d'un acide aminé 207 est connu sous le nom de HalI qui est riche en acides aminés hydrophiles et cette région confère l'immunité. C'est le premier rapport d'un seul gène codant pour un peptide antimicrobien et l'immunité (Sun *et al.*, 2005).

III.1.2.5. Halocine A4

Elle a un large spectre d'activités antagonistes et inhibe la crenarchée hyperthermophile *S.solfataricus* et pas le mutant de *S.solfataricus* (Haseltine *et al.*, 2000). HalA4 a été purifiée par chromatographie par filtration sur gel et HPLC RP (Shand, 2006). Elle a une masse moléculaire de 7,435Da déterminée par la spectrométrie de masse et elle est à la fois de nature acide et hydrophobe (Shand et Leyva, 2007).

III.1.2.6. Halocine H1

Halocine H1 (HalH1) est obtenue à partir du surnageant de *H. mediterranei* M2a (précédemment connue sous le nom de *H. mediterranei* Xia3) a été initialement décrite par Rodriguez-Valera *et al.* (1982). On a constaté que cette halocine avait un large spectre d'inhibition parmi les différentes haloarchées. Elle a été initialement purifiée par Chromatographie sur colonne en utilisant du CNBr-Sepharose 4B et de Bio-Gel HTP d'hydroxylapatite. On a déterminé que la masse moléculaire était de 31 kDa par SDS PAGE. Elle est sel dépendant et requiert un minimum de 5% de NaCl pour conserver son activité (Platas *et al.*, 2002). HalH1 est thermostable (Platas, 1995) et sa production augmente en présence de la NZ-Amine E. Le rendement en halocine passe de 1 280 000 ml / à une fluctuation entre 0-320AU / ml avec d'autres nutriments (Platas, 1995; Shand et Leyva, 2007). HalH1 est efficace contre les organismes haloarchées classés dans le même genre que la souche productrice.

Le mécanisme d'action de HalH1 n'est toujours pas claire, mais des expériences préliminaires ont montré que ses effets sur *H. salinarum* NRC 817 sont similaires à ceux observés pour l'halocine H4 (Platas *et al.*, 2002).

III.1.2.7. Halocine R1

Halocine R1 (HalR1) est la deuxième microalocine à être caractérisée. Elle est produite par *Halobacterium. Salinarum* GN101 isolée d'une saline solaire dans le Guerro Negro, Mexique par Barbara Javor (Ebert *et al.*, 1986). Son poids moléculaire est de 3,8 kDa. Rdest et Sturm (1987) ont rapporté que l'halocin R1 est de 6,2 kDa et plus tard, on a constaté que cette protéine de 3,8 kDa était associée à une protéine porteuse qui se détache lors du chauffage et la filtration sur gel (Shand *et al.*, 1999; O'Connor, 2002). Cette microhalocine est entièrement séquencée par la dégradation d'Edman et s'est révélée avoir une grande similitude avec HalS8 (Price et Shand, 2000; O'Connor, 2002; O'Connor et. Shand, 2002). La séquence d'acides aminés signalée pour HalR1 est la suivante: LQSNININTAAAVILIFNQVQVGVGALCAPTPVSGGGPPP (O'Connor, 2002).

III.1.2.8. Halocine Sech7a

Halocine Sech7a est produite par une haloarchée extrêmement Sech7a isolée de bassins de cristallisation de salines solaires de Secovlje en Slovénie (Pasic *et al.*, 2008). L'isolat est phylogénétiquement lié à *Haloferax mediterranei* et son halocine a montré une activité contre *Halobacterium salinarum* NRC817. La purification est réalisée par ultrafiltration et une chromatographie sur colonne échangeuse d'ions DEAE Sephacel. Son poids moléculaire est estimé à 10,7 kDa en utilisant SDS-PAGE. Sech7 est stable sur une large gamme de pH (2-8) et est thermostable à des températures comprises entre 20 ° C et 80 ° C. Comme les halocines H4, H6 et C8 (Meseguer *et al.*, 1985; Torreblanca *et al.*, 1989; Li *et al.*, 2003), elle perd son activité lorsqu'elle est exposée à de faibles concentrations en sel et permet la lyse des cellules sensibles par un gonflement initial.

III.1.2.9. Halocin KPS1

Halocin KPS1 est produite par *Haloferax volcanii* KPS1 isolée de salines solaires en Inde du Sud. C'est la première halocine signalée à montrer une activité antimicrobienne contre les agents pathogènes humains Gram positif et Gram négatif (Kavitha *et al.*, 2011). Elle inhibe également *Halobacterium sodomens*. On a constaté que le pH est stable entre 3 et 9 et est

thermolabile au-dessus de 80 ° C. Le poids moléculaire n'a pas été déterminé et elle perd son activité au contact de 1 mg / mL de protéinase K et de trypsine pendant 10 min.

III.1.3. Mode d'action des halocines

les halocines tuent généralement les organismes indicateurs par un gonflement suivi d'une lyse cellulaire (O'Connor and Shand, 2002; Sun *et al.*, 2005; Pasi *et al.*, 2008). Le mécanisme d'action de l'halocine H6 peut impliquer une modification de la perméabilité membranaire ou de l'inhibition de l'antiport Na^+ / H^+ (Meseguer *et al.*, 1995). Il a été rapporté que l'halocine H6 produit par l'haloarchée *Haloferax gibbonsii* inhibe l'échangeur Na^+ / H^+ (NHE) des cellules de mammifères (Lequerica *et al.*, 2006).

III.1.4. Application des halocines

Selon Alberola *et coll.* (1998), les halocines peuvent avoir un rôle dans la médecine humaine car elles montrent une activité antimicrobienne contre les agents pathogènes humains Gram positif et Gram négatif (Kavitha *et al.*, 2011). Par conséquent, les halocines pourraient être utilisées comme une alternative aux antibiotiques existants qui ont engendré le phénomène de résistances des bactéries pathogènes.

Elles pourraient être utilisées en industrie du cuir pour contrôler la détérioration (Rdest et Sturm 1987; Shand et Perez 1999; Shand *et al.*, 1999; Shand et Leyva, 2008). Le sel brut des salines solaires abrite un excès de microorganismes lipolytiques et protéolytiques extrêmement halophiles qui, lorsqu'ils sont appliqués sur des peaux, endommagent le cuir. La croissance des halobactéries sur les peaux pourrait être évitée en utilisant des composés antimicrobiens naturels comme les halocines (Birbir et Eryilmaz, 2005).

III.2. Les caroténoïdes

III.2.1. Structure biochimique

Les caroténoïdes font partie d'une des plus grandes familles de pigments naturels. De couleur jaune-orangé à rouge (Castenmiller et West, 1998). Elles sont des molécules lipidiques appartenant à la famille des terpènes. Leur squelette linéaire carboné porte 40 atomes de carbone. La structure de base, le lycopène ($\text{C}_{40}\text{H}_{56}$) porte un cycle oxydé ou déshydraté pour donner les caroténoïdes dérivés (Cazzonelli et Pogson, 2010).

Les caroténoïdes hydrocarbonés appartiennent à la sous famille des carotènes. Ils peuvent être modifiés par un groupement fonctionnel oxygéné, on parlera alors de xanthophylles (**Armstrong,1994**)

La structure générale des caroténoïdes étant symétrique, le squelette est numéroté de 1 à 15 jusqu'au point de symétrie centrale de la molécule puis de 15' à 1'. Les groupements méthyles sont numérotés de 16 à 20 et, de même, du côté "prime" et la structure terminale existe sous plusieurs formes.

III.2.2. Propriétés biologiques et biochimiques

Les différentes structures chimiques, les longueurs de la chaîne carbonée et le nombre de doubles liaisons conjuguées intermoléculaires ainsi que les conformations (cis ou trans) des caroténoïdes déterminent les propriétés physicochimiques et biologiques différentes.

La couleur est l'élément caractéristique de ces molécules, elle peut varier du jaune au rouge. Ces molécules doivent leur couleur à leur système de doubles liaisons conjuguées créant un chromophore et permettant ainsi l'absorption de la lumière visible entre 400 nm et 500 nm. Le degré de conjugaison du chromophore détermine les caractéristiques d'absorption du caroténoïde (**Breithaupt et al., 2002**).

Les caroténoïdes sont fortement hydrophobes ce qui oriente leur répartition dans l'environnement cellulaire. A cause de leurs polyinsaturations, ils se dégradent et s'oxydent en présence de lumière et d'oxygène (**Faure et al., 1999**).

I. Matériel et méthodes

Des surnageants des différentes cultures de souches halophiles (S1, S2 , S5, S6, S7, S8, S10, S11, S12, S13, S14, S15) ainsi que des cultures en erlenmeyer (50 ml) de la souche S1 sont utilisés dans cette étude pour la caractérisation de substances antibiotiques produites.

I.1.Extraction des protéines totales

I.1.1. Extraction à l'acide phosphorique (5%)

Dans une première étape, des cultures liquides des souches S1 ; S8 et S15 sont centrifugées à 8000 rpmxg/20min. Les pH des surnageants sont ajustés à des valeurs de 2 avec de l'acide phosphorique à 5% puis mis à 4°C pendant 1heure. Les protéines précipitées sont recueillies par centrifugation puis mises en suspension dans la solution saline et testés pour leur activité antibiotique.

I.1.2. Extraction à l'acétone

Des surnageant de différentes cultures ont fait l'objet d' une extraction par l'acétone (v/v).

I.2. Extraction de pigments membranaires

Un tube contenant la souche de référence *Halobacterium salinarium* DSM3754 est centrifugé à 5500g/10 min. Le culot est lavé avec la solution saline. 1 ml de mélange acétone/méthanol est introduit dans le tube (v/v) et gardé dans l'obscurité pendant 30min. Le tube est ensuite centrifugé à 5500g/10min puis caractérisé par réflexion totale atténuée et analysé par chromatographie en phase liquide.

I.3. Recherche de l'activité antibiotique

Les tests d'activité antibiotique ont été réalisés sur les surnageants de culture cités précédemment (avant et après extraction à l'acide phosphorique et à l'acétone) ainsi que les extraits protéiques cellulaire (S15,S8SC,SC2B et S1) par la méthode des spots. 15 ml de milieu complexe , sont répartis dans des boites de Petri, après solidification, 5 ml de gélose molle du même milieu contenant le germe cible(1%) sont étalés en surface (**Shand, 2006**). Des spots de 5 µl de surnagent ou d'extrait sont déposés à la surface des boites puis incubées à 40°C pendant 2 jours ou plus jusqu'à ce que la croissance des souches indicatrices soit visible.

Les résultats se manifestent par la présence de zones d'inhibition sous forme d'halo clair. (**Biscola et al., 2012**)

I.4. Chromatographie par perméation sur gel de Dextrane "Sephadex G50" de l'extrait protéique S15

La chromatographie sur gel de Sephadex est une technique de séparation dont les molécules sont séparées suivant leur taille (**Determann, 1969**). La séparation s'effectue sur colonne garnie d'un gel formé de particules poreuses. Cette technique est également utilisée pour la purification et le fractionnement des molécules.

Le gel, préalablement gonflé dans l'eau distillée, après dégazage sous vide, est introduit dans la colonne de verre; la hauteur du gel est de 15 cm (figure 2).

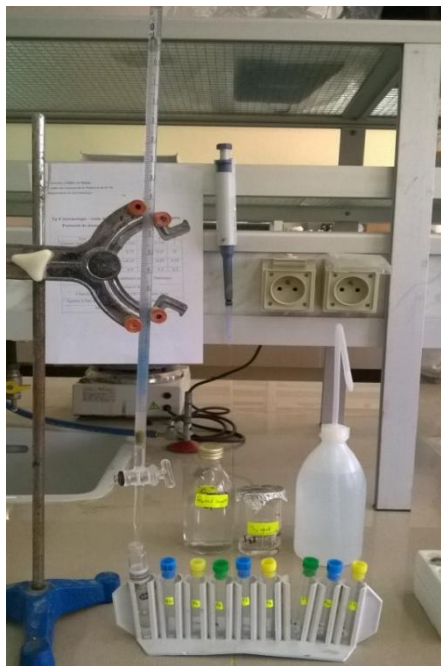


Figure 2. Figure montrant la préparation de la colonne de Sephadex G-50

La colonne est étalonnée avec le bleu de Dextran (1mg/ml), un polymère coloré de synthèse dont la masse est de 2000 kDa, qui permet de déterminer le volume mort (**Kamoun, 1997**).

On utilise comme éluant l'eau ultra pure à un débit de 0.4ml/min . Les 40 fractions éluées sont testées pour leur activité antibiotique.

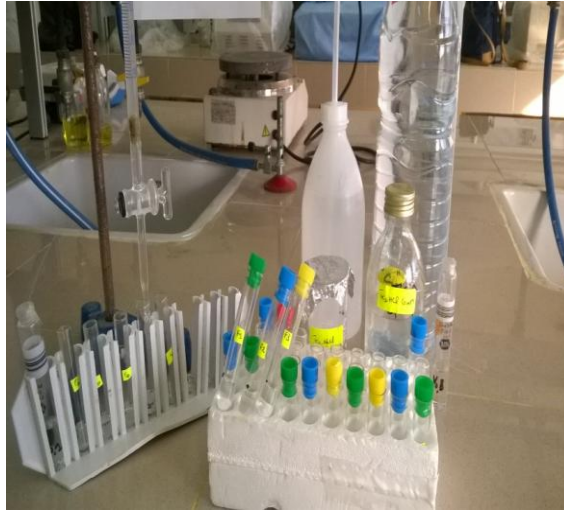


Figure 3. Figure montrant l'élué des différentes fractions sur la colonne de Sephadex G-50

I.5. Caractérisation des fractions et extraits protéiques actifs

I.5.1. Étude des fractions et extraits actifs par la réflexion totale atténuée (RTA)

I.5.1.1. Principe

La spectrophotométrie infrarouge est une technique d'analyse utile pour la détermination, l'identification ou la confirmation de structure de produits connus ou non. Un spectre infrarouge permet de mettre facilement en évidence la présence de certains groupements fonctionnels, et peut servir de *carte d'identité spectroscopique* pour une molécule ou un matériau.

Les échantillons peuvent être étudiés en transmission ou en réflexion grâce à un appareil nommé RTA

Lorsqu'un faisceau lumineux arrive à l'interface entre deux milieux d'indice de réfraction très différents, il peut subir une réflexion interne totale. Ce phénomène se produit lorsque la valeur de l'angle du rayon incident est supérieure à un certain angle critique. Lorsque la réflexion se

produit, une partie de ce faisceau pénètre dans le milieu d'indice de réfraction le plus faible avant de subir la réflexion : c'est l'onde évanescente. C'est cette onde évanescente qui va interagir avec les molécules étudiées. Lors du passage dans le second milieu, une partie de la lumière incidente peut être absorbée par un échantillon et donc le rayon réfléchi est moins énergétique que le rayon incident. De cette manière, il devient possible de réaliser un spectre d'absorption. C'est l'une des techniques de la spectroscopie infrarouge qui a le plus évolué ces dernières années.

C'est une méthode d'analyse de surface. L'épaisseur analysée dépend de la pénétration de l'onde évanescente dans l'échantillon. Celle-ci peut aller de 0.5 à 5 μm . Cela rend donc la Réflexion Totale Atténuée particulièrement intéressante pour l'analyse des échantillons purs, puisque le risque de voir les pics saturés est très faible. Elle permet enfin de faire varier les conditions expérimentales pendant les mesures et est également une technique très reproductible à condition de ne pas réclamer des sensibilités très importantes. Le principe de l'RTA est détaillé sur la Figure 4

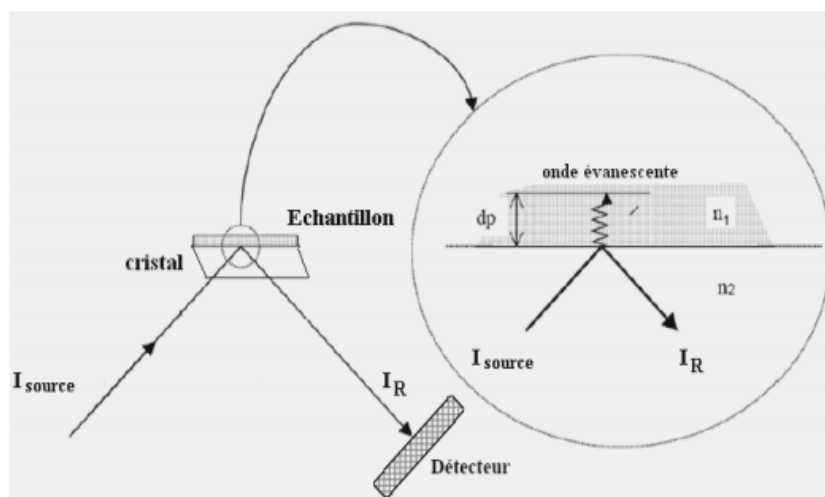


Figure 4. Principe de la réflexion totale atténuée (RTA)

Le principe des dispositifs RTA est de faire subir au faisceau optique plusieurs réflexions à l'interface entre l'échantillon et un cristal parallélépipédique (25 x 10 x 2 mm), transparent en IR mais d'indice de réfraction n_2 élevé (ZnSe, TlBr, AgCl, diamant...) et dans la plupart des cas, supérieur à celui de l'échantillon (n_1)

I.5.1.2. Conditions d'analyse

Les spectres infrarouges en mode RTA des différents surnageants et extraits protéiques, ont été obtenus sur le spectrophotomètre ALPHA de Bruker (Figure 5) dans la gamme spectrale comprise entre 4000 et 400 cm^{-1} avec une résolution spectrale égale à 2 cm^{-1} et 32 scans.



Figure 5. Spectrophotomètre ALPHA de Bruker, CRAPC

I.5.2. Identification des extraits protéiques par la chromatographie en phase liquide couplée à la spectromètre de masse LC/MS

I.5.2.1. Séparation et caractérisation des molécules produites

I.5.2.1.1. La détection spectrophotométrique

L'acronyme DAD désigne le détecteur à barrettes de diodes (Diode Array Detector). Ce dernier est composé de barrettes constituées de plusieurs centaines de diodes au silicium (un semi-conducteur), mélangé à des éléments du groupe III (p. ex. : Ga) ou V (p. ex. : As) pour améliorer sa conductivité. Plusieurs barrettes de diodes placées dans le plan focal d'un monochromateur à réseau peuvent contrôler simultanément une vaste gamme de longueurs d'ondes et les données d'un spectre complet sont ainsi recueillies en moins d'une seconde. Ce type de détection est d'un apport considérable dans la caractérisation des pics sur un chromatogramme HPLC/UV, car il permet de visualiser le spectre UV de chaque constituant.

I.5.2.1.2. L'analyse par spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est basée sur le principe d'une séparation des molécules en fonction de leur rapport masse-sur-charge (m/z). Cette séparation a lieu grâce à la variation de courants et de champs électrique, et cela implique que les molécules doivent être chargées pour être séparées. Un spectromètre de masse est composé de trois parties distinctes :

- La source, dans laquelle les molécules sont ionisées, libérées de leur solvant et transférées vers l'analyseur ;
- L'analyseur, qui sépare les ions en fonction de leur rapport masse-sur-charge (m/z) ;
- Le détecteur, qui permet la détection et convertit le signal électrique en données numérique qui seront envoyées vers un ordinateur.

I.5.2.2. Conditions opératoires de l'analyse

Les chromatogrammes des différents surnageant et extraits protéiques ainsi que les pigments, ont été obtenus en utilisant la chromatographie en phase liquide à haute performance HPLC : Agilent 1260 infinity couplé à un détecteur à barrette de diode et un spectromètre de masse : Agilent 6420 Triple quad LC/MS équipé d'une source d'ionisation électrospray (ESI). Nous avons utilisé une colonne Poroshell 120 EC-C18 (50 mm x 3.0 mm x 2.7 μm). La phase mobile consiste en un mélange d'acétonitrile (20%) et de l'eau (80%). Elle est délivrée au débit de 0.8 mL/minute. Le détecteur balaye le spectre UV de 190nm à 400nm ($\lambda = 260\text{nm} - 280\text{ nm}$)



Figure 6. Chromatographie en phase liquide couplé à la spectromètre de masse LC/MS, CRAPC

II. Résultats et discussion

II.1.Extraction des protéines

II.1.1. Extraction à l'acide phosphorique (5%)

Après extraction des surnageants de culture à l'acide phosphorique, les culots recueillis par centrifugation sont suspendus dans une solution saline. L'activité antibiotique sur *Halobacterium salinarium* est déterminée avant et après extraction. Les résultats montrent que la substance active peut être récupérer en totalité après extraction à l'acide phosphorique. En effet, dans les surnageant des souches S8 et S15 aucune activité n'est retrouvée dans le surnageant extrait (SCE) (Tableau I et figure 7).

Tableau I. Activités antibiotiques dans les différentes fractions après extraction à l'acide phosphorique.

Surnageant de culture des différentes souches	Volume (ml)	Activité sur <i>H.salinarium</i> (ZI : mm)		
		SC	EP	SCE
S1	4	16	15 (500µl)	7
S8	10	25	28 (1ml)	0
S15	10	28	28 (1ml)	0

ZI : Zone d'inhibition

SC : Surnageant de culture

EP : Extrait protéique

SCE : Surnageant après extraction à l'acide phosphorique

() : Volume dans lequel les Ep sont repris

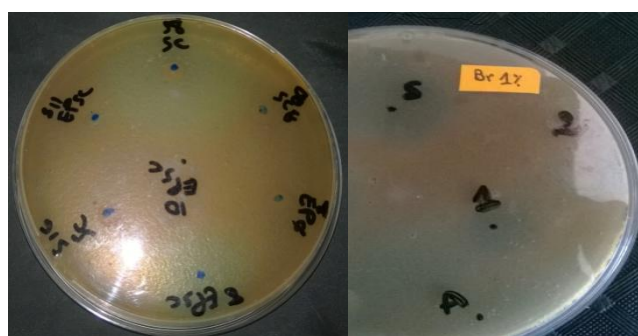


Figure 7. Activité antibiotique des extraits protéiques (Ep)

II.I.2. Extraction à l'acétone

1mL de surnageant de culture a été extrait avec 1 ml d'acétone. Après extraction, l'extrait et le précipité sont testés pour leurs activités sur *H. salinarum*. Les résultats montrent que tous les précipités à l'acétone sont actifs (Tableau II). La présence de la substance active dans le surnageant extrait (SCE), principalement dans le cas des souches S1 et S8, indique que l'extraction est incomplète. Il est donc important d'optimiser le temps de contact de l'acétone.

Tableau II. Activités antibiotiques après précipitation à l'acétone des surnageants de culture

Surnageant de culture et extrait protéique	Activité sur <i>H. salinarum</i> (ZI : mm)	
	Précipité	SCE
S15	5	4
2B	5	2
Brop 1% (S1)	5	5
Brop 2% (S1)	5	5
EPS8	4	9

ZI : Zone d'inhibition

SCE : Surnageant après extraction à l'acétone

II.2. Purification sur colonne Sephadex G 50

Les 40 fractions de l'extrait protéique S15, recueillies après élution sur colonne de gel de sephadex G50, sont testées sur *H.salinarum* (figure 8). Cette étape de purification nous a permis non seulement de désioniser l'extrait protéique, mais aussi de le concentrer et d'éliminer toutes les petites molécules ayant une masse moléculaire comprise entre 1 500 et 30 000 Da.



Figure 8. Activité sur *H. salinarum* des Fractions obtenues après élution sur gel sephadex G50

L'activité antibiotique est détectée entre la 6^{ème} et la 9^{ème} fraction (Tableau III). Ces fractions ont été éluées en absence de NaCl, ce qui indique que la souche a produit une molécule active qui n'est pas sel dépendante. Les halocines, H6 (Torreblanca *et al.*, 1989), S8 (Price et Shand, 2000), et la C8 (Yun *et al.*, 2003) sont sel indépendantes.

Tableau III. Activités antibiotiques des fractions éluées sur colonne Sephadex G50

Fractions	Activité sur <i>H.salinarum</i> (ZI : mm)
F5	0
F6	9
F7	6
F8	7 (Bactériostatique)
F9	7 (Bactériostatique)
F10	0

ZI : Zone d'inhibition

Les fractions actives obtenues ont fait l'objet d'une analyse par la réflexion totale atténuée et purification par chromatographie en phase liquide.

II.3. Caractérisation des fractions et extraits protéiques actifs

II.3.1. Étude des fractions et extraits actifs par la réflexion totale atténuée (RTA)

Les différentes bandes obtenues sont dues aux différents modes de vibration des liaisons.

On peut compartimenter les différents spectres IR en trois zones :

- De 4000 à 1500 cm^{-1} , on observe les bandes d'allongement des groupements principaux O-H, N-H, C-H, C=O, C=C ;
- De 1400 à 1200 cm^{-1} , une partie plus complexe, qualifiée d'empreintes digitales du composé. On y trouve les bandes de déformation, mais aussi les bandes d'allongement C-O ;
- Enfin, de 1000 à 600 cm^{-1} , on trouve les bandes caractéristiques des structures Ethyléniques ou aromatique.

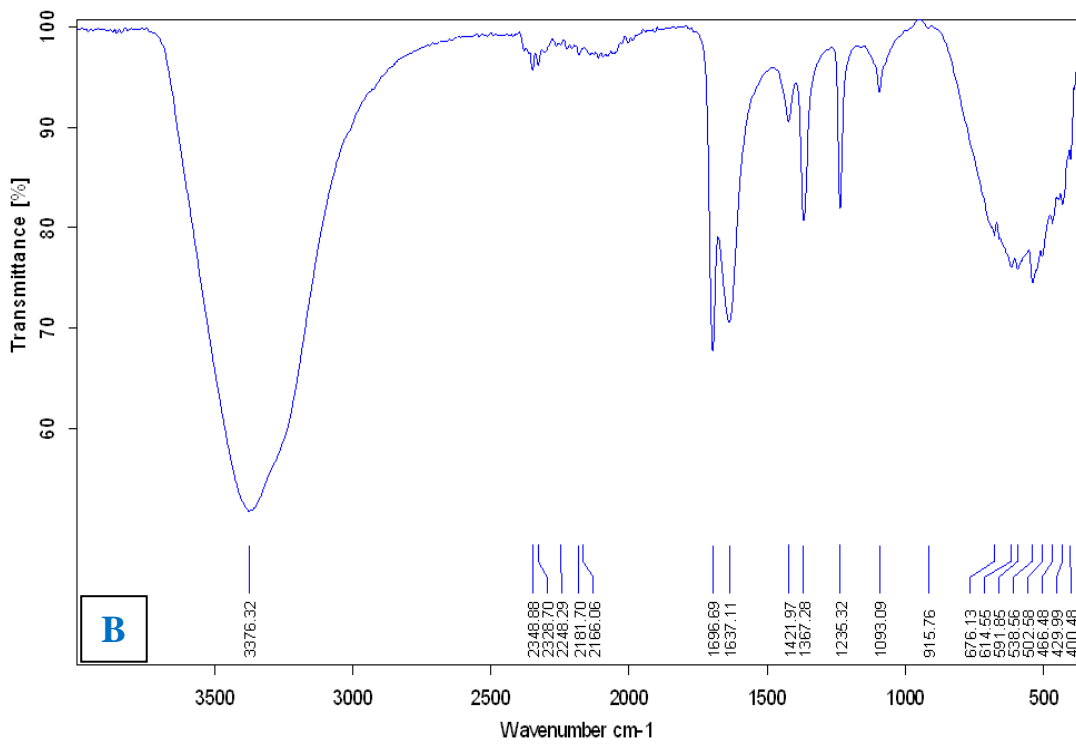
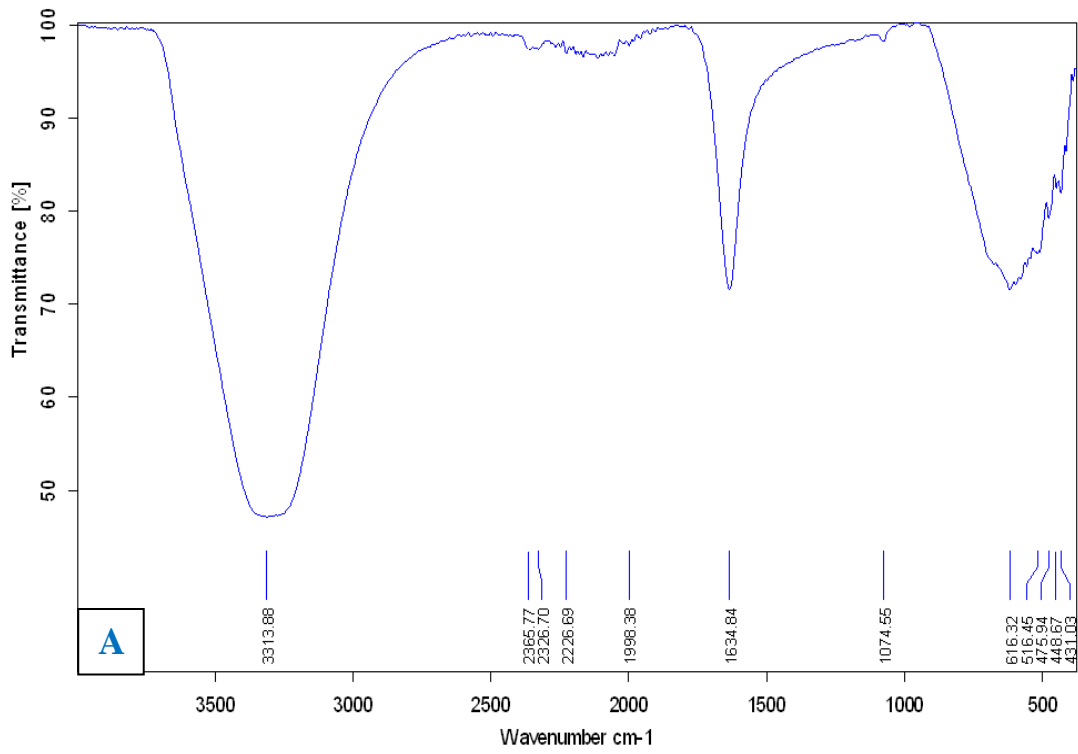
L'analyse de l'extrait actif F6 montre des bandes avec des absorptions spécifiques associées au squelette peptidique. La structure secondaire de l'extrait actif F9 est déterminée à partir de la bande amide qui se situe entre 1700 et 1600 cm^{-1} (Figure 9 (A)).

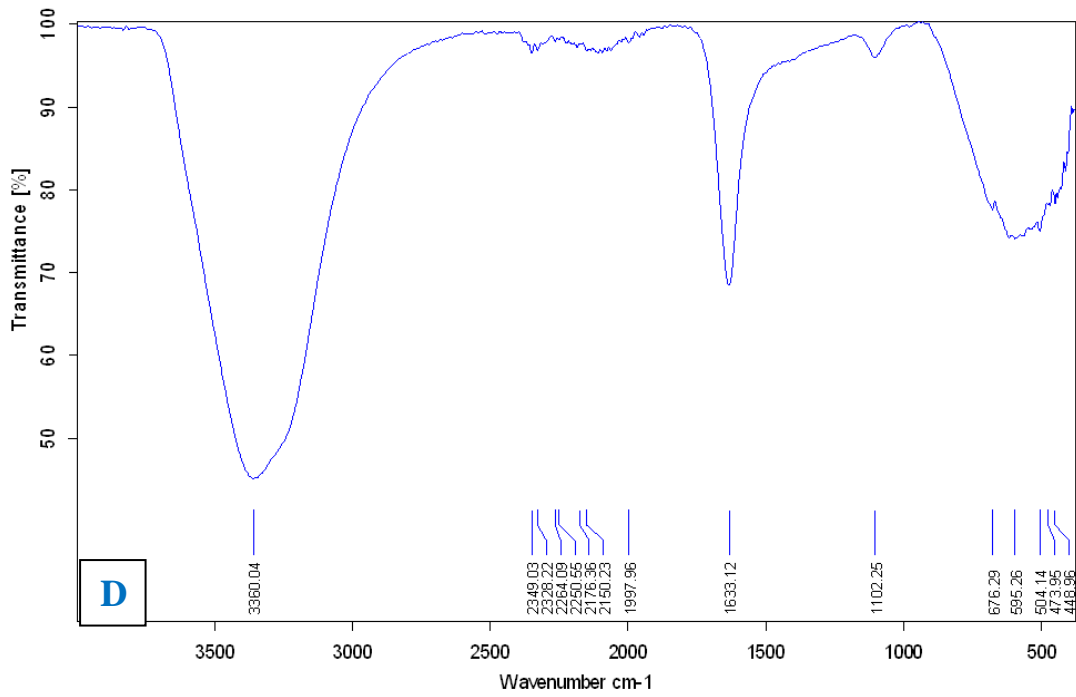
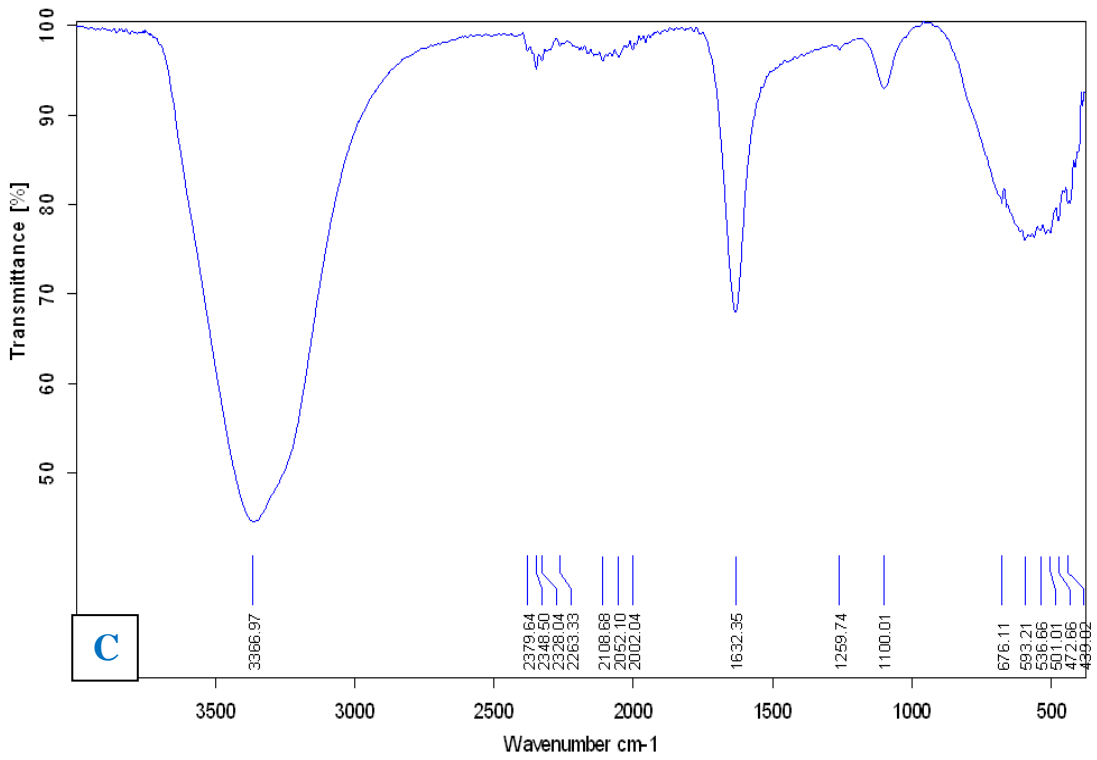
Notre étude se fait sur la bande amide qui est la bande la plus intense et donc la plus étudiée. Elle est composée à 80% de la vibration d'élongation de la liaison C=O issue de la liaison peptidique avec également une contribution de la vibration de la liaison C-N, qui augmente la hauteur des bandes. Cette bande se situe entre 1700 et 1600 cm^{-1} . Elle indique clairement la structure secondaire de la protéine à cause de sa sensibilité aux liaisons Hydrogènes, à l'interaction dipôle-dipôle et la géométrie sur squelette peptidique (**Bandekar, 1992 ; Krimm et al., 1986**)

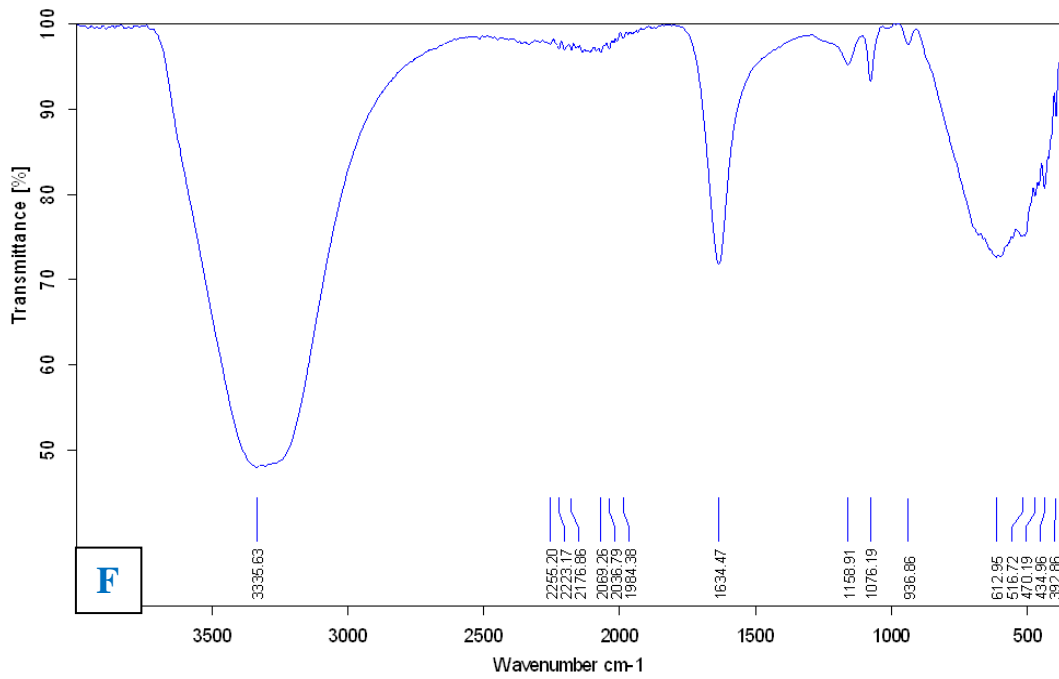
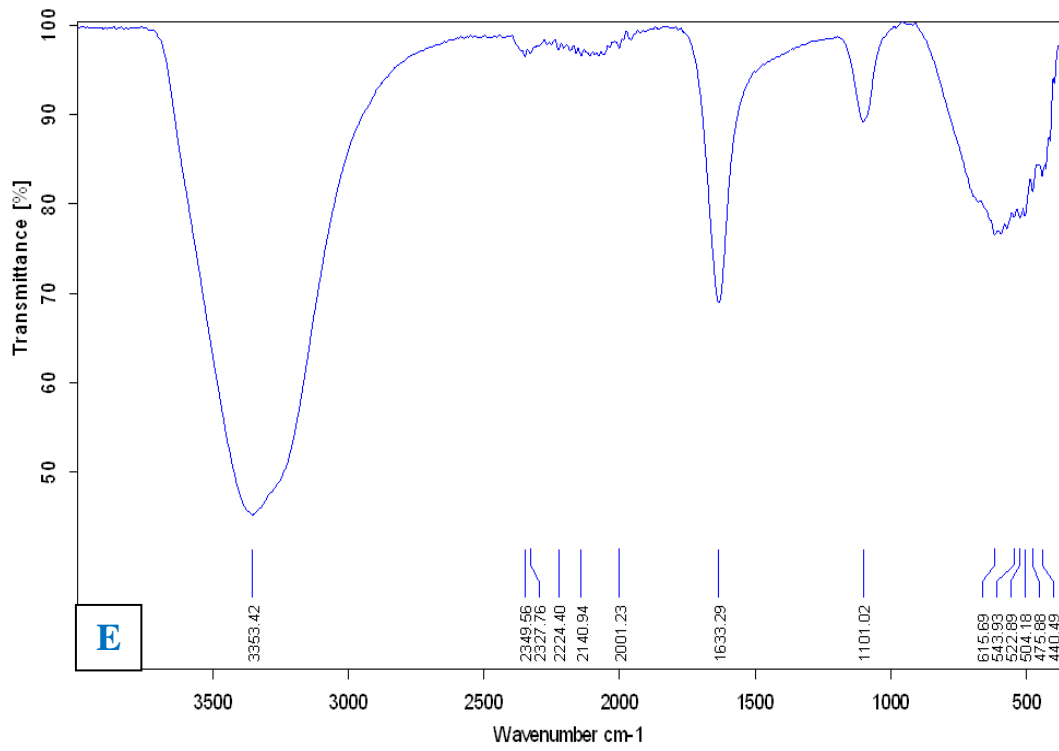
Ainsi, la forme et l'intensité sont directement reliées à la structure secondaire de la protéine. Elle est donc utilisée pour étudier sa structure secondaire.

Les spectres B et C proviennent du surnageant et de l'extrait protéique de la souche S8 ainsi que le pigment membranaire (spectre G). Les trois montrent la présence de groupement amide dans la zone 1700 et 1600 cm^{-1} (Figure 9). Le double différentiel montre la contribution de plusieurs bandes dans la région amide issue du squelette peptidique. Il est clair que le changement de pH affecte la structure secondaire de la protéine et le changement de potentiel implique un changement de conformation. En revanche, une partie du spectre G (dans la zone 1400 - 1200 cm^{-1}) de pigment membranaire de la souche archée halophile est très difficile à analyser compte tenu du nombre de bandes observées et, caractéristique de la molécule.

Pour les extraits actifs provenant de la souche S1, montrent la présence de groupement amide (Figure 9 D, E et F) dans la même zone correspondant au groupement amide.







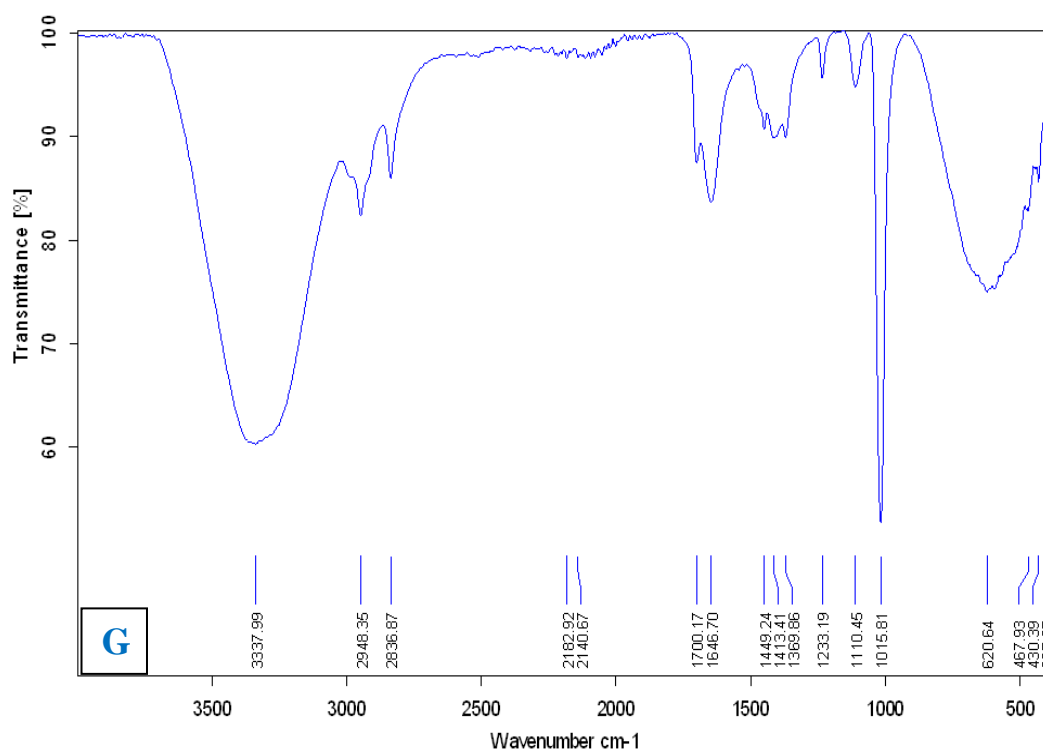


Figure 9. Spectre différentielle infrarouge dans la région spectrale comprise entre 3500 et 500 cm^{-1} de A : Fraction F6 ; B : Extrait protéique du surnageant EP8 ; C : Surnageant S8 ; D : Extrait protéique des cellules Br 2% ; E : Extrait protéique de surnageant Br 2% ; F : Extrait protéique EPcelluleS1 ; G : Métabolites de la souche DSMZ sur MH

II.3.2. Identification des extraits protéique par la chromatographie en phase liquide couplée à la spectromètre de masse LC/MS

Calcul de la masse

L'ionisation de type electrospray est caractérisée par la formation d'ions multichargés. Les ions sont déjà présents en solution sous forme d'anions ou de cations. En mode positif, les charges sont apportées par des protons H^+ ou par des cations Na^+ , K^+ , NH_4^+ , le plus souvent issus du solvant. Dans le cas de l'analyse des peptides, on considère que les charges positives sont issues de la protonation du groupement NH_2 terminal et des résidus basiques (lysine, arginine et histidine) ou de la neutralisation des charges négatives. Les charges négatives dans le cas des analyses en mode négatif sont liées à la déprotonation des résidus acides (acide aspartique, acide glutamique) et du groupement COOH terminal ou à des contre-ions (**Loo et al., 1988**).

Afin de pouvoir obtenir une séparation optimale avec une durée d'analyse plus courte, nous avons fait appel à un gradient d'élution. En ayant toujours en vue un couplage possible de notre système chromatographique avec la SM, le débit que nous avons retenu pour la mise au point du gradient est un compromis (0,8 ml/min), ceci afin de limiter les quantités de composés perdus lors de la division de flux à l'entrée de la source ESI.

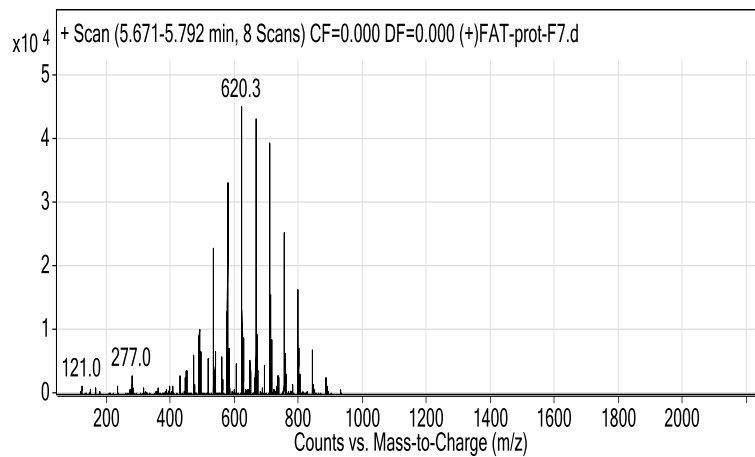
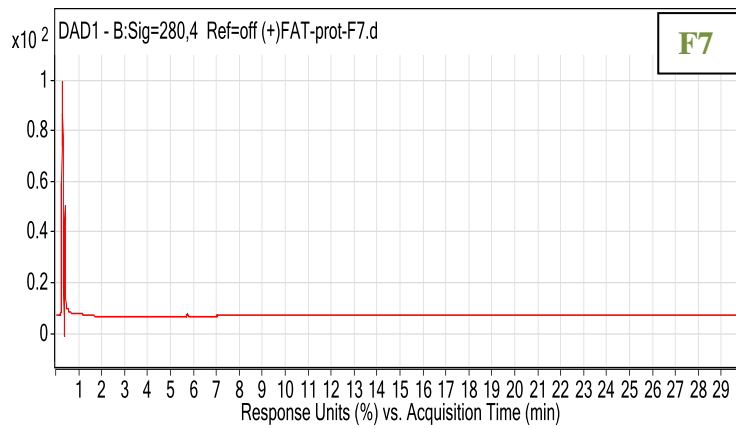
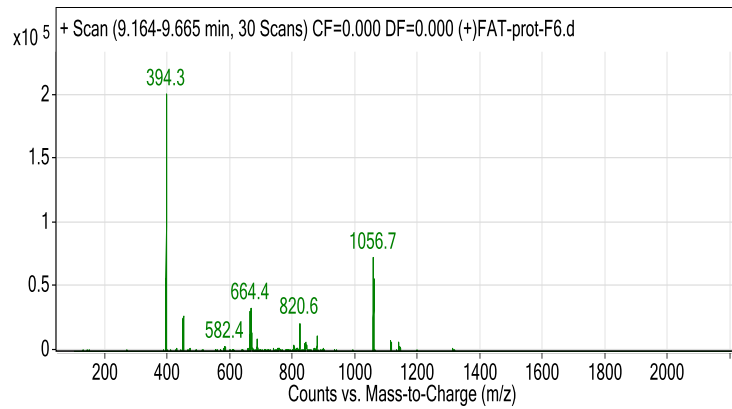
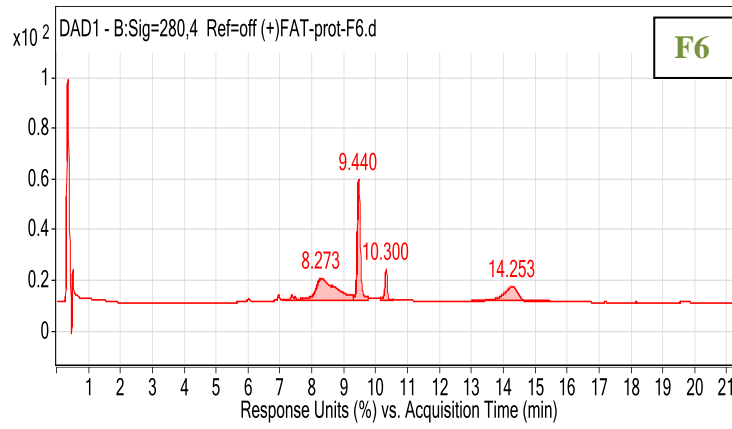
Bien que les résolutions ne soient pas systématiquement supérieures à 0.8, ceci ne représente pas d'inconvénients pour une identification des composés en spectrométrie de masse. La quantification de tous les composés ne sera précise qu'en SM.

La chromatographie liquide des fractions actives réalisée permet de séparer les protéines. La masse de ces protéines est ensuite déterminée par l'analyse du spectre de masse au temps de rétention correspondant (Figure 10).

Le composé élué au niveau du pic 2 ($m/z = 394$) de la fraction F6 possède une masse molaire de 394 g/mol. Les composés élués au niveau du pics 1 pour les fractions F7, F8 et F9 ont un m/z de 620, soit une masse molaire de 620 g/mol.

La figure 11 présente la séparation optimale que l'on peut obtenir en gradient d'élution sur HPLC des métabolites des archées. Une bonne séparation de la protéine du surnageant Br2% peut être réalisée en 1 min.

De plus, dans ces conditions, le composé de l'extrait protéique cellulaire de la souche 8 ainsi que son surnageant Br2% élué à 1.27 min et 0.9 min respectivement représente 8% des protéines totaux. En revanche, l'extrait protéique Br2% ainsi que le pigment membranaire ont donné un pic déformé, très large et confondu dans la dérive de la ligne de base.



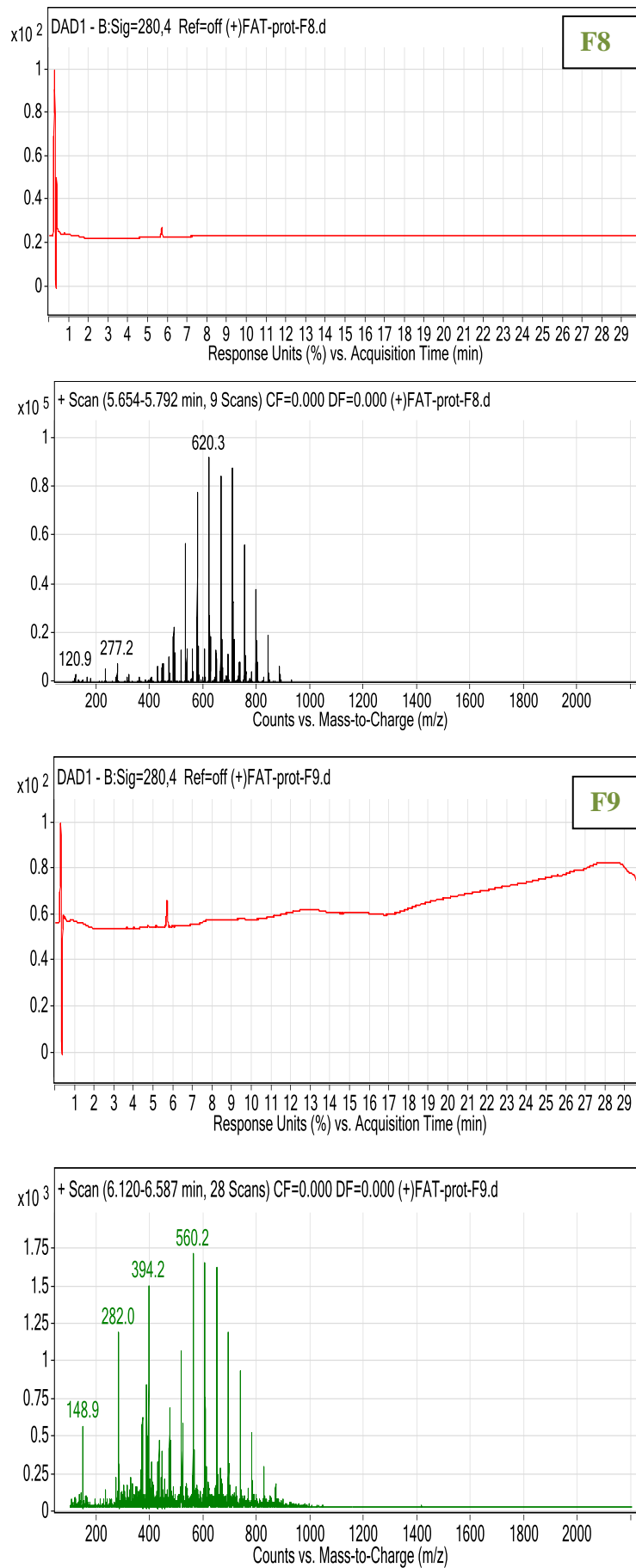
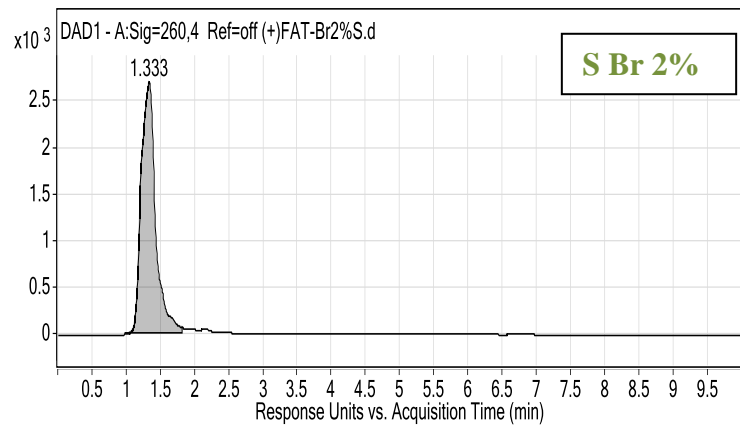
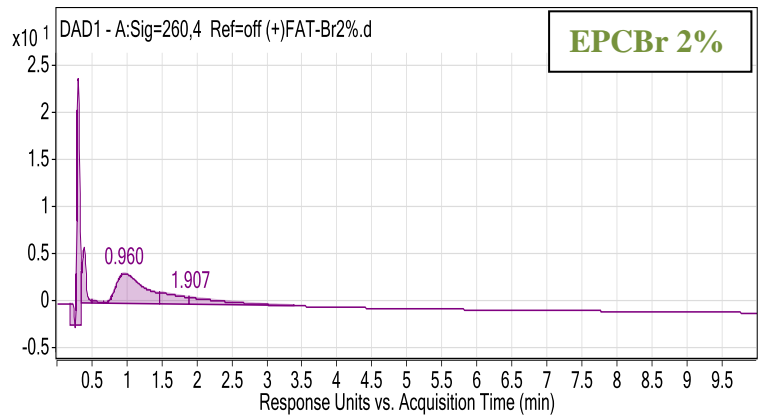
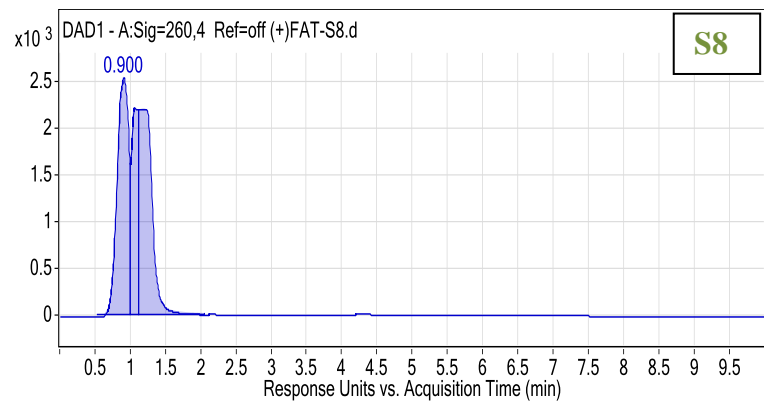
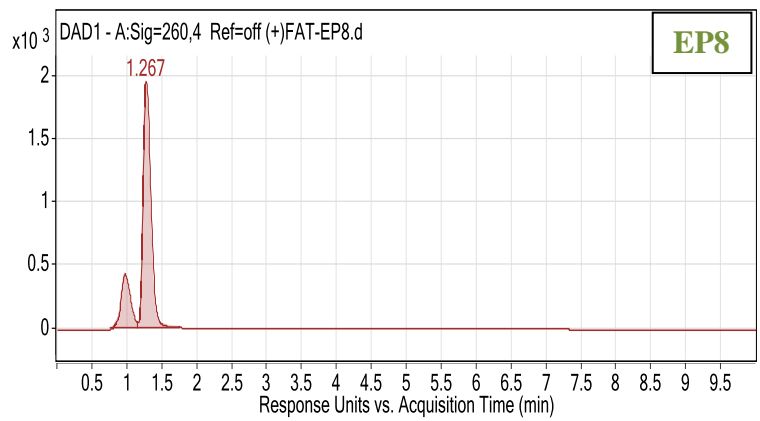


Figure 10. Chromatogramme et spectre de masse des fractions purifiées



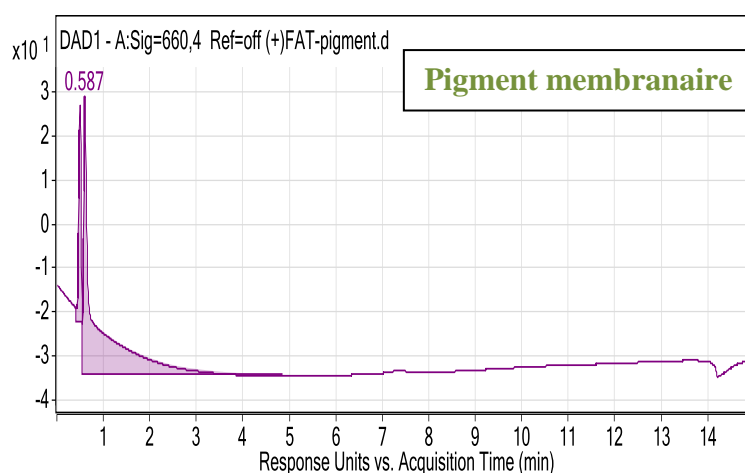


Figure 11. Chromatogramme des surnageants et des extraits protéiques

Un fort pourcentage de modificateur organique (plus de 60% d'ACN) dans la phase mobile est nécessaire pour son élution.

Les chromatogrammes mettent en évidence, qu'une augmentation du pourcentage d'ACN dans la phase mobile se traduit, comme attendu, par une augmentation de temps de rétention des surnageants (Br2%S8), les extraits protéiques (EP8,EPCBr2%) ainsi que le pigment membranaire. Vu les différences très importantes entre les temps de rétention des premiers composés élués et ceux élués en dernier (EP8, S8 et EPBr2%), un gradient d'ACN peut être envisagé pour séparer un maximum de composés tout en maintenant un temps d'analyse raisonnable

La spectrométrie de masse MS reste encore efficace pour identifier une protéine unique, ou des mélanges contenant peu de protéines. En revanche, cette méthode montre ses limites lorsqu'il s'agit d'identifier les protéines de mélanges plus complexes (aussi appelé "shotgun"), ou lorsque des modifications sont présentes dans les protéines analysées.

Dans la spectrométrie de masse, un pic significatif représente nécessairement le m/z d'un peptide.

L'objectif de notre travail était d'extraire, de purifier et de caractériser quelques métabolites de souches d'archées halophiles locales.

Dans un premier temps, l'extraction des protéines totales à partir du surnageant de culture est meilleure en utilisant la méthode d'extraction acide et à froid.

L'élution à travers le gel Séphadex G50 de l'extrait protéique S15 permet d'obtenir une série de fractions actives, ce qui implique que la souche produit au moins une substance à activité antibiotique.

La mise au point de méthodes d'analyse rapides, précises et sensibles pour les métabolites dans les surnageants et les extraits protéiques des souches d'archées halophiles a fait l'objet de ce travail. L'étude fine des spectres par la réflexion totale atténuée a mis en évidence la structure secondaire de la protéine, qui semble être un squelette peptidique. La forme et l'intensité sont directement reliées à sa structure secondaire. Un système avec une détection par spectrométrie de masse a été développé. Pour la séparation chromatographique des composés d'intérêt, une approche a été explorée: la chromatographie liquide à haute performance à détection DAD. De bons résultats, avec des pics bien séparés ont été obtenus sur sa colonne en mode gradient d'élution avec les fractions actives F6, F7, F8 et F9, ce qui implique que c'est une halocine sel indépendante et qui a donné une masse de 394g/mol pour la fraction F6 et de 620 g/mol pour les autres fractions par analyse du spectre de masse au temps de rétention correspondant.

A

Andrawes F. and all. (1984): Gas chromatographic analysis of volatiles in fluid and gas inclusions. *J Chromatogr*, 302 :181–93.

Armstrong, G.A. (1994): Eubacteria show their true colors : genetics of carotenoid pigment biosynthesis from microbes to plants. *J. Bacteriol.* 176, 4795-4802.

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.

Breithaupt, D.E., Wirt, U. and Bamedi, A. (2002): Differentiation between lutein monoester regioisomers and detection of lutein diesters from marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) and several fruits by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 50, 66-70.

Bogomolni R.A. (1977): Light energy conservation processes in halobacterium halobium cells. *Fed Proc*, 36(6) :1833–9.

Brown-Peterson N.J.and all. (1994): Enhanced superoxide production by membrane vesicles from halobacterium halobium in a hyposaline environment. *Biochem Biophys Res Commun*, 205(3) :1736–40.

C

Castenmiller, J.J.M., and West, C.E. (1998): Bioavailability and Bioconversion of Carotenoids. *Annu. Rev. Nutr.* 18, 19–38.

Cazzonelli, C.I., and Pogson, B.J. (2010): Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci.* 15, 266–274.

Cheung, J., Danna, K.J., O'Connor, E.M., Price, L.B., and Shand, R.F. (1997): Isolation, sequence, and expression of the gene encoding halocin H4, a bacteriocin from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei* R4. *J. Bacteriol.* 179, 548-551.

Christian J.H. and Waltho J.A. (1962): Solute concentrations within cells of halophilic and non halophilic bacteria. *Biochim Biophys Acta*, 65 :506–8.

Costenaro L., Zaccai G., and Ebel C. (2002): Link between protein-solvent and weak protein-protein interactions gives insight into halophilic adaptation. *Biochemis- try*, 41 :13245–52.

Courtenay E.S. and all. (2000): Vapor pressure osmometry studies of osmolyte-protein interactions : implications for the action of osmoprotectants in vivo and for the interpretation of "osmotic stress" experiments in vitro. *Biochemistry*, 39(15) :4455– 71.

D

Dassarma S. and all. (2001): Genomic perspective on the photobiology of halobacterium species nrc-1, a phototrophic, phototactic, and uv-tolerant haloarchaeon. *Photosynth Res*, 70(1) : 3–17.

E

Ebert, K., Goebel, W., Rdest, U., and Surek, B. (1986): Genes and genome structures in the archaeobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 7, 30 – 35.

F

Faure, H., Fayol, V., Galabert, C., Grolier, P., Moël, G.L., Steghens, J.-P., Kappel, A.V., and Nabet, F. (1999): Les caroténoïdes : 1. Métabolisme et physiologie. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 57, 169–183.

G

Gonzalo, P., Inmaculada, M., and Ricardo, A. (2002): Purification and biological characterization of halocin H1 from *Haloferox mediterranei* M2a. *Int. Microbiol.* 5, 15-19.

H

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

K

Kavitha, P., Lipton, A.P., Sarika, A.K., and Aishwarya, M.S. (2011): Growth characteristics and halocin production by a new isolate *Haloferox volcanii* KPS1 from Kovalam solar saltern (India). *Res. J. Biol. Sci.* 6, 257-262.

L

Lanyi J.K. (1974): Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriol Rev*, 38(3) :272–90.

Lequerica, J.L., O'Connor, J.E., Such, L., Alberola, A., Meseguer, I., Dolz, M., Torreboanca, M., Moya, A., Colom, F., and Soria, B. (2006): A halocin acting as Na⁺/H⁺ exchange of haloarchaea as a new type of inhibitor in NHE of mammals. *J. Physiol. Biochem.* 62, 253-262.

Li, Y., Xiang, H., Liu, J., Zhou, M., and Tan, H. (2003): Purification and biological characterization of halocin C8, a novel peptide antibiotic from halobacterium strain AS7092. *Extremophiles.* 7(5), 401-407.

Litchfield C.D. (1998): Survival strategies for microorganisms in hypersaline environments and their relevance to life on early mars. *Meteorit Planet Sci*, 33(4) :813–9.

M

Madern D. and all. (1995): Mutation at a single acidic amino acid enhances the halophilic behaviour of malate dehydrogenase from haloarcula marismortui in physiological salts. *Eur J Biochem*, 230(3) :1088–95.

Madern D., Ebel C., and Zaccari G. (2000): Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles*, 4(2) :91–8.

Marwan W. and all. (1995): Mechanism of photosensory adaptation in halobacterium salinarium. *J Mol Biol*, 246(4) :493–9.

Meseguer, I., and Rodríguez, V.F. (1985): Production and purification of halocin H4. *FEMS Microbiol. Lett.* 28(2), 177-182.

Meseguer, I., and Rodríguez, V.F. (1986): Effect of halocin H4 on cells of *Halobacterium halobium*. *J. Gen. Microbiol.* 132, 3061-3068.

Meseguer, I., Torreblanca, M., and Konishi, T. (1995): Specific inhibition of the halobacterial Na⁺/H⁺ antiporter by halocin H6. *J. Biol. Chem.* 270(12), 6450-6455.

N

Norton C.F. and Grant W.D. (1988): Survival of halobacteria within fluid inclusions in salt crystals. *Microbiology*, 134(5) :1365–73.

O

O'Connor, E.M., and Shand, R.F. (2002): Halocins and sulfolobocins: The emerging story of archaeal protein and peptide antibiotics. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 28, 23-31.

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. (2006): The order Halobacteriales. 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. 3, pp 113-64.

Oren A. (2008): Microbial life at high salt concentrations : phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems*, 4 :2.

P

Pasic, L., Velikonja, B.H., and Ulrih, N.P. (2008): Optimization of the culture conditions for the production of a bacteriocin from halophilic archaeon Sech7a. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 38(3), 229-245.

Platas, G. (1995): Caracterización de la actividad antimicrobiana de la haloarquea *Haloferax mediterranei* Xia3. Madrid, Spain: Universidad Autonoma de Madrid. pp. Doctoral Thesis.

Platas, G., Meseguer, I., and Amils, R. (2002): Purification and biological characterization of halocin H1 from *Haloferax mediterranei* M2a. *Int. Microbiol.* 5, 15-19.

Price, L.B., and Shand, R.F. (2000): Halocin S8: a 36-amino-acid microhalocin from the haloarchaeal strain S8a. *J. Bacteriol.* 182, 4951-4958.

R

Rdest, U., and Sturm, M. (1987): Bacteriocins from halobacteria. In *Protein Purification: Macro To Micro*, New York: Alan R. Liss. 271-278.

Rodriguez-Valera, F., Juez, G., and Kushner, D. (1982): Halocins: salt-dependent bacteriocins produced by extremely halophilic rods. *Can. J. Microbiol.* 28, 151–154.

S

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 hyper saline environments. CRC Press, Boca Raton. 295-306.

Shand, R.F. (2006): Detection, quantification and purification of halocins:peptide antibiotics from haloarchaeal extremophiles. In *Extremophiles- methods in microbiology*. Rainey, F.A., and Oren, A. eds. Amsterdam: Elsevier / Academic Press. 35, 703-718.

Shand, R.F., and Leyva K.J. (2007): Peptide and protein antibiotics from the domain archaea: halocins and sulfobiocins. In Riley, M.A., and Chavan, M.A. eds. *Bacteriocins: ecology and evolution*. Springer, New York. 93-109.

Shand, R.F., and Leyva, K.J. (2008): Archaeal antimicrobials: an undiscovered country. In Blum,P. ed. *Archaea: new models for prokaryotic biology*. Caister Academic Press, Norfolk, U.K.. 233–243.

Sun, C., Li, Y., Mei, S., Lu, Q., Zhou, L., and Xiang, H. (2005): A single gene directs both production and immunity of halocin C8 in a haloarchaeal strain AS7092. *Mol. Microbiol.* 57, 537-49.

T

Tamar, K.P., and Aharon, O. (2000): Halocins: are they involved in the competition between halobacteria in saltern ponds? *Extremophiles.* 4, 35-41.

Torreblanca, M., Rodríguez-Valera, F., Juez, G., Ventosa, A., Kamekura, M., and Kates, M. (1986): Classification of non-alkaliphilic halobacteria based on numerical taxonomy and polar lipid composition, and description of *Haloarcula* gen. nov and *Haloferax* gen. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 8, 89-99.

Torreblanca, M., Meseguer, I., and Ventosa, A. (1994): Production of halocin is a practically universal feature of archaeal halophilic rods. *Lett. Appl. Microbiol.* 19, 201-205.

V

Vreeland R.H. and all. (2000): Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature*, 407(6806) :897–900.

Z

Zabner J. and all. (2000): The osmolyte xylitol reduces the salt concentration of airway surface liquid and may enhance bacterial killing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(21) :11614–9.

Composition des milieux de culture utilisés (g/L)**Milieu (MA):**

Pour 1L à pH 7,2

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

Milieu complexe (MC):

Pour 1L à pH 7,2

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

Milieu pour Halobacterium:

Pour 1L à pH 7,2

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

Composition des solutions chimiques

Solution saline:

- | | |
|-----------------|---------|
| ▪ Eau distillée | 1000 ml |
| ▪ NaCl | 180 g |
| ▪ MgSO4 | 10 g |

Tris HCl:

- | | |
|--------|-------|
| ▪ Tris | 10 ml |
| ▪ NaCl | 1.5 g |

pH 6.77