

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

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



Réf :.....

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

**MASTER**

***Thème***

**Extraction et Caractérisation  
D'antibiotiques produits par des souches  
D'Haloarchaea**

Présenté par  
**ATMANIOU Fawzia et BERKANE Isemahane**

Soutenu le : 16 Juin 2016

Devant le jury composé de :

M<sup>r</sup> BOUKEROUI A.

MCA

Président

M<sup>me</sup> IDRESS N.

MAA

Promotrice

M<sup>me</sup> BELHAMICHE N.

MAA

Examinatrice

Année universitaire : 2015 / 2016

*Louange à ALLAH qui nous a donné l'esprit, la volonté,  
Le courage et le savoir de mener à terme ce travail  
Et pour sa bienveillance.*

*Notre profonde gratitude va à notre promotrice Mme IDRES, pour  
l'honneur qu'elle nous a fait de nous encadrer, pour ses précieux conseils, ses  
orientations et la confiance qu'elle a mis en nous, dont nous garderons les  
souvenirs de ses qualités profondément humaines.*

*On tient également à exprimer nos sincères remerciements à*

*Mr Boukeroui qui nous avait fait un grand honneur d'avoir accepté de  
présider le jury et de juger notre travail*

*Mme Belhamiche d'avoir accepté d'examiner et d'évaluer ce modeste  
travail.*

*L'ensemble du personnel de laboratoire de Génie Biologique pour avoir été  
disponible.*

*A Tous ceux et celles qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de  
ce travail, qu'ils trouvent ici l'expression de notre haute considération.*

*Merci*



## *Dédicace*

*Je dédie ce travail à*

*Ceux que j'ai tant aimé avec beaucoup d'affection et je suis très reconnaissante de les avoir et tout les mots du monde ne peuvent exprimer l'ameur et le respect que je leur porte :*

*« MES très chère parents à qui je doit toute ma vie car ils m'ont tout donné pour faire de moi ce que je suis, mes parent qui sont mes pilier et sans eux rien n'a de la valeur. »*

*Mes sœurs, mes frères.*

*Mes oncles et mes tantes.*

*Mes cousins et coisines.*

*Mes amis et Toute la PROMOTION de MICROBIOLOGIE, ainsi qu'à celle biotechnologie microbienne*

*Et en fin, à celle avec qui j'ai partagé ce travail Isemahane et toute sa famille.*



*Fawzia*





## *Dédicace*

*Je dédie ce travail à*

*Ceux que j'ai tant aimé avec beaucoup d'affection et je suis très reconnaissante de les avoir et tout les mots du monde ne peuvent exprimer l'ameur et le respect que je leur porte :*

*« MES très chère parents à qui je doit toute ma vie car ils m'ont tout donné pour faire de moi ce que je suis, mes parent qui sont mes pilier et sans eux rien n'a de la valeur. »*

*Mon mari : « zohir » qui a fait beaucoup de sacrifices pour moi.*

*Mes sœurs, mes frères.*

*Mes beaux parents et Mes beau frères.*

*Mes amis et Toute la PROMOTION de MICROBIOLOGIE, ainsi qu'à celle biotechnologie microbienne*

*Et en fin, à celle avec qui j'ai partagé ce travail fawzia et toute sa famille.*



*Ismahane*

## Liste des Abréviations

- **DO** : densité optique.
- **M Br** : Milieu Brown.
- **MC** : Milieu complexe
- **MH** : Milieu *Halobacterium*
- **UFC** : unité formant colonie
- **Nm** : nanomètre
- **UA** : unité arbitraire
- **ZI** : zone d'inhibition
- **SC** : surnageant
- **SS** : solution saline
- **SC<sub>E</sub>** : surnageant extrait
- **BSA** : Albumine sérum bovin
- **EP** : extrait protéique
- **SDS** : dodécyle sulfate de sodium
- **t** : témoin
- **Hbt** : *Halobacterium*
- **Hfx** : *Haloferax*
- **ADN** : Acide **D**éoxyribo Nucléique
- **DSMZ** : **D**eutsche **S**ammlung von **M**ikroorganismen and **Z**ellkulturen

# Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction .....	01
Chapitre I : Synthèse bibliographique	
Les Halophiles	
1. Généralité .....	02
2. Intérêt des halophiles .....	02
Les Haloarchaea	
1. Définition .....	03
2. Classification .....	03
3. Les Caractères des Haloarchaea .....	03
4. Mécanismes d'adaptation .....	04
5. Intérêt biotechnologique .....	04
Les Bactériocine	
1. Historique .....	05
2. Définition.....	05
3. Classification .....	05
4. Mode d'action .....	06
5. Spectre d'action.....	06
6. Intérêt biotechnologique .....	06
Les HALOCINES	
1. Histoire.....	07
2. Définition.....	07
3. Classification.....	07
4. Production des halocines .....	07
5. Caractéristiques de quelques halocines .....	08
6. Mode d'action .....	09
7. Spectre d'action.....	09
8. Intérêt biotechnologique .....	10
Chapitre II : Matériel et Méthodes	
I. matériel.....	11
I. 1 Matériel biologique.....	11
I.1.1 Germes producteurs.....	11
I.1.2 Germes cibles .....	12
I.1.3 Réactifs et appareillage.....	12
I.1.4 Milieux de culture.....	12
II. Méthodes	
II.1 Culture des souches d'haloarchées en milieu liquide.....	12
II .2 Mise en évidence de l'activité antibiotique produite par les souches d'haloarchées.....	13

# Sommaire

II. 3. Extraction des protéines totales.....	13
II.4 Caractérisation des antibiotiques produits par les souches S1 et S15.....	16
II.4.1 Détermination du titre de l'extrait protéique .....	16
II.4.2 Effet de quelques facteurs physico-chimique sur l'activité antibiotique.....	16
II.4.2.1 Effet de la température.....	16
II.4.2.2 Effet du pH.....	16
II.4.2.3 Effet des enzymes.....	16
II.4.2.4 Effet des solvants.....	16
II.4.2.5 Effet de la salinité sur l'activité antibiotique.....	17
II.4.2.6 Effet de l'extrait protéique sur quelques souches bactériennes.....	17
III. Caractérisation Biologique des antibiotiques produits par les souches S1 et S15 en milieu liquide .....	17
III.1 Effet des extraits protéiques sur Halobacterium salinarum .....	17
III.2 Effet des surnageants de S1 et S15 sur la souche S3 .....	17
IV. Dosage des protéines dans les extraits actifs.....	18
Chapitre III : Résultats et discussion	
I. Extraction des protéines totales .....	19
I.1. Effet du pH sur l'extraction des protéines totales .....	19
I.2 Effet du NaCl sur l'activité antibiotique de l'extrait protéique de S15.....	19
I.3. Extraction acide et à froid d'autres cultures halophiles .....	20
I.3.1. Extraction à partir du surnageant de culture.....	20
I.3.2. Extraction à partir des cellules.....	23
II. Caractérisation des extraits protéiques actifs des souches S1 et S15.....	24
II.1. Détermination du titre d'un extrait actif .....	24
II.2 Effet de certains facteurs physico-chimiques et enzymatique sur l'activité antibiotique.....	26
II.2.1. Traitement thermique .....	26
II.2.2. Effet du pH .....	26
II.2.3. Effet de quelques solvants organiques et surfactants sur l'extrait protéine de S15.....	27
II.2.4. Action des extraits protéiques actifs de S1 et S15 sur quelques souches bactériennes.....	29
III. Caractérisation Biologique des antibiotiques produits par les souches S1 et S15 en milieu liquide.....	30
III.1. Effet des extraits protéiques sur la croissance de H. salinarum .....	30
III.2 Effet des extraits protéiques sur la culture H. salinarum en fin de phase exponentielle.....	32
III.3 Effet des surnageants actifs de S1 et S15 sur les cellules de S3 en croissance.....	35
VI. quantification les protéines par la méthode de Bradford .....	37
Conclusion	
Références bibliographiques	
Annexes	

## Liste des figures

figure	Titre de la figure	page
1	L'arbre phylogénétique universel de la vie (Oren, 2008)	1
2	Protocole d'extraction acide et à froid des protéines totales du surnageant de culture	15
3	Protocole d'extraction des protéines membranaires (Yang <i>et al.</i> 1992)	16
4	Activité sur <i>H. salinarum</i> DSMZ3754 des extraits protéiques à différents pH	20
5	: Activité sur <i>H. salinarum</i> DSMZ3754 des extraits protéiques à différents concentration de sel	21
6	Activité d'EP S15 sur <i>Halobacterium salinarum</i> DSMZ3754	22
7	photographie de deux essais de titre de souche S15	27
8	Effet du pH sur l'activité antibiotique du Surnageant de la souche S1	27
9	Effet du pH sur l'activité antibiotique d'extrait protéique S15.	28
10	Effet de l'extrait protéique S15 sur SARM	30
11	Croissance de <i>Halobacterium salinarum</i> DSMZ3754 en présence de 20, 30 et 50µl de l'extrait protéique S15	31
12	coloration de gram de <i>Halobacterium salinarum</i> DSMZ3754	32
13	effet de 20µl de EP actif de la souche S15 sur la biomasse de <i>Halobacterium salinarum</i> DSMZ3754 en fonction du temps	33
14	coloration de gram de <i>Halobacterium salinarum</i> DSMZ3754	34
15	courbe de l'absorbance de la souche S3 en croissance après l'ajout des surnageant de S1et S15 en fonction du temps	35
16	coloration de Gram de la souche S3 A : témoin, B : S3+SC S15, C : S3 + SC 1	36
17	courbe d'étalonnage de BSA	37



## Liste des figures

<b>figure</b>	<b>Titre de la figure</b>
18	Photographie des zones d'inhibitions totales obtenues après extraction des protéines à différents pH
19	Photographie de l'activité de l'extrait protéique S15 sur <i>H. salinarum</i> DSMZ3754 récupéré dans différents tampon de pH
20	Photographie de l'effet de EP S15 sur la croissance de <i>Halobacterium salinarum</i>
21	Photographie de l'activité sur <i>H. salinarum</i> DSMZ3754 des extraits protéiques à différents pH

**Figure en Annexe III**

## List des tableaux

tableau	Titre du tableau	page
I	Echantillons utilisés pour l'isolement des halophiles extrêmes	12 et 13
II	Gamme de concentration de BSA utilisée	19
III	activité antibiotique des EP des souches d'haloarchées sur différents milieux	23
IV	activité antibiotique résiduelle dans les surnageants (SC <sub>E</sub> ) après extraction acide	24
V	activité antibiotique des Extraits protéiques de la surface cellulaire de souches d'haloarchées	25
VI	La dilution d'extinction de l'activité antibiotique des EPS15	26
VII	Effet de la température sur les substances actives des souches S1, S15	27
VIII	: Effet de quelques solvants organique et surfactants sur l'extrait protéine de la souche S15	29
IX	effet de quelques enzymes sur les substances actives de S1 et S15	29
X	Effet des extraits protéique de S1 et S1 sur quelques souches bactériennes	30
XI	DO <sub>595nm</sub> de l'absorbance des EP de la souche S15	37

## Tableau en Annexe

tableau	Titre du tableau
XII	Effet des Ph sur la substance antibiotique
XIII	Effet de EP S15 sur la croissance de <i>Halobacterium salinarum</i>
XIV	Activité antibiotique résiduelle dans les surnageants (SC <sub>E</sub> ) après extraction acide
XV	Activité antibiotique des Extraits protéiques de la surface cellulaire de souches d'haloarchées
XVI	Mesure de l'absorbance des différentes solutions de BSA dilués avec SS

# Introduction

Les Haloarchaea sont des micro-organismes qui se développent dans les environnements hypersalins de 1.5 M à la saturation en NaCl. Ils sont considérés comme un réservoir pour plusieurs biomolécules d'intérêt industriel, tels que les enzymes, les exopolysaccharides, les bacteriorhodopsines, les enzymes hydrolytiques, polyhydroxyalkanoates (PHAs).

Les bactériocines sont des substances de nature protéique ou polypeptidique produit par les bactéries possédant une activité antibiotique à l'encontre de souches étroitement apparentées. Ils peuvent être utilisés comme conservateurs naturels dans l'industrie alimentaire (Zacharof et Lovitt, 2012). Les halophiles extrêmes sont caractérisés par la synthèse de molécules semblables appelées halocines, qui sont libérées dans l'environnement et provoquent la mort cellulaire (O'Connor et Shand, 2002). L'utilisation abusive des antibiotiques et l'émergence de bactéries naturellement ou ayant acquis des mécanismes de résistantes (Zahar, 2015) font que la recherche de nouvelles molécules s'impose. Les halocines représentent de nouvelles substances bioactives pouvant aboutir à de nouvelles molécules plus efficaces et moins néfastes, appliquées aussi bien en industries alimentaires (conservateurs naturelles) ou en industries pharmaceutiques dans le traitement des maladies infectieuses.

Ce travail de recherche s'est déroulé au Laboratoire de Génie Biologique du Département de Microbiologie, notre objectif est l'extraction et la caractérisation d'antibiotiques produits par des souches d'haloarchées.

Notre travail est réparti en deux parties :

-Une partie bibliographique qui comporte trois volets : haloarchaea, bactériocines et le troisième consacré aux halocines.

-Dans la partie pratique, nous avons abordé deux aspects :

Le premier c'est l'extraction en milieu hypersalins des antibiotiques produits par quelques souches d'haloarchées

Le deuxième aspect, la caractérisation physico-chimique et biologique de ces substances actives.

## 1. Généralité

Les micro-organismes halophiles et halotolérants existent dans tous les trois domaines de la vie : Archaea, Bacteria et Eucarya (figure 1). Les halophile extrêmes s'épanouissent dans les environnements hypersalins car ils exigent plus de 0.2 M de NaCl pour leur croissance et peuvent résister aux effets de stress osmotique. Pour se développer dans ces environnements extrêmes, caractérisés par la faible activité de l'eau, la variation de la température et de hauts niveaux d'irradiation de la lumière solaire, ils ont évolué pour produire des enzymes et métabolites capables de s'adapter à ces conditions sévères (Oren, 2008 ; Litchfield, 2011).

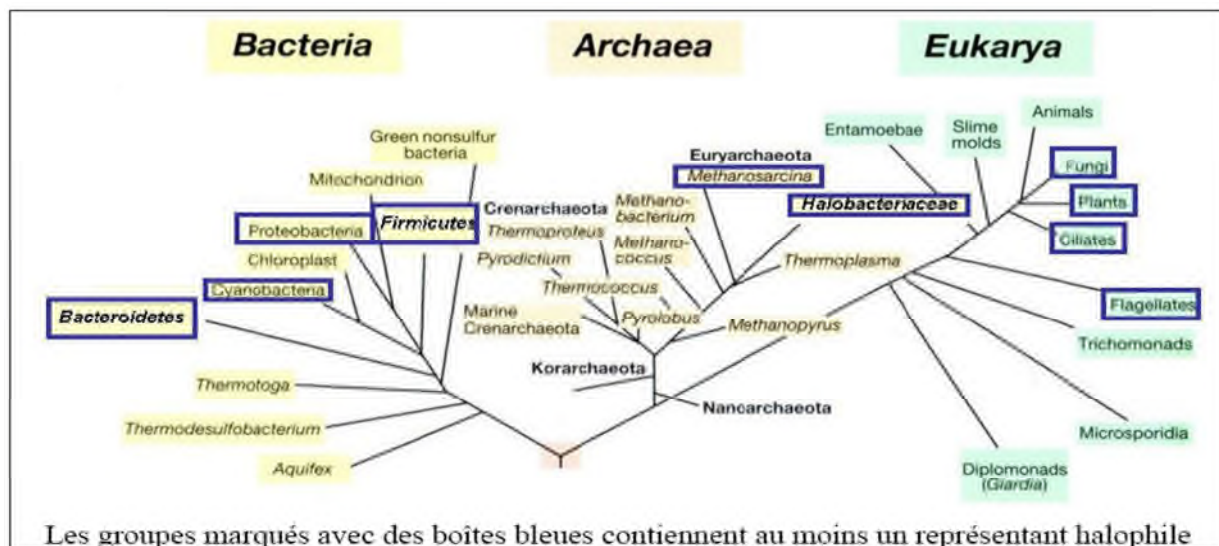


Figure 1 : L'arbre phylogénétique universel de la vie (Oren, 2008).

## 2. Intérêt des halophiles

Les halophiles synthétisent plusieurs métabolites tels que les polymères, surfactants, bacteriorhodopsines et halocines. Ces micro-organismes pourraient être utilisés comme une source de ces métabolites, des solutés compatibles et autres composés de valeur industrielle. Dans les dernières deux décennies, il y a eu beaucoup de rapports sur la biodégradation d'hydrocarbures dans les environnements à forte salinité (Oren, 2010).

## 1. Définition

Haloarchaea appartiennent à la famille Halobacteriaceae du domaine Archaea. Beaucoup d'archaea halophiles extrêmes sont isolés dans les environnements hypersalins où la forte salinité est toxique à la plupart des cellules. Ils se développent à des concentrations de NaCl de 1.5-5.0 M, pH alcalin, et température modérée. Actuellement, les haloarchées sont connues pour sécréter des halocines représentant une partie de leur mécanisme de la défense. Ce sont de petits peptides ou protéines inhibant d'autres haloarchaea (Karthikeyan et *al.*, 2013).

## 2. Classification

Les haloarchaea sont classées dans le domaine archaea, règne Euryarchaeota et dans l'ordre haloarchaeal. Ils construisent une famille appelée Halobacteriaceae comprend 47 genres et 165 espèces. Peu de genre ont un grand nombre d'espèce en 2014 (*Halorubrum* : 25 ; *Haloferax* : 12 ; *Haloarcula* : 10) (Oren, 2014).

## 3. Les Caractères des Haloarchaea

La plupart des espèces décrites ont un optimum en NaCl au-dessus de 150 g/l, et aucune croissance n'est obtenue en son absence. La plupart des espèces lyse à des concentrations de sel au-dessous de 100 g/l. Récemment, des espèces pouvant survivre ou même croître à des concentrations de sel au-dessous de 100 g/l ont été isolées. Ils sont aussi trouvés dans des produits salés (poisson salé ou des viandes, fermenté nourritures), dépôts du sel (mines), peaux salées, et sols salins. La plupart des haloarchaea se développent à pH neutre mais quelques espèces sont des haloalkaliphilie, en étant capable de croître optimalement à pH alcalin (Ventosa *al.*, 2014).

Les Haloarchaea sont d'excellents modèles pour l'étude de la biologie moléculaire, dont plusieurs espèces ont été utilisées pour les tels buts dus à leur facilité de manipulation sous conditions de laboratoire : ils se développent dans les moyens complexes (avec le contenu du sel approprié) sous conditions aérobique qui utilisent la procédure standard. Quelques-uns des espèces utilisées pour les telles études incluent *Halobacterium salinarum*, *Haloarcula marismortui*, *Haloferax volcanii*, et plus récemment, l'haloarchaea carré *Haloquadratum walsbyi* (Ventosa *al.*, 2014).



Ils ne sont pas pathogènes, quelques-uns sont plutôt utilisés dans la production traditionnelle d'aliments fermentés pour la consommation humaine (Oren, 2002).

Haloarchaea sont des modèles excellents pour l'étude de la biologie moléculaire et autres traits structurels d'Archaea, aussi bien que leurs mécanismes d'adaptation à des conditions extrêmes de salinité, pH alcalin, et température modérée, et plusieurs espèces ont été utilisées pour les tels buts dû à leur facilité de manipulation sous conditions de laboratoire (Enache et *al.*, 2015).

## 4. Mécanismes d'adaptation

Les Haloarchaea compensent pour la concentration élevée de sel dans l'environnement en accumulant des ions, principalement le KCl à 5 M. Ce sont des habitants normaux d'environnements hypersalins (Ventosa et *al.*, 2014). Des adaptations spéciales sont requises pour les protéines et les enzymes, qui se traduisent par l'augmentation des résidus d'acides aminés acides sur leur surface (Oren, 1999).

## 5. Intérêt biotechnologique

Les haloarchaea présentes une possibilité biotechnologique particulière dû à la capacité de produire des exopolysaccharides, bacteriorhodopsines, la production d'enzymes hydrolytique extracellulaire, polyhydroxyalkanoates (PHAs) comme bioplastiques, ou la production d'halocins (Litchfield, 2011). Ces métabolites fonctionnent bien dans des conditions de salinité élevée, et parfois même à des températures et pH extrêmes, et une tolérance aux solvants organiques, qui rendre ces molécules convenable pour les applications biotechnologiques dans traitement de nourritures, bioremediation de l'environnement et le traitement biosynthétique Ces qualités exceptionnelles ont attiré un grand intérêt dans les recherches scientifiques pour une exploitation biotechnologique putative (Oren, 2010).

## 1. Historique :

La production bactérienne de substances antagonistes aux autres bactéries a été connue depuis 1925, avec la découverte d'antagonisme entre les espèces de *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 nombreux peptides eucaryotes (Eucaryocins) ont été décrits (O'Connor and Shand 2002).

## 2. Définition

Les Bactériocines sont des protéines ou peptides bactériens synthétisés par voie ribosomale, elles ont une activité bactériostatique ou bactéricide contre des bactéries phylogénétiquement apparentées, qui possèdent un mécanisme d'immunité spécifique (O'Sullivan et al., 2013). Elles sont produites par l'ensemble des principales lignées de bactéries et archées et constituent un groupe hétérogène de peptides par rapport à la taille, la structure, le mode d'action, l'activité antimicrobienne, les mécanismes de l'immunité et les récepteurs des cellules cibles (Dobson, et al 2011).

## 3. Classification:

Les bactériocines sont divisés généralement en deux classes :

- La Classe I : lantibiotiques, constituée par un groupe de petits peptides hydrophobes caractérisés par leur teneur en acides aminés peu communs comme les lantionines
- La classe II : Non lantibiotiques, constituée par un groupe de petites bactériocines thermostables avec un poids moléculaire inférieur à 10 kDa
- La classe III : constituée de bactériocines thermolabiles, elle rassemble les molécules de taille supérieure à 10 kDa.
- La classe IV : composée d'un mélange de protéines non définies exigeant des parties lipidiques ou glucidiques pour l'activité (O'Connor and Shand 2002).

## 4. 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).

## 5. Spectre d'action

Les Bactériocines sont actifs contre les bactéries pathogènes apportées par les aliments telles que bactérie à Gram positif comme *Listeria monocytogenes*, *Staphylocoque aureus*, *Bacillus subtilis* et spores de *Clostridium perfringens*. Pour cette raison, ils ont reçu beaucoup d'attention pour une utilisation comme bio-conservateurs naturels. Les bactériocines sont produits habituellement par les bactéries Gram-Positif possèdent peu ou aucune activité contre les pathogènes à Gram Négatif (Klaenhammer 1993).

## 6. Intérêt biotechnologique

Pendant la dernière décennie, les antibiotiques protéiniques ont été largement étudiés pour leur potentiel comme conservateur dans l'industrie alimentaire ou comme agents anti-infectieux, et comme marqueurs génétiques (Zamfir et *al.*, 1999).

Les bactériocines des bactéries lactiques sont d'intérêt particulier pour leurs applications potentielles comme agents naturel de conservation des aliments.

Dans l'industrie alimentaire, les bactériocines telles que la nisine et la pediocine peuvent améliorer la sécurité et la qualité des aliments (O'Sullivan et *al.*, 2013).

Plus récemment, la contribution de la production de bactériocine à l'efficacité de certains probiotiques a été reconnue. Dans l'industrie de la santé, l'usage de bactériocines comme une alternative aux antibiotiques a longtemps été soulevé. En médecine vétérinaire, les bactériocines sont utilisés dans le contrôle de mastites du bétail et comme un additif alimentaire des animaux en vue d'améliorer la santé animale générale (Antón et *al.*, 2008).

## 1. Historique

Le terme “halocine” a été inventé en 1982 par Francisco Rodriguez-Valera qui a supposé que ces substances étaient des bactériocines et par conséquent il a appliqué une même nomenclature (Price et Shand, 2000).

## 2. Définition

Les Halocines sont des peptides ou des protéines antibiotiques produits par plusieurs halophiles extrêmes du domaine Archaea, qui sont excrétés dans l'environnement pour tuer ou inhiber les haloarchaea sensibles qui occupent la même niche. Bien que la production d'halocine soit un caractère pratiquement universel des haloarchées, quelques halocines seulement ont été purifiés et caractérisés au niveau de la protéine, et seulement les gènes pour halocine H4 (halH4) et S8 (halS8) ont été clonés. Le spectre d'action des halocines est variable, il peut viser des organismes éloignés (phylum, genre) ou bien des espèce étroitement apparentées (Imadalou Idres et al., 2013 ; O'Connor et Shand, 2002).

## 3. Classification

Les halocins se distinguent selon leur poids moléculaire, qui varie de 3 à 35 kDa. Les halocines de poids moléculaire supérieur à 10 kDa perdent leurs activités à température au-dessus de 60 °C et/ou concentration du sel au-dessous de 5%. Les plus petites protéines, connues comme microhalocines, sont assez robustes, et la plupart d'entre elles résistent aux pH acide, base et aux solvants organiques. Habituellement, leur activité est non affectée par le dessalage ou l'ébullition (O'Connor et Shand, 2002).

## 4. Production des halocines

Les halocins sont produites habituellement quand les cultures entrent en phase stationnaire. Il a été montré que les transcrits de l'expression des gènes halH4 et halS8 sont présents à de faibles concentrations pendant la phase exponentielle mais, ils atteignent rapidement des niveaux maximaux au cours de la transition entre la phase exponentielle et la phase stationnaire (Price et Shand, 2000).

## 5. Caractéristiques de quelques halocines

### ➤ Halocine S8

L'Halocine S8 est une microhalocine hydrophobe de 36 acides aminés (3.580 Da). Elle est la première microhalocine à être décrite. Elle a un spectre d'activité étroit sur les haloarchaea, inhibant seulement *Hbt. Salinarum* NRC817, *Halobacterium* sp souche GRB et *HFR. Gibonsii*. Elle est particulièrement robuste car elle peut être dessalée, traitée après 1 h à 93°C soumise aux solvants organiques et stockée à 4°C pendant plusieurs mois sans perdre son activité. L'activité HalS8 est due à la présence d'une substance protéique, puisqu'elle est résistante à la trypsine mais sensible à la protéinase K. L'activité maximale de l'halocine a lieu à la phase stationnaire et persiste pendant 80 h (Price 2000).

### ➤ Halocine H6

La HalH6 de *HFR. Gibonssii* a été isolée et décrite pour la première fois par Torreblanca *et al.* (1989). C'est la deuxième halocine à être caractérisée. La production de HalH6 n'est pas affectée par la composition du milieu, et n'est pas inductible par la lumière UV ou l'acridine orange. L'activité de HalH6 est résistante à la trypsine mais sensible à la pronase, démontrant la nature protéique de cette substance. Elle est thermostable. La destruction totale de l'activité est réalisée par stérilisation à l'autoclave (Meseguer, 1994).

### ➤ Halocine H4

L'Halocine H4 de *Hfx. mediterranei* R4 (ATCC 33500) est la première halocine à être étudiée. C'est une protéine antibiotique avec des masses moléculaires calculées de 29.6 kDa (mature) et de 34.9 (pré-protéine). L'activité de l'halocine H4 apparaît pendant que la culture entre en phase stationnaire. La durée de conservation des surnageants concentrés contenant l'halocine H4 est entre 115 et 159 jours à 4°C. Aucune perte d'activité dans des surnageants de culture à 51°C après 24h d'incubation n'a été constatée. Cependant, l'activité est complètement perdue en 24h à 60°C, 4h à 70°C et en moins de 30 minutes à 80°C (Cheung, 1997).



## ➤ Halocine C8

C'est une microhalocine extrêmement stable et hydrophobe avec 76 acides aminés. L'activité de HalC8 accroît rapidement à la transition entre la phase exponentielle et la phase stationnaire. La HalC8 peut être dessalée, congelée, soumise aux solvants organiques et bouillie pendant environ une heure sans perdre son activité. Le gène HalI code l'immunité de la souche productrice en bloquant l'activité de l'halocine HalC8 in vitro. La HalI est localisée sur la membrane cellulaire (O'Connor et Shand, 2002).

## ➤ Halocine H1

Halocine H1 est une protéine de 31 kDa produite par *Hfr mediterranei* Xia3. L'activité de l'halocine H1 apparaît au milieu de la phase exponentielle. Elle est thermolabile au-dessus de 50°C et sel-dépendante, se dénaturant en dessous des concentrations en sels de moins de 10% (w/v). Le spectre d'action de l'halocine H1 est limité aux haloarchées. Son mécanisme d'action consiste en un changement de la perméabilité membranaire (PLATAS *et al.*, 2002).

## 6. Mode d'action

Le mécanisme d'action d'halocine peut impliquer une modification de la perméabilité cellulaire en visant la membrane plasmique, en augmentant la perméabilité, et causer un déséquilibre ionique. En effet, il a été rapporté que l'halocine H6 produite par *Haloferax gibbonsii* inhibe l'antipore Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> des *Haloarchaea* (Price et Shand, 2000).

## 7. Spectre d'action

Le spectre d'activité des halocines varie largement, testés sur d'autres haloarchées, certaines sont à large spectre (H1) et d'autres ont un spectre étroit (H4, H6). Il a été montré que quelques microhalocines (R1, S8, et A4) sont actives contre quelques espèces de *Sulfolobus* ou de *Methanosarcina*, appartenant respectivement à un autre phylum des hyper thermophiles (Crenarchaeota) et un autre groupe (Méthanogène) du même phylum (Euryarchaeota). Ceci suggère que des archées appartenant à différents phylum peuvent partager une cible spécifique commune (O'Connor et Shand, 2002).

### **8. Intérêt biotechnologique**

Les halocines pourraient remplacer les antibiotiques classiques qui engendrent la résistance des micro-organismes infectieux. De nouvelles molécules Bioactives peuvent offrir la possibilité de découvrir des mécanismes nouveaux contre des micro-organismes indésirables et pourraient être appliquées aussi bien en industries alimentaires (conservation des aliments) ou en industries pharmaceutiques dans le traitement des maladies infectieuses (Karthikeyan et *al.*, 2013).

## I. Matériel

### I. 1 Matériel biologique

#### I.1.1 Germes producteurs

Les haloarchées utilisées dans cette étude font partie de la collection de souches du laboratoire de Génie Biologique (Tableau I) certaines d'entre-elles sont caractérisées par la production d'antibiotiques.

Tableau I : les souches d'haloarchaea utilisés.

souches	Source	Année d'isolement	Conditions d'isolement	Genre affilié (Gène ARNr 16S)
S1	Sabkha de Ouargla	1999	37°C, pH7	<i>Haloarcula sp</i>
S2	Sabkha de Ouargla	1999	43°C, pH7	<i>Halorubrum tebenquichens</i>
S3	Sabkha de Ouargla	1999	43°C, pH7	<i>Haloarcula</i>
S4	Sabkha de Ouargla	2010	40°C, pH7	<i>Halorubrum chaoviator</i>
S5	Sabkha de Ouargla	2010	40°C, pH7	<i>Halorubrum ezzemoulens</i>
S6	Sabkha de Ouargla	1999	40°C, pH9	<i>Haloarchée</i>
S7	Saline d'Ichekaben	2003	40°C, pH9	<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 sp</i>
S12	Saline d'oran	2010	40°C, pH7	<i>Haloarcula sp</i>
S13	Saline d'oran	2010	40°C, pH7	<i>Haloarcula sp</i>
S14	Saline d'oran	2010	40°C, pH7	<i>Haloarcula sp</i>
S15	Saline de Batna	2010	40°C, pH7	-
S16	Saline de Batna	2010	40°C, pH7	-

- : non caractériser

## I.1.2 Germes cibles

Afin de mettre en évidence l'activité antimicrobienne, les souches de références *Halobacterium salinarum* DSMZ3754 (MCAM.MNHN, France), *Escherichia coli* (ATCC25292), *Staphylococcus aureus* (ATCC29213), *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline(ATCC103911), *Staphylococcus aureus* non résistant à la méticilline(ATCC2943), et les isolats halophiles S2, S3, S4, S10 (ont été conservées 4°C) sont utilisées comme germes cibles.

## I.1.3 Réactifs et appareillage

Les réactifs et appareillage utilisés dans cette étude sont donnés dans l'annexe I.

## I.1.4 Milieux de culture

Pour la croissance des souches productrices d'antibiotiques, nous avons utilisés les milieux MC, MA, MC1. Pour la mise en évidence de l'activité antimicrobienne nous avons utilisé le milieu MH et MC semi solide. La composition de ces milieux est donnée en annexe II.

## II Méthodes

### II.1 Culture des souches d'haloarchées en milieu liquide

#### II.1.1 Préparation de l'inoculum

Les souches d'haloarchées sont d'abord repiquées sur de milieux solides MC puis incubées à 40°C jusqu'à apparition de colonies. Une colonie a été transférée dans un tube contenant 3ml de MC, celui-ci est incubé dans bain marie à 40°C .avec agitation de 200 rpm pendant 24 à 48 h. Deux à trois repiquages successifs sont réalisés dans les mêmes conditions.

#### II.1.2 Culture en Erlenmeyer

Des Etlens de 250 ml contenant 50 ml de milieu MC, ont été inoculés de 1 % (v/v) de la pré-culture. Ils sont Incubés à 40°C dans bain marie avec agitation de 200 rpm.

### **II .2 Mise en évidence de l'activité antibiotique produite par les souches d'haloarchées**

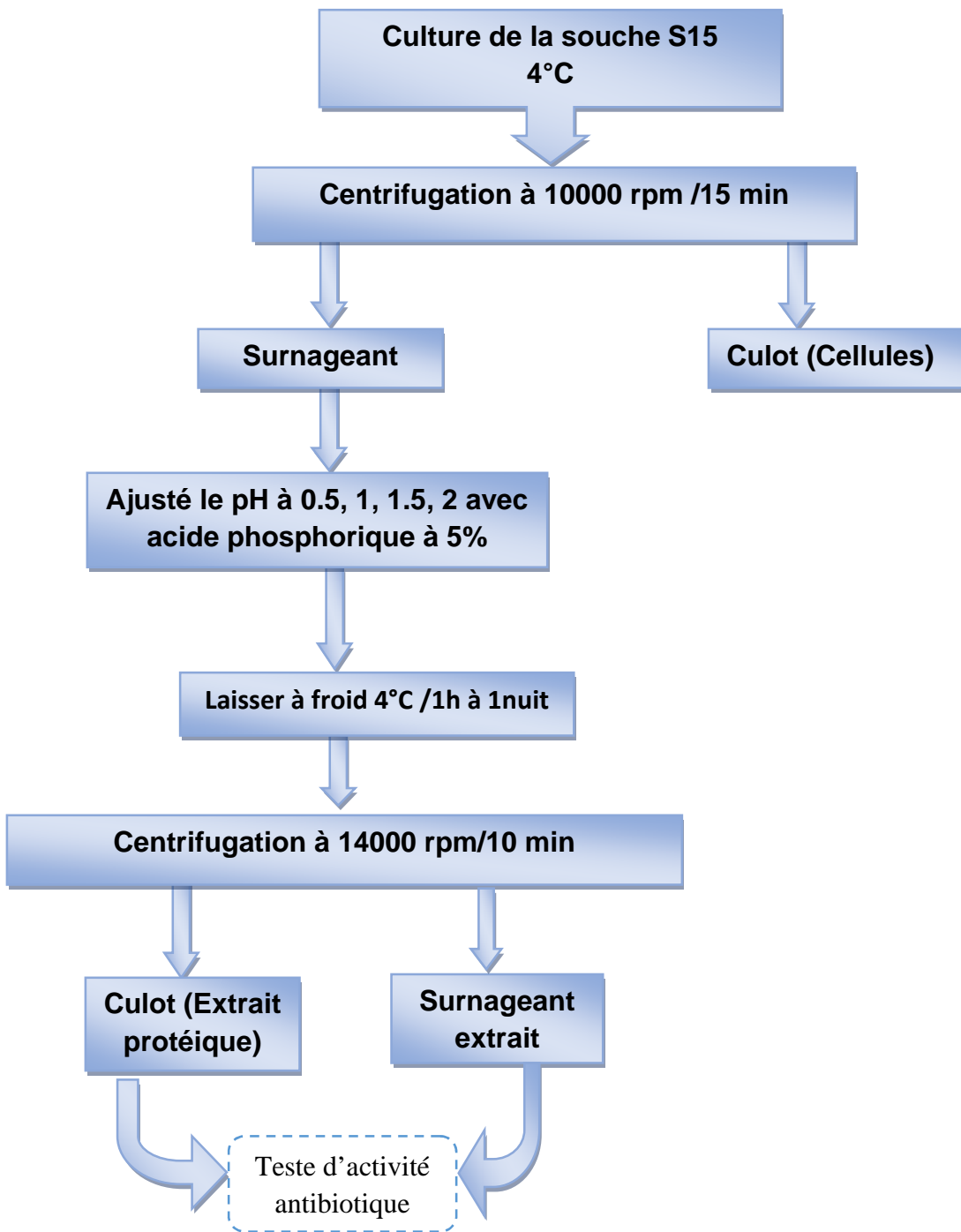
100 µl de l'inoculum sont mélangés à 150 ml d'une gélose MH semi solide en surfusion, après homogénéisation, la gélose est répartie dans des boîtes de Petri contenant une couche fine d'un milieu solide.

5 µl de surnageants ou d'extrait protéique sont déposés à la surface des boîtes. Après incubation jusqu'au développement du germe cible, l'activité antibiotique se manifeste par l'apparition d'une zone claire autour du dépôt.

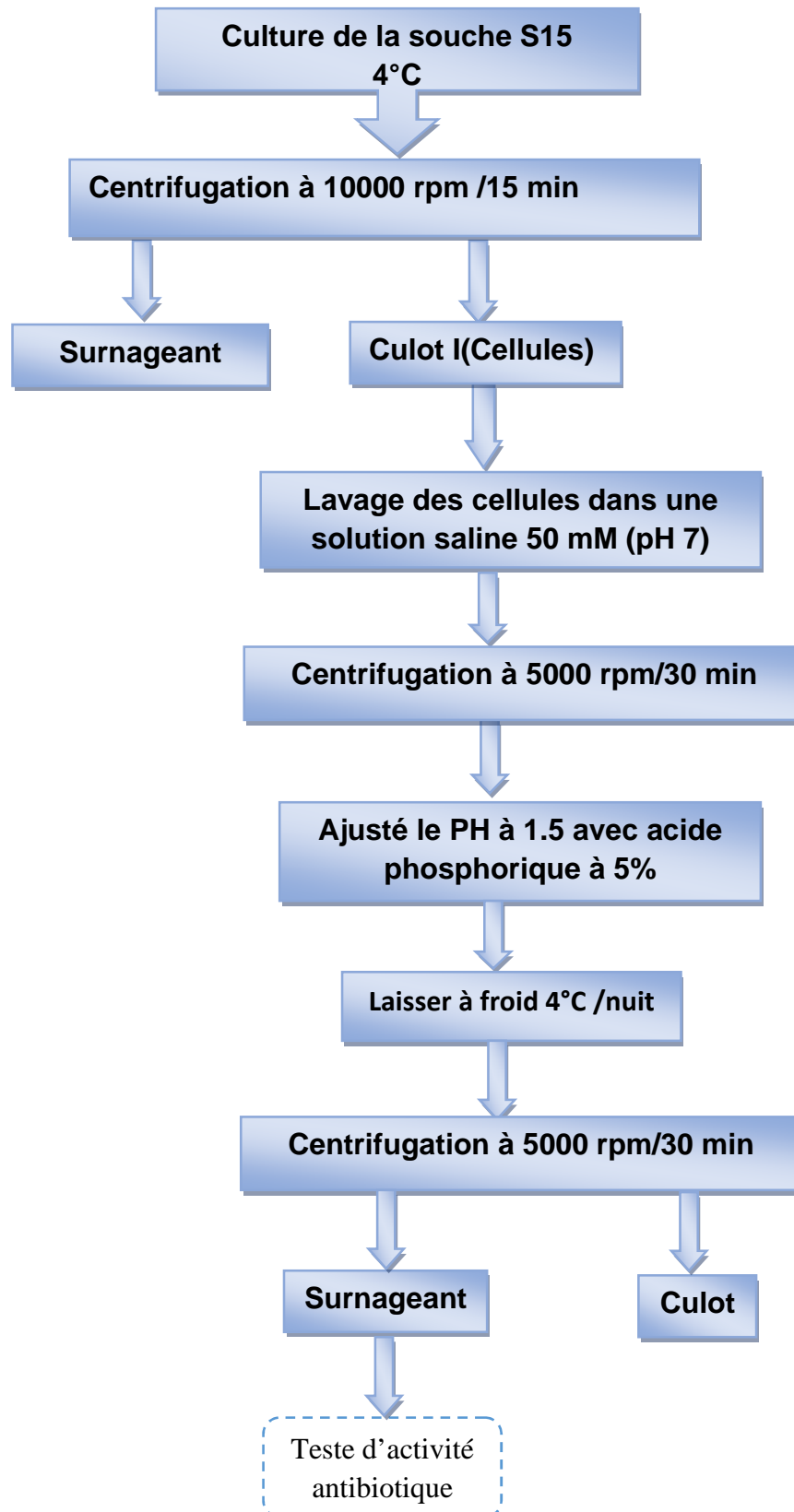
### **II. 3. Extraction des protéines totales**

Les cultures sont centrifugées à 10 000 rpm pendant 15 min, le surnageant et les cellules récupérés ont subi un traitement acide et à froid dans le but d'extraire les protéines totales (Figure 1 et 2).





**Figure 2** : Protocole d'extraction acide et à froid des protéines totales du surnageant de culture.



**Figure 3 :** Protocole d'extraction des protéines membranaires (Yang *et al.* 1992).

## II.4 Caractérisation des antibiotiques produits par les souches S1 et S15

### II.4.1 Détermination du titre de l'extrait protéique

Pour déterminer le titre de l'extrait actif, nous avons réalisé une série des dilutions au 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024 de l'extrait protéique dans une solution saline. La première dilution où l'activité disparaît est la dilution permettant de déterminer le titre : UA = inverse de la dilution

### II.4.2 Effet de quelques facteurs physico-chimique sur l'activité antibiotique

#### II.4.2.1 Effet de la température

Les extraits protéiques et les surnageants actifs sont traités par chauffage à 60 °C, 80 °C et 100 °C pendant 10 min, 30 min, 1 h et à 120 °C pendant 20 min (autoclave). 5 µl de chaque échantillon traité est testé pour son activité antibiotique.

#### II.4.2.2 Effet du pH

La stabilité de la substance aux pH acides et basiques est étudiée en mélangeant 5 µl d'EP ou de surnageant avec 5 µl des solutions tampons allant de 1 à 9. Les pH 10 à 12 sont testés en ajustant les EP et surnageant avec NaOH à 1 M. 5 µl de chaque mixture est testé pour activité antibiotique résiduelle en présence d'un témoin négatif (les différents tampons).

#### II.4.2.3 Effet des enzymes

Le surnageant doté d'activité inhibitrice est traité avec différentes enzymes à 4 et 10 mg/ml de concentration finale en : pronase (pH7) ; pepsine (pH2) ;  $\alpha$ -amylase (pH8) ;  $\alpha$ -chymotrypsine (pH 6) puis incubé à la température d'activité de l'enzyme pendant une heure. L'activité résiduelle est déterminée après chauffage à 100 °C/10 min des solutions d'enzymes.

#### II.4.2.4 Effet de quelques solvants et surfactants

L'extrait protéique et le surnageant sont traités (v/v) avec les solvants suivants : méthanol, éthanol, isopropanol, tween 80, tween 20, SDS, acétone, Acétate d'éthyle, Acétonitrile, EDTA. Après incubation pendant 1 h à température ambiante, l'activité résiduelle est déterminée en présence des différents solvants comme témoins négatifs.

### II.4.2.5 Effet de la salinité sur l'activité antibiotique

90 ml de surnageant de culture sont réparti en 6 parts égales, après extraction des protéines totales à l'acide phosphorique, les extraits protéiques sont récupérés dans un même volume d'un gradient de concentration de NaCl (0 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %). Les extraits sont testés pour leur activité antibiotique.

### II.4.2.6 Effet de l'extrait protéique sur quelques souches bactériennes

20µl de chaque culture bactérienne est inoculé à 10 ml du milieu Mueller-Hinton en surfusion, après homogénéisation, 5µl de l'extrait protéique de S15 dans de l'eau distillé, extrait protéique S1 (SS) et SS comme témoin positif sont déposés.

## III. Caractérisation Biologique des antibiotiques produits par les souches S1 et S15 en milieu liquide

### III.1 Effet des extraits protéiques sur *Halobacterium salinarum*

- **Effet de la concentration d'antibiotique sur les cellules en croissance**

4 tubes contenant 3ml du milieu complexe MC, sont inoculés à 3% d'une suspension d'une DO<sub>600nm</sub> de 0,73 de *Halobacterium salinarum* DSMZ 3754. 20µl, 30µl et 50µl d'extrait protéique de S15 sont respectivement ajoutés dans trois tubes et le quatrième est resté tel quel c'est le témoin. Après 24h et 48h incubation à 40°C et 200rpm la densité optique des cultures et des observations microscopiques sont réalisés.

- **Effet de 20µl sur la culture en biomasse**

Nous avons préparé 2 tubes contenant 1 ml de culture de *H. salinarum* DSMZ3754, le premier c'est un témoin, au deuxième tube 20 µl de l'extrait protéique de S15 sont ajoutés. Après incubation à 40 °C avec 200 rpm d'agitation, des prélèvements sont réalisés à différents intervalles de temps pour mesurer la densité optique et observer au microscope optique.

### III.2 Effet des surnageants de S1 et S15 sur la souche S3

Des cultures de la souche S3 sont réalisées dans des Erlen-Meyer de 100 ml, après 23 h incubation à 40 °C avec 200 rpm d'agitation, à chaque un des Erlens nous avons ajouté respectivement ajouté 30µl de MC (témoin), 30 µl de SC S15 et 30 µl SC de S1. Des

prélèvements sont réalisés à différents intervalles de temps pour mesurer la densité optique et observer au microscope optique.

### IV. Dosage des protéines dans les extraits actifs

La quantité de protéine dans les l'extrait protéique de S15 est déterminée par la méthode de Bradford.

#### IV.1 préparation de réactif de Bradford

50 mg du Bleu de coomassie sont mélangé avec 25 ml de l'éthanol, 50 ml d'acide phosphorique et sont complétés à 500 ml avec de l'eau distillée.

#### IV.2 préparation de la solution de BSA 1mg /ml

3 mg de BSA sont mélangés dans 3 ml de la solution saline.

- Une série de dilution de la solution stocke BSA dans la solution saline a été réalisée selon le tableau suivant :

Tableau II : Gamme de concentration de BSA utilisée

Solution de BSA (ml)	Quantité de diluant ( $\mu$ l)	Concentration BSA finale $\mu$ g/(ml)
1	0	1000
750	250	750
500	500	500
250	750	250

- pour réaliser la courbe d'étalonnage, 5 ml de réactif de Bradford ont été mélangé à 100  $\mu$ l de solution de BSA, après 5 min on mesure l'absorbance à 595 nm.
- pour déterminer la teneur en protéines, nous avons mélangé 5 ml de réactif de Bradford à 100  $\mu$ l de l'extrait protéique de S15, après 5 min on mesure l'absorbance à 595 nm.



## Résultats et discussion

### I. Extraction des protéines totales

#### I.1. Effet du pH sur l'extraction des protéines totales

L'extraction des protéines totales avec l'acide phosphorique à 4°C à différents pH a montré que le culot récupéré est plus important dans la gamme de pH de 0,5, 1, 1,5. L'activité contre *H. salinarum* DSMZ 3754 est optimale à pH 1,0 (Figure 4). Nous avons également observé que l'activité obtenue dans les EP extraits pendant 1h, 2h ou une nuit est la même.

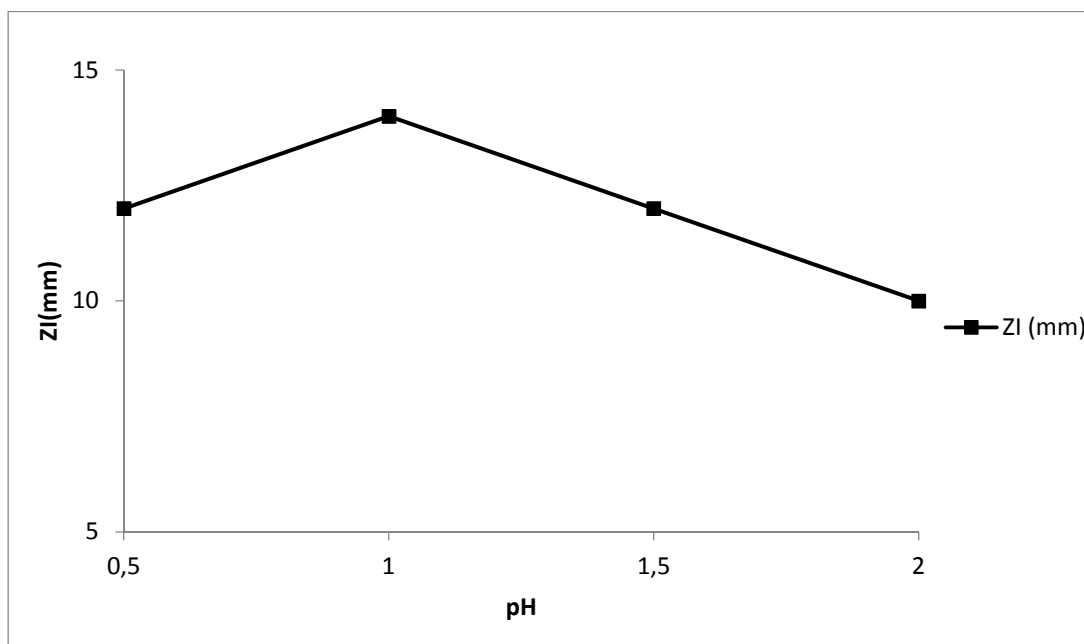


Figure 4 : Activité sur *H. salinarum* DSMZ3754 des extraits protéiques à différents pH

#### I.2 Effet du NaCl sur l'activité antibiotique de l'extrait protéique de S15

Après extraction d'un même volume (15 ml) de surnageant actif de la souche S15, les EP récupérés ont été repris dans un gradient de NaCl (0 à 25%). Les résultats montrent que l'activité antibiotique testée vis-à-vis de *H. salinarum* est restée stable (25mm) (figure 5) aussi bien en absence de NaCl qu'en sa présence. La substance active de la souche S15 est donc sel-indépendante. Certaines halocines connues sont indépendantes au sel c'est le cas de A4, H6, R1 et S8. Cependant, les halocines H1 et H4 sont complètement et partiellement dépendantes au sel respectivement. (O'connor et Shand, 2002).

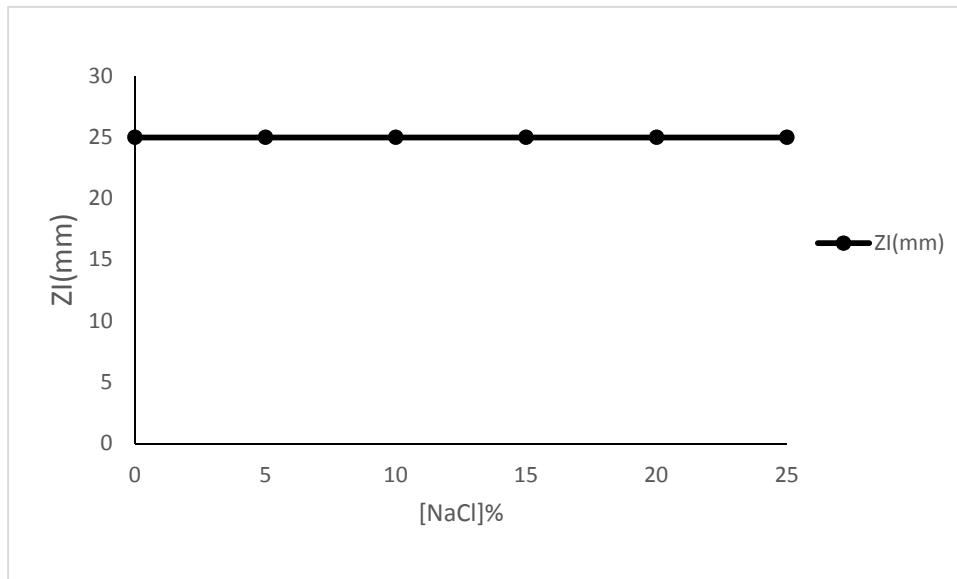


Figure 5 : Activité sur *H. salinarum* DSMZ3754 des extraits protéiques à différents concentration de sel

### I.3. Extraction acide et à froid d'autres cultures halophiles

#### I.3.1. Extraction à partir du surnageant de culture

Différentes cultures ont fait l'objet d'une extraction acide et à froid :

- ❖ Culture en fermenteur de S1 conservée depuis 2011 à 4°C. extraction à l'acide phosphorique à 85% n'a donné aucune activité. Alors qu'à 5% d'acide phosphorique une inhibition de 6 mm sur *H. salinarum* DSMZ3754 est obtenue mais qui a disparu après 3 jours. Cela est peut être dû à la longue conservation de la culture à 4°C qui a fragilisé d'une part l'activité inhibitrice et d'autre part n'a pas permis une bonne extraction.

- ❖ culture en Erlen-Meyer 250 MC

Après extraction de 50 ml de SC de la souche S15 avec de l'acide phosphorique à 5%, a donner une grande activité (25 mm) sur la souche *H. salinarum* DSMZ3754. (Figure 6).

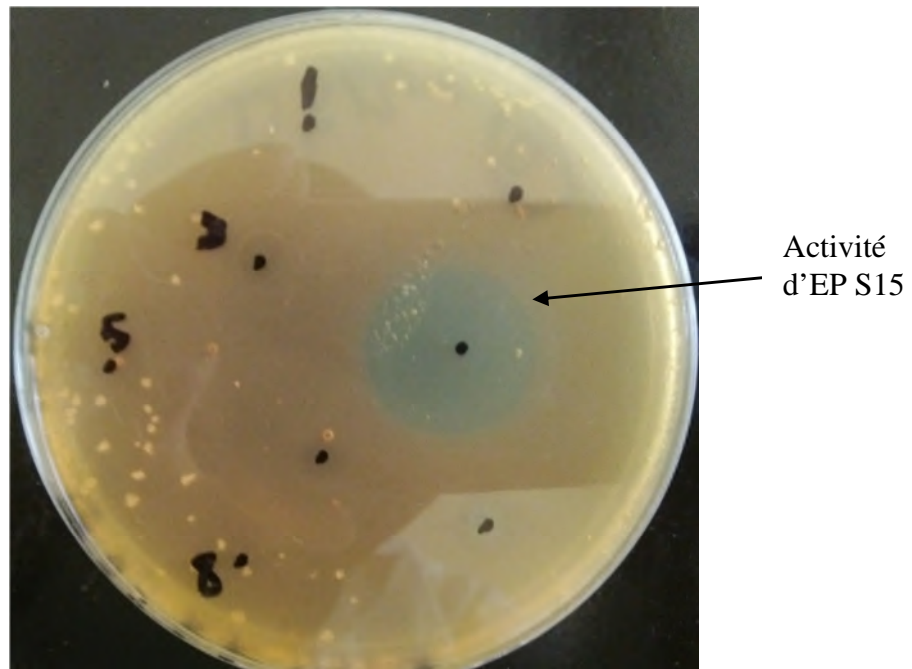


Figure 6 : photographie de l'activité d'EP S15 sur *Halobacterium salinarum* DSMZ3754.

### ❖ Culture en tube

L'extraction de protéines à partir de faibles volumes de culture (1 à 3 ml) a permis d'obtenir des activités moyennes. Nous avons également observé que pour une même souche l'activité varie selon le milieu de culture et un même milieu ne permet pas toujours la production d'activité antibiotique (Tableau III).

Tableau III : activité antibiotique des EP des souches d'haloarchées sur différents milieux

Germes cible EP	DSM54	S2	S3	S4	S10
S1 (MA)	7 mm	6 mm (st)	0	0	0
S1 (MC1)	6 mm	5 mm (st)	0	0	0
S2 (t)	0	NT	NT	NT	NT
S3 (MA)	0	NT	NT	NT	NT
S4 (MC)	0	NT	NT	NT	NT
S5 (MA)	0	0	0	0	0
S5 (MC1)	0	0	0	0	0
S6 (t)	0	NT	NT	NT	NT
S7 (MC1)	0	NT	NT	NT	NT
S8 (t)	0	NT	NT	NT	NT
S9 (MA)	0	NT	NT	NT	NT
S10 (t)	0	0	0	0	0
S11 (t)	0	NT	NT	NT	NT
S12 (MA)	0	0	0	0	0
S13 (MC)	3	NT	NT	NT	NT
S14 (t)	0	NT	NT	NT	NT
S15 (MA)	0	0	0	0	0
S16 (t)	0	NT	NT	NT	NT

NT : non testé

La plupart des cultures ne présentent pas d'activité antibiotique, nous avons alors testé l'activité résiduelle des surnageant après extraction ( $SC_E$ ). Les résultats montrent que l'activité antibiotique était présentes dans certaines cultures mais elle n'a pas été extraite (Tableau IV). Nous avons également remarqué que les substances inhibitrices produites par les souches S1, S12, S5, et S15 sont actives sur toutes les souches testées sauf la S10 qui ne présente une activité inhibitrice que sur la souche S4.

Tableau IV : activité antibiotique résiduelle dans les surnageants (SC<sub>E</sub>) après extraction acide

Germe Cible SC <sub>E</sub>	DSM54	S2	S3	S4	S10
S1 MA	6 mm	5	5	2	7
S1 MC1	7 mm	7	6	5	9
S12 MA	5 mm	5	5	7	8
S5 MA	4 mm	6	5	7	7
S15 MA	5 mm	7	0	7	6
S5 MC1	5 mm	6	5	5	4
S10 T	0	0	0	5	0

### I.3.2. Extraction à partir des cellules

Les cellules récupérées après centrifugation ont été soumises à une extraction acide et à froid afin d'extraire les protéines se trouvant à la surface cellulaire. Les résultats montrent que tous les extraits protéiques de cellules testées ont une activité antibiotique de diamètre varié (Tableau V).

Tableau V : activité antibiotique des Extraits protéiques de la surface cellulaire de souches d'haloarchées

Extrait protéique de la surface cellulaire	Activité sur <i>H. salinarum</i> DSMZ3754 (ZI : mm)
S1	5
S2	3
S3	4
S4	5
S5	3
S9	5
S16	6
S1 MA	3 st
S15 MC	3 st
S1 2011 EP1	6
S1 2011 EP2	6
S1 2011 SP	7
SI 2015 SP	12

SP : sans pigment

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

## II. Caractérisation des extraits protéiques actifs des souches S1 et S15

### II.1. Détermination du titre d'un extrait actif

D'après Shand (2006), le titre d'une solution d'halocine correspond à la dernière dilution pour laquelle l'activité disparaît. D'après les résultats obtenus, Le titre de l'extrait protéique utilisé (S15) est de 8 UA (Tableau VI et Figure 7).

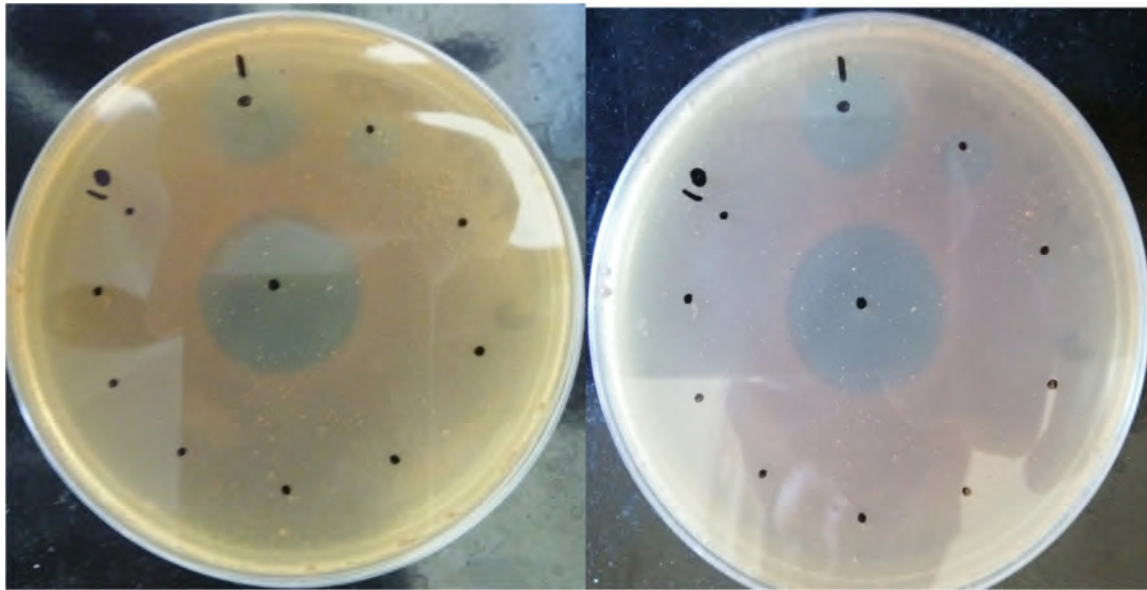


Figure 7 : photographie de deux essais de titre de souche S15

Tableau VI : La dilution d'extinction de l'activité antibiotique des EPS15

Activité sur <i>H. salinarum</i>	ZI (mm) 1 <sup>ie</sup> essai	ZI (mm) 2 <sup>eme</sup> essai
EP		
Témoin (non dilué)	25	25
Dilutions : 1/2	14	14
1/4	8	8
1/8	0	0
1/18	0	0
1/32	0	0
1/64	0	0
1/128	0	0
1/258	0	0
1/518	0	0
1/1036	0	0

## II.2 Effet de certains facteurs physico-chimiques et enzymatique sur l'activité antibiotique

### II.2.1. Traitement thermique

Après les différents traitements thermiques, la substance antibiotique de la souche S1 conserve son activité, elle est donc thermostable. Par contre la substance antibiotique produite par la souche S15 est thermolabile. En effet l'activité disparaît après traitements thermiques à 60 et 80°C pendant 1h et à 100°C pendant 30 min. (Tableau VII)

Tableau VII : Effet de la température sur les substances actives des souches S1, S15

Traitements thermiques (min)	T+	60°C			80°C			100°C			120°C
		10	30	60	10	30	60	10	30	60	20
SC S1	5	5	5	5	5	5	5	05	5	5	0
EP S15	12	12	11	0	12	4	0	12	0	0	0

T+ : Témoin positif (non traité)

### II.2.2.Effet du pH

Le surnageant de la souche S1 traitée à différents pH montre que l'activité est stable de pH 1 à pH 7, mais elle diminue à pH 8 pour disparaître complètement à partir pH 9 (figure 8). Le EP S15 est plus sensible aux variations de pH (figure 9). Ainsi, l'activité augmente suivant le pH et l'optimum est à pH 5. l'halocine HA1 est stable au pH allant de 2 à 9 (Kumar et al., 2016).

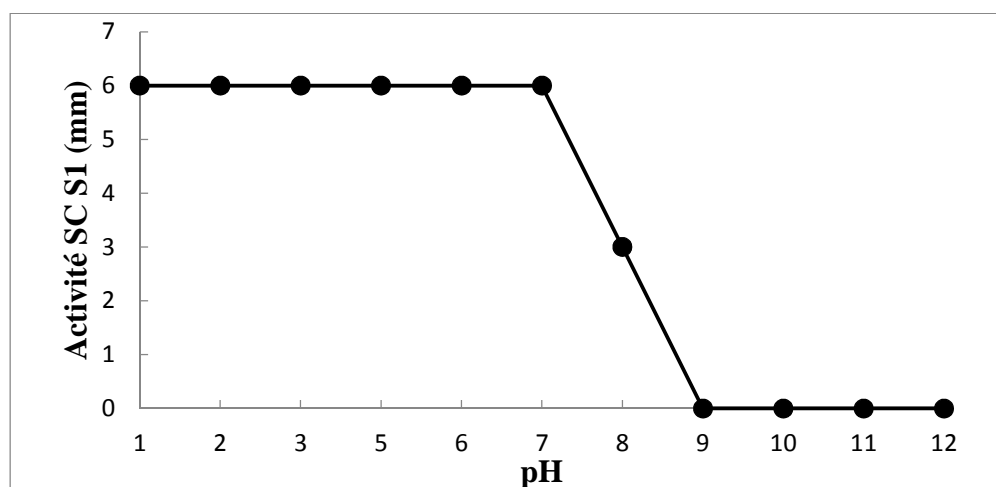


Figure 8 : Effet du pH sur l'activité antibiotique du Surnageant(SC) de la souche S1



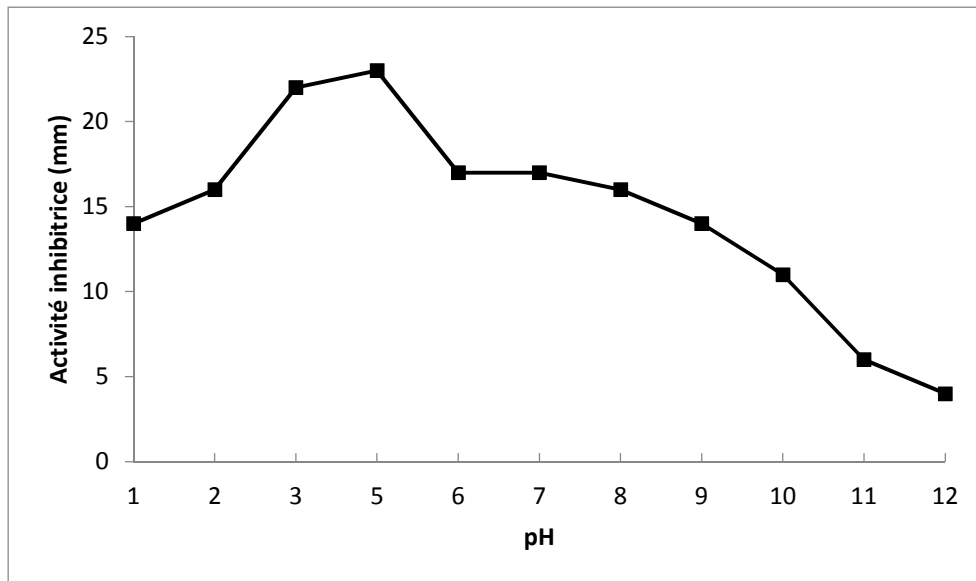


Figure 9 : Effet du pH sur l'activité antibiotique d'extrait protéique S15.

### 3.4.3. Effet de quelques solvants organiques et surfactants sur l'extrait protéine de S15

Après 1 h de contact de l'extrait protéique S15 actif avec différents solvants organiques et surfactant. Les résultats montrent que 100% de l'activité résiduelle est conservée en présence de méthanol, éthanol, acétone (tableau VIII) et disparaît complètement avec isopropanol, tween 80, tween 20. L'activité diminue d'environ 93% avec l'acétate d'éthyle et 71% en contact avec Acétonitrile et l'EDTA. certaines halocines sont actives en contact avec tous ces solvants tel que HA1 (Kumar et *al.*, 2016).

Tableau IX : Effet de quelques solvants organique et surfactants sur l'extrait protéine de la souche S15

Les solvants	EP de S15
Témoin positif	14
Méthanol	14
Ethanol	14
isopropanol	0
Tween 80	0
Tween 20	0
SDS	5
Acétone	14
Acétate Ethyle	13
Acétonitrile	10
EDTA	10

### 3.4.3. Effet de quelques enzymes

Différents enzymes (pronase,  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -chymotrypsine, pepsine) à différentes concentrations (4mg/ml, 10mg/ml) ont été testées. Les résultats montrent que la plupart des enzymes agissent sur l'extrait protéique de la souche S15 et le surnageant de S1 en inhibant complètement leur activité, à l'exception de la pepsine et  $\alpha$ -amylase qui n'ont aucun effet sur le surnageant actif de la S1. L'extrait protéique de la souche S15 est résistant à  $\alpha$ -amylase et sensible aux autres protéases

Tableau IX : effet de quelques enzymes sur les substances actives de S1 et S15

Concentration des enzymes (mg/ml)	T+	Pronase		pepsine		$\alpha$ -amylase		$\alpha$ -chymotrypsine	
		4	10	4	10	4	10	4	10
SC S1	6 mm	0	0	3mm	0	4mm	0	0	0
EP S15	9mm	0	0	0	0	8mm	0	0	0

T+ : témoin positif

✓ L'action des enzymes sur le extrait protéique et le surnageant confirme leurs nature protéique, et on peut déduire sur les acides aminés constitutifs de ces extraits.

-L'activité de pepsine sur les substances indique la présence des liaisons peptidiques avant les acides aminés aromatiques

- L'activité de  $\alpha$ -amylase indique la présence des liaisons  $\alpha$  (1→4) glycosidiques à l'intérieur des chaînes de l'amylose et de l'amylopectine.
- L'activité de  $\alpha$ -chymotrypsine indique la présence des liaison peptidique en aval d'un acide aminé tyrosine, tryptophane, de phénylalanine ou la leucine. La bacteriocin S20a est sensible à la  $\alpha$ -chymotrypsine, résistante au pepsine et  $\alpha$ -amylase. (Chin Y.Z. et al., 2015)

#### II.2.4. Action des extraits protéiques actifs de S1 et S15 sur quelques souches bactériennes

L'extrait protéique de S15 présente une activité bactéricide vis-à-vis la souche *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (figure 10), et une activité bactériostatique sur *Staphylococcus aureus*. L'extrait protéique de S1 et le témoin positif n'a aucun effet sur toutes les souches bactériennes testées (Tableau X).

Tableau X : Effet des extraits protéique de S1 et S1 sur quelques souches bactériennes

Souche bactérienne	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline	<i>Staphylococcus aureus</i> non résistant à la méticilline
ZI d'EP S15	0	0	10mm	8 mm (st)
ZI d'EP S1	0	0	0	0
ZI de SS	0	0	0	0

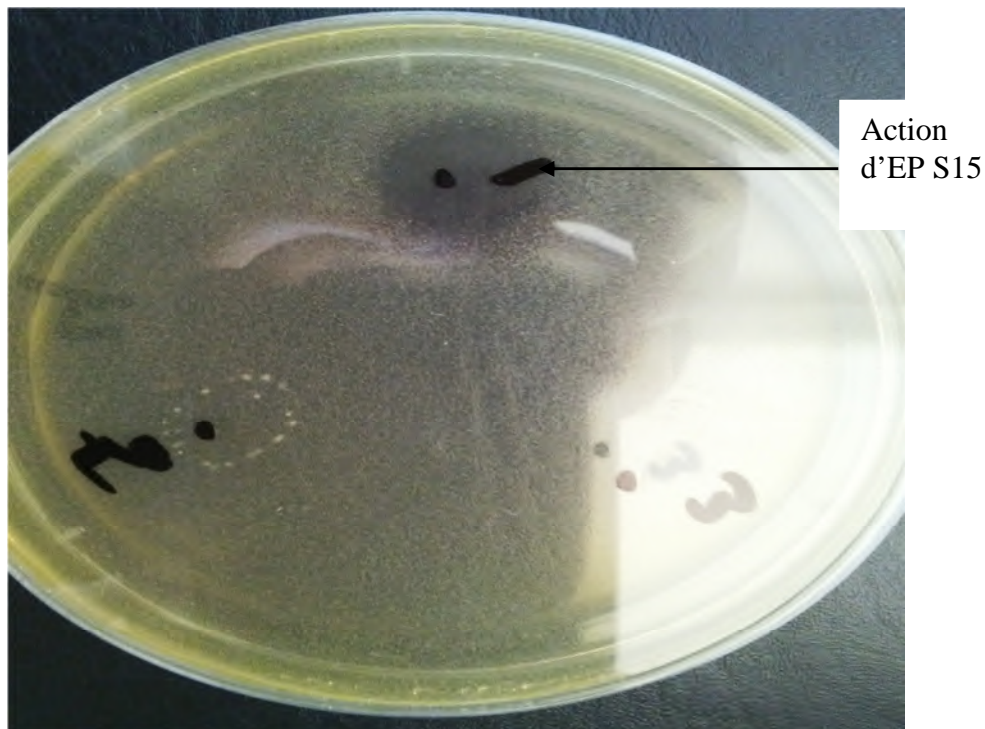


Figure 10 : photographie de l'effet de l'extrait protéique S15 sur SARM

### **III. Caractérisation Biologique des antibiotiques produits par les souches S1 et S15 en milieu liquide**

#### **III.1 Effet des extraits protéiques sur la croissance de *Halobacterium salinarum***

20, 30 et 50 $\mu$ l d'EP S15 actifs ont été ajouté au début ( $t_0$ ) de la culture de la souche *H. salinarum* DSMZ3754 en présence d'un témoin (culture *H. salinarum* DSMZ3754 sans EP). Les résultats montrent que les EP agissent après 24h de croissance (figure 11). En effet, pendant que la croissance de la souche cible se stabilise dans le témoin, elle chute de 69 et 82% en présence de 20 $\mu$ l et 30  $\mu$ l de EP respectivement. En présence de 50 $\mu$ l de EP aucun une croissance est observée.

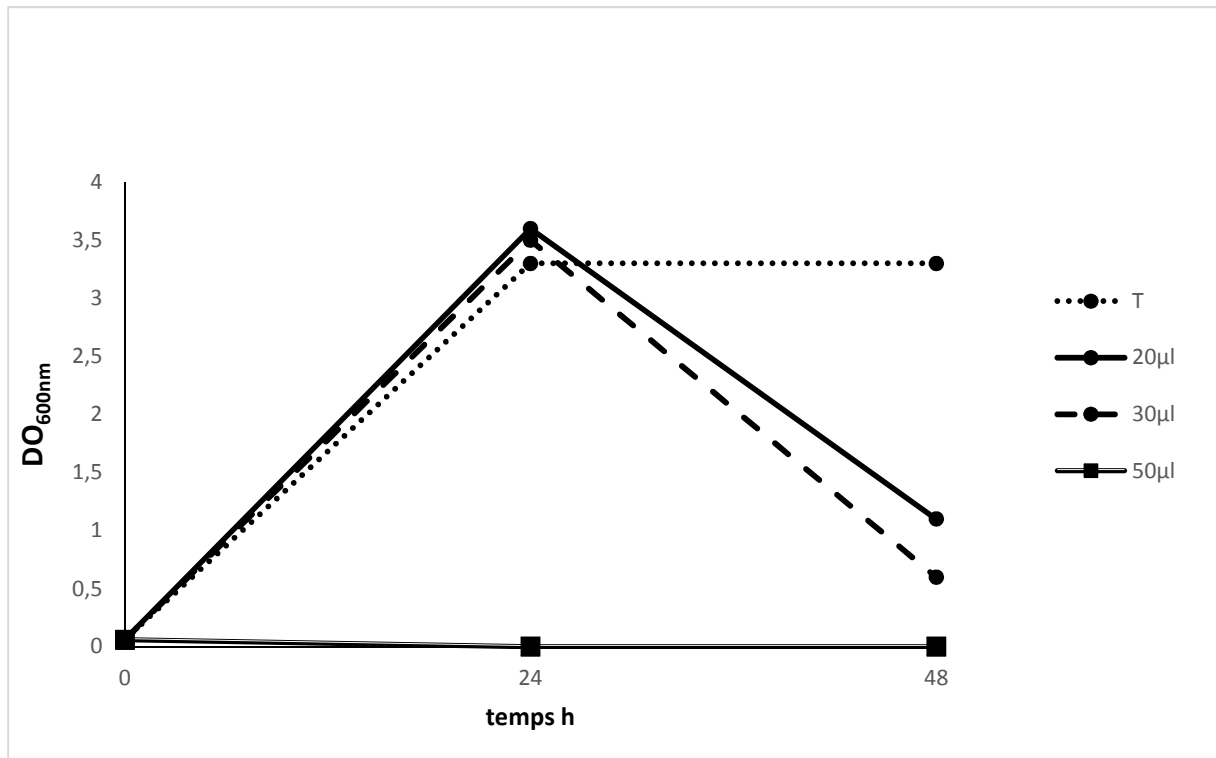


Figure 11 : Croissance de *Halobacterium salinarum* DSMZ3754 en présence de 20, 30 et 50µl de l'extrait protéique S15.

### III.1.2 Observation microscopique

La coloration de «Gram» effectuée sur la souche DSMZ3754 témoin, DSMZ3754+ 20 $\mu$ l de EP, DSMZ3754+ 30 $\mu$ l de EP révèle que les cellules traitées ont un volume plus important que celui de témoin (figure 12(A, B, C)).

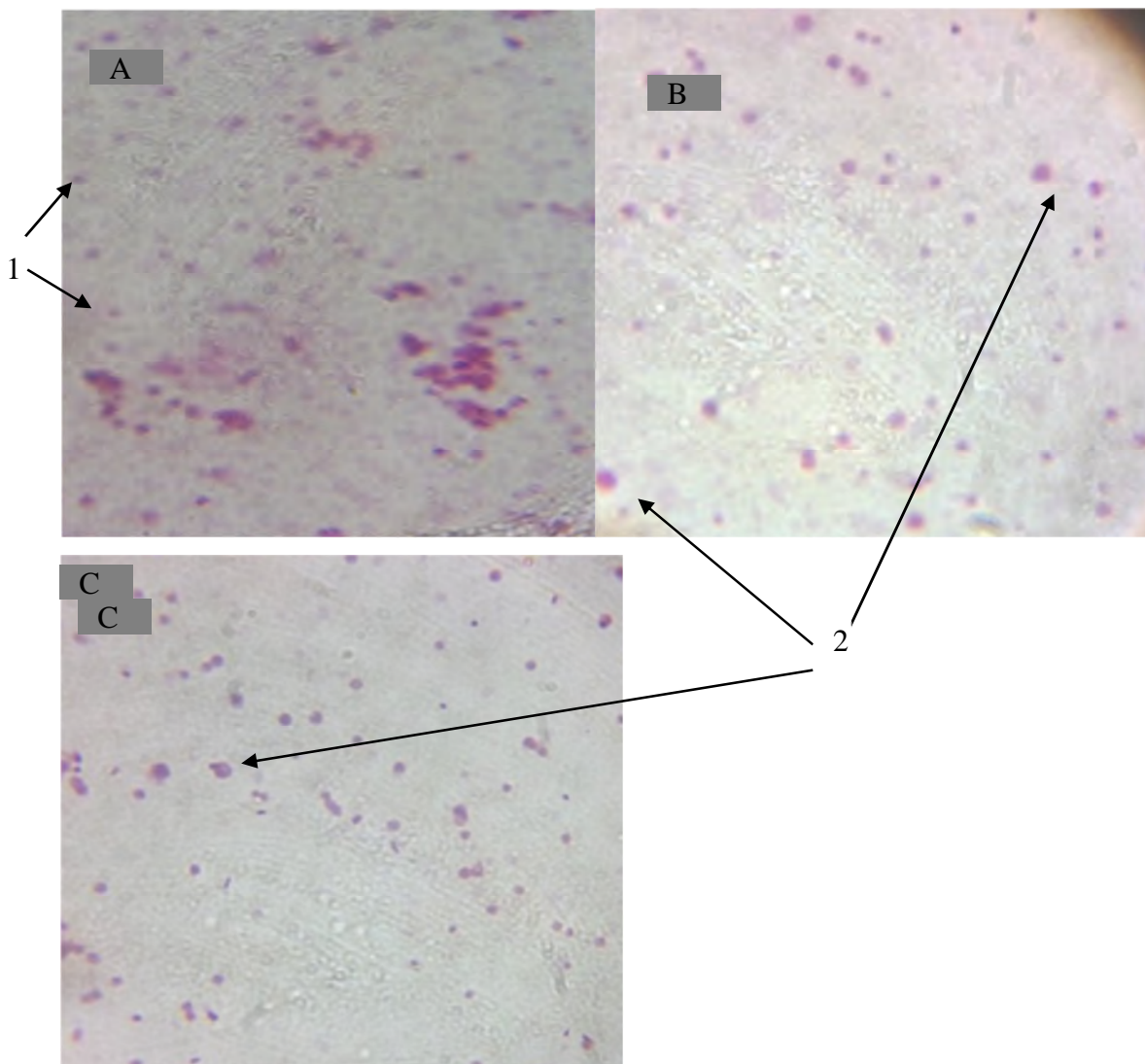


Figure 12 : photographie du résultat de coloration de Gram de *Halobacterium salinarum* DSMZ3754 A : témoin, B : DSMZ3754+ 20  $\mu$ l de EP S 15, C : DSMZ3754+30  $\mu$ l de EP S 15

1 : aspect des cellules non traité ; 2 : aspect gonflé des cellules après traitement

### III.2 Effet des extraits protéiques sur la culture *Halobacterium salinarum* en fin de phase exponentielle

20  $\mu$ l de EP S15 actifs sont ajoutés à la culture de la souche *H. salinarum* DSMZ3754 en présence d'un témoin (culture *H. salinarum* DSMZ3754 sans EP). Les résultats montrent que le EP agit sur la croissance. En effet, la biomasse continue de croître dans le milieu témoin de 0 à 24 h puis diminue légèrement au-delà. Dans le milieu contenant 20 $\mu$ l de EP actif, la croissance se stabilise de 0 à 24 puis la DO diminue de 15% après 48 h et de 38,4% après 55h d'incubation (figure13).

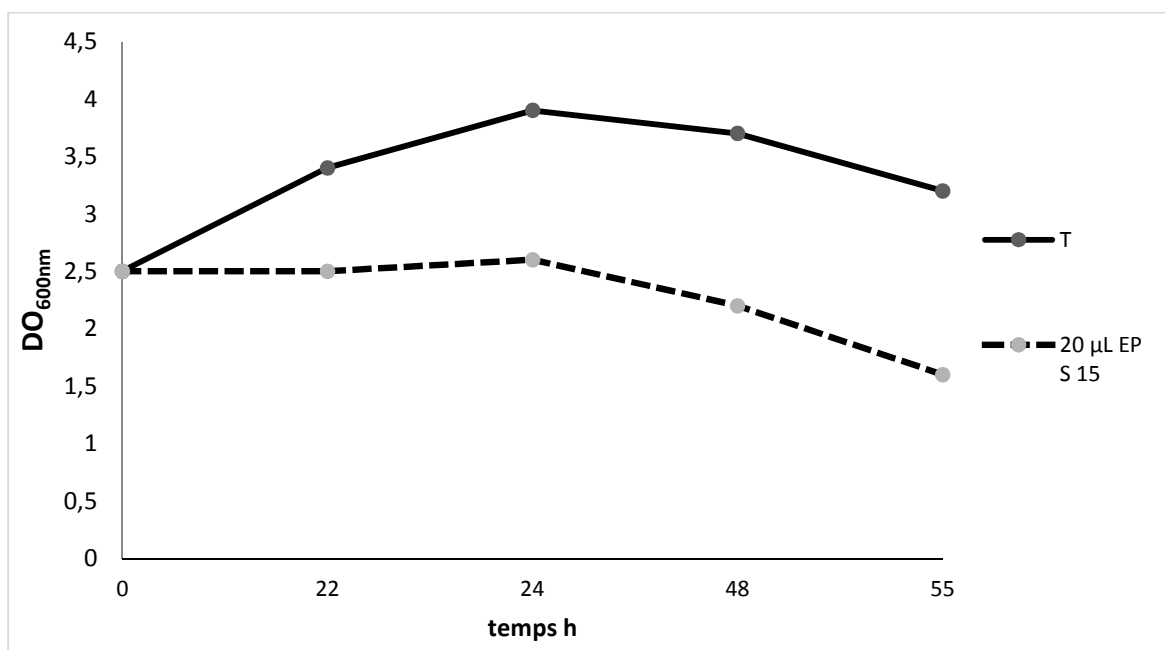


Figure 13 : effet de 20 $\mu$ l de EP actif de la souche S15 sur la biomasse de *Halobacterium salinarum* DSMZ3754 en fonction du temps

#### III.2.1. Observation microscopique

La coloration de «Gram» effectuée sur la souche DSMZ3754 témoin(figure ), DSMZ3754+ 20 $\mu$ l de EP S15 après 15 min(figure 13 (A)), DSMZ3754+ 30 $\mu$ l de EP S15 après 30 min, DSMZ3754+ 30 $\mu$ l de EP S15 après 1h(figure13(B), DSMZ3754+ 30 $\mu$ l de EP S15 après 4h(figure14 (C)), révèle l'effet de la concentration de EP sur la biomasse de *Halobacterium salinarum*DSMZ375. Nous constatons que dans la culture témoin les bâtonnets sont plus ou moins fins, alors qu'en présence d'EP actif les cellules augmentent de volume en fonction du temps d'exposition. L'extrait actif agirait probablement sur la membrane de *H. salinarum*, ce

qui expliquerait l'augmentation du volume des cellules qui conduirait à l'éclatement des cellules, ce qui expliquerait la chute de la DO.

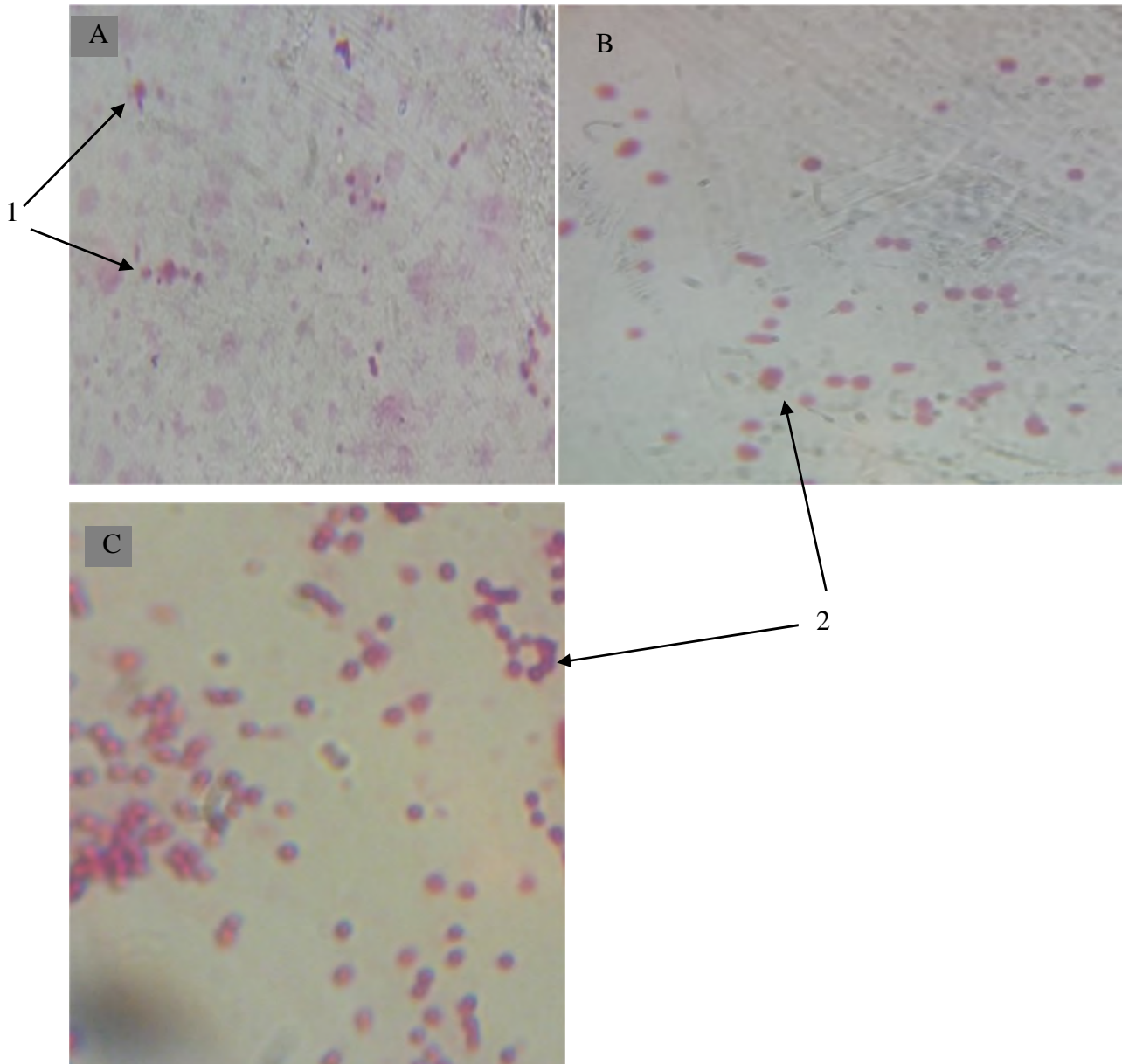


Figure 14 : photographie du résultat de coloration de Gram de *Halobacterium salinarum* DSMZ3754 A : témoin, B : DSMZ3754 après 15min, C : DSMZ3754 après 4h de l'ajout de EP S15.

1 : aspect des cellules non traité ; 2 : aspect gonflé des cellules après traitement



### III.3 Effet des surnageants actifs de S1 et S15 sur les cellules de S3 en croissance

30 $\mu$ l de SC S1 et 30 $\mu$ l de SC S15 actifs ont été ajoutés après 23h et 32h d'incubation à la culture de la souche S3 en présence d'un témoin (culture S3 sans SC actif). Les résultats montrent que les SC de S1 et S15 agissent sur la croissance en fonction du temps (figure 15). En effet, l'addition des SC actifs n'a aucun effet sur les cultures lorsqu'ils sont ajoutés 23 après inoculation. Cependant, la croissance de la S3 est fortement affectée lorsqu'ils sont ajoutés en fin de croissance (32h), une réduction de la DO de 65 et 75% en présence de SC S1 et SC S15 respectivement.

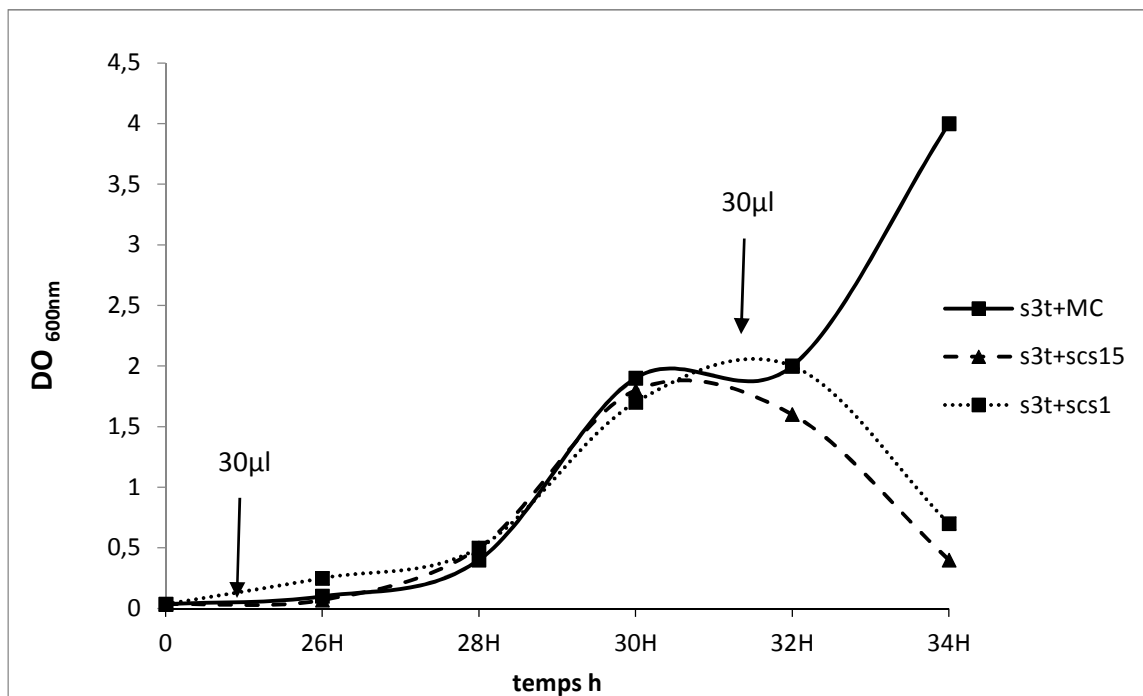


Figure 15 : courbe de l'absorbance de la souche S3 en croissance après l'ajout des surnageants de S1 et S15 en fonction du temps

#### III.3.1 Observation microscopique

La coloration de «Gram» effectuée sur la souche S3 (Figure 16(A)) (B (C)) révèle l'effet de ces surnageants sur la souche S3.

En présence des SC actifs les cellules S3 sont plus claires et augmentent de volume, l'augmentation est plus importante avec SC S15. Ces SC actifs agissent probablement sur la membrane de S3, ce qui explique l'aspect gonflé des cellules après contact avec les substances inhibitrices qui mènerait vers la lyse des cellules de S3, d'où la chute de la DO.

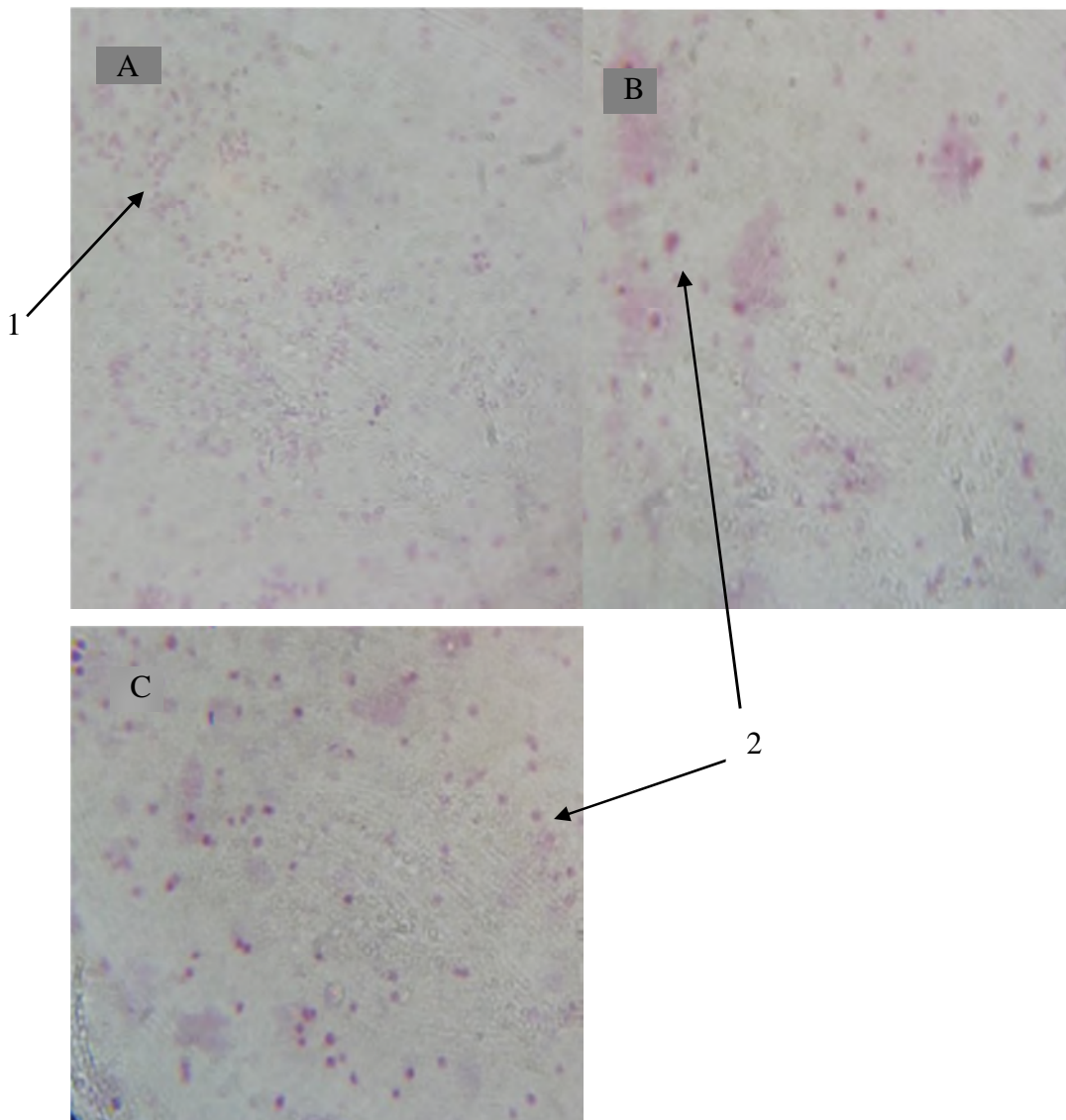


Figure 16 : photographie du résultat de coloration de Gram de *la* souche S3 A : témoin, B : S3+SC S15, C : S3 + SC 1.

1 : aspect des cellules non traité ; 2 : aspect gonflé des cellules après traitement

## VI. Quantification les protéines par la méthode de Bradford

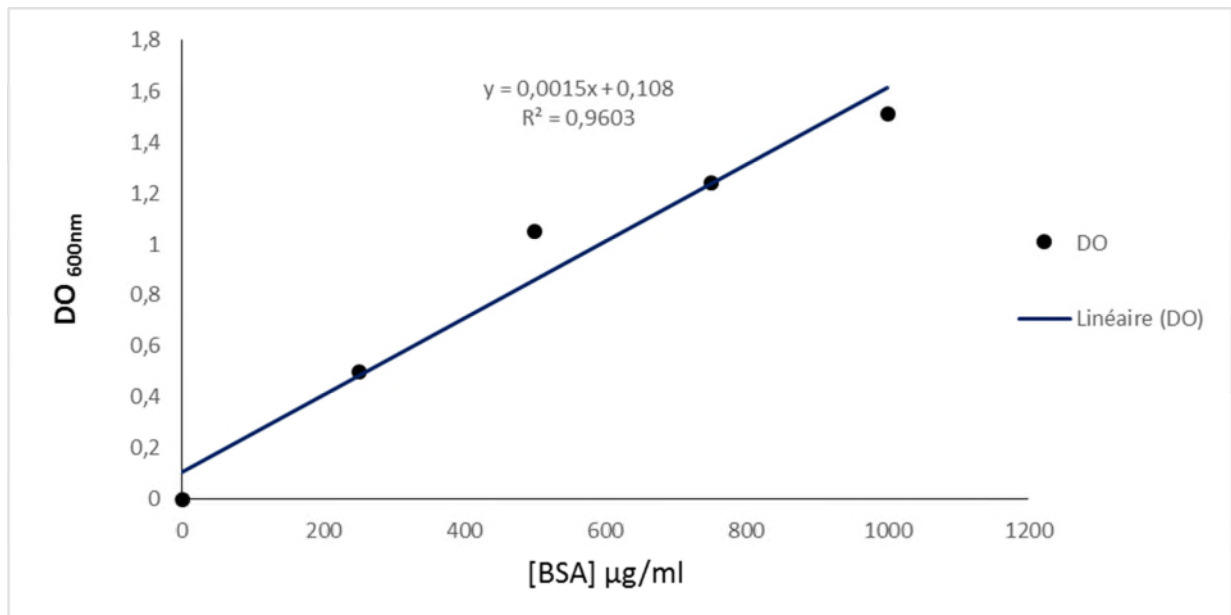


Figure 17 : courbe d'étalonnage de BSA

En utilisant la courbe d'étalonnage de la BSA, nous constatons que nos extraits actifs présentent une quantité appréciable de protéines (Tableau XI). De plus l'échantillon chauffé contient moins de protéines. Le chauffage à 100°C pendant 10 min a dénaturé certaines protéines (protéines contaminants) ce qui expliquerait la différence de DO

A partir de graphe :

$$Y=0,001x+0,108$$

Tableau XI : DO<sub>595nm</sub> de l'absorbance des EP de la souche S15

Mélange d'EP et réactif de Bradford	DO
EP	1,55
Ep chauffé	1,30

Donc la quantité des protéines totales dans l'extrait protéique de S15 est :

$$✓ X_{Ep}=0.9613 \text{ mg/ml}$$

Après traitement de l'extrait protéique de S15 y a une diminution de la quantité

$$✓ X_{Ep \text{ chauffé}}=0.794 \text{ mg/ml}$$

# Conclusion

Notre travail avait pour objectif l'extraction et la caractérisation d'antibiotiques produits par quelques souches halophiles. Ainsi les effets de certains facteurs physico-chimiques ont été étudiés sur la stabilité de ces substances antibiotiques. L'effet inhibiteur de ces substances a été également entrepris en milieu liquide sur des cultures en croissance de *H.salinarum* et d'un isolat d'*Haloarcula Sp.*

D'après les résultats obtenus, nous pouvons conclure que :

- ✓ L'extraction acide (acide phosphorique) et à froid des protéines totale à partir du surnageant a permis de récupérer les substances actives produites par quelques souches d'haloarchées, L'acide phosphorique à 5% a permis d'avoir une meilleure extraction des protéines totales.
- ✓ La substance antibiotique élaborée par la souche S15 présente la plus forte activité vis-à-vis de *H. salinarum* DSMZ3754.
- ✓ Comme les bactériocines de bactéries lactiques, les substances antibiotiques produites par quelques souches d'haloarchées s'adsorbent à la surface cellulaire.
- ✓ La substance inhibitrice produite par la souche S 1 est thermorésistante, stable dans une large gamme de pH (1 à 8).
- ✓ Cependant la S15 produit une activité thermolabile, l'activité disparaît après traitements thermiques à 60 et 80 °C pendant 1h et à 100 °C pendant 30 min, elle est stable uniquement à pH Acide (3 à 5).
- ✓ Certaines enzymes protéolytiques agissent sur l'extrait protéique de la souche S15 et le surnageant de S1 en inhibant complètement leurs activités, ce qui confirme leur nature protéique. Ce qui indique qu'il s'agit d'Halocines.
- ✓ Méthanol, éthanol, acétone n'ont aucun effet sur l'activité produite par la souche S15, mais elle disparaît complètement avec l'isopropanol, tween 80, tween 20. L'activité diminue d'environ 93 % avec l'acétate d'éthyle et 71 % en contact d'Acétonitrile et l'EDTA.
- ✓ La substance produite par la S15 présente une activité inhibitrice sur deux souches pathogènes de *S. aureus*.
- ✓ Les activités antibiotiques produites par les souches S1 et S15 semblent agir sur la membrane de la souche S3 et de celle de *H. salinarum*, l'aspect gonflé observé sur les cellules après contact avec les substances inhibitrices traduirait probablement une perturbation au niveau de la membrane qui mènerait vers la lyse des cellules, d'où la chute de la DO.

## **Conclusion**

En perspective, pour des études ultérieures, afin d'approfondir la caractérisation de cette substance, nous suggérons

- Purification les substances antimicrobiennes
- La Détermination de son poids moléculaire et sa séquence en acides aminés.
- L'étude de la stabilité de la substance vis-à-vis d'autres enzymes (lipases, Glucose-oxydase) et à d'autres solvants tel que Formaldéhyde et Chloroforme

## RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUE

---

### A

Ali I , Akbar A, Aslam M , Ullah S , Anwar M, Punnapayak H , Lotrakul P, Yanwisetpakdee B. (2015). Comparative Study of Physical Factors and Microbial Diversity of Four Man-Made Extreme Ecosystems. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences 10: 1-12

Antón J, Peña A , Santos F , Martínez-García M , Schmitt-Kopplin P , Rosselló-Mora R.(2008).Distribution, abundance and diversity of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. Saline Systems, 54: 4-15

### B

Bowers KJ, Wiegel J. (2011). Temperature and pH optima of extremely halophilic archaea: a mini-review, Extremophiles 15:119–128

### C

Chin Y-Z, Velu S, Abu Bakar F.(2015). Characterization and the influence of milk solids-not fat on the bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* S20 isolated from Chinese sauerkraut, a traditional fermented vegetable, Ann Microbiol 10: 07-15

### D

De Mot R, Parret AHA, Temmerman K. (2005).Novel Lectin-Like Bacteriocins of Biocontrol Strain *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. Applied and Environmental Microbiology 71: 5197-5207

Dobson A, Cotter PD, Ross RP, Hill Colin (2011).Bacteriocin Production: a Probiotic Trait? Applied and Environmental Microbiology 7: 1–6

### E

Enache M, Cojoc R, Kamekura M. (2015). Halophilic Microorganisms and Their Biomolecules : Approaching into Frame of Bio (Nano) Technologies Archives of Microbiology 6: 161-172

Étivier AM, Boyaval P, Duffes F, Dousset X, Compoin JP, 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

### G

Gostinčar C, Lenassi M, Gunde-Cimerman N, Plemenitaš A (2011) Fungal adaptation to extremely high salt concentrations. *Adv Appl Microbiol* 77: 71–96

### H

Heu S , Oh J , Kang Y , Ryu S, Cho SK. , Cho Y, Cho M.(2001).gly Gene Cloning and Expression and Purification of Glycinecin A, a Bacteriocin Produced by *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* 8ra. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 4105-4110

### I

Imadalou-Idres N s, Carré-Mlouka<sup>2</sup> Alyssa, Vandervennet<sup>2</sup> Manon, Yahiaoui<sup>1</sup> Houa, Peduzzi<sup>2</sup> Jean Rebuffat Sylvie. (2013).Diversity and Antimicrobial Activity of Cultivable Halophilic Archaea from Three Algerian Sites. *Journal of Life Sciences* 7: 1057-1069

### K

Karthikeyan P, Bhat Sarita G, Chandrasekaran M. (2013). Halocin SH10 production by an extreme haloarchaeon *Natrinema* sp. BTSH10 isolated from salt pans of South India. *Saudi J Biol Sci.* 20: 205–212.

Kis-Papo T, Oren A. (2000). Halocins: are they involved in the competition between halobacteria in saltern ponds?. *Extremophiles* 4: 35–41

Klaenhammer TR. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70:337–349.

Ventosa A, Rafael R. (2014). *Encyclopedia of Astrobiology* 18: 1-5

## RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUE

---

Konuk M, Korcan S E, Erdoğan S F. (2015). Beneficial Usages of Halophilic Microorganisms Sustainable Development and Biodiversity 6: 261-276

Kushner DJ. (1993). Growth and nutrition of halophilic bacteria. In: Vreeland RH, Hochstein LI (Eds) The biology of halophilic bacteria. CRC Press, Boca Raton 21: 87–89

### L

Lakey J H, Slatin S L. (2001). Pore-forming colicins and their relatives. Curr. Top. Microbiol. Immunol 257: 131-161.

Litchfield C D. (2011). Potential for industrial products from the halophilic *Archaea* Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 38:1635

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

### M

Ma Y, Galinski E A, Grant W D, Oren A, Ventosa A (2010) Halophiles 2010: life in saline environments. Appl Environ Microbiol 76: 6971–6981

Mei S, Sun C, Liu X, Lu Q, Cai L, Li Y, Xiang H. (2008). The Helix-Loop-Helix Motif at the N Terminus of HalI Is Essential for Its Immunity Function against Halocin C8. JOURNAL OF BACTERIOLOGY 190: 6501–6508

Michel-Briand Y and Baysse C. (2002). The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. Biochimie 84: 499-510.



### N

Naor A, Yair Y, Gophna U. (2013). A halocin-H4 mutant *Haloferax mediterranei* strain retains the ability to inhibit growth of other halophilic archaea, *Extremophiles* 17: 973–979

Nercessian D, Paggi R, Di Meglio L and De Castro R. (2015) .Exploring the multiple biotechnological potential of halophilic microorganisms isolated from two Argentinean salterns. *Extremophiles* 19: 1133-1143

Nilsen T, Nes IF. , Holo H. (2003).Enterolysin A, a Cell Wall-Degrading Bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 2975-2984

### O

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

O'Sullivan O, Hill C, Ross P, Cotter P. (2013). Bacteriocin Mining in Metagenomes, *Encyclopedia of Met genomics* 9: 1-8

Oksanen HM, Atanasova NS., Pietilä MK.(2013).Diverse antimicrobial interactions of halophilic archaea and bacteria extend over geographical distances and cross the domain barrier,*Microbiology Open* 2: 811–825

Oren A.(2002).Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria *FEMS Microbiology Ecology* 39 : 1–7

Oren A. (2011).Diversity of Halophiles. *Extremophiles Handbook* 10: 310-320

## RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUE

---

Oren A. (2012). Taxonomy of the family Halobacteriaceae: a paradigm for changing concepts in prokaryote systematic, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62: 263–271

Oren A.(2014) . Taxonomy of halophilic Archaea: current status and future Challenges, *Extremophiles* 18: 825–834

Oren A, Litchøeld C. D. (1999). A procedure for the enrichment and isolation of *Halobacterium*. *FEMS Microbiology Letters* 63: 353-358

Oren A. (2008). Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity .*Saline Systems* 4: 2-9

### P

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

Price LB, Shand RF. (2000).Halocin S8: a 36-Amino-Acid Microhalocin from the Haloarchaeal Strain S8a. *Journal of Bacteriology* asm 128: 4951-4958

### R

Reitner J, Thiel V. (2011). HABITAT, *Encyclopedia of Geobiology* 9: 437-441

Rodri'guez N, Salgado JM, Corte's S, Domi'nguez JM. (2010). Alternatives for biosurfactants and bacteriocins extraction from *Lactococcus lactis* cultures produced under different pH conditions. *Letters in Applied Microbiology* 11: 226–233

### S

Sabet S, Diallo L, Hays L, Jung W, Dillon J G. (2009). Characterization of halophiles isolated from solar salterns in Baja California, Mexico *Extremophiles* 13:643–656

Shand C. A, Cheshire M. V, Bedrock C. N, Chapman P. J, Fraser A. R, Chudek J. A. (1999) Solid-phase <sup>31</sup>P NMR spectra of peat and mineral soils, humic acids and soil solution components: influence of iron and manganese. *Plant and Soil* 214: 153–163

Sun C, Li Y, Mei S, Lu Q, Zhou L, Xiang H.(2005) .A single gene directs both production and immunity of halocin C8 in a haloarchaeal strain AS7092, *Molecular Microbiology* 11: 537–549

Surovtsev VI, Borzenkov VM, Levchuk VP. (2014).Purification of Bacteriocins by Chromatographic Methods *Applied Biochemistry and Microbiology* 51: 881–886.

### T

Tiwari KS, Kumar V, Saxena J.(2015).Description of a halocin-producing *Haloferaxlarsenii* HA1 isolated from Pachpadra salt lake in Rajasthan. *Archives of Microbiology*, 198: 181–192

Todorov S. D, Holzapfel W, Nero1L. A. ( 2015). Characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST8SH and some aspects of its mode of action *Ann Microbiol* 12: 11-18.

### V

Ventosa A, Fernández B, José León M, Sánchez-Porro C, Rodriguez-Valera F a. (2014). The Santa Pola saltern as a model for studying the microbiota of hypersaline environments. *Extremophiles* 18: 811-824

Ventosa A, Rafael R. de la Haba b. (2014). *Archaea Encyclopedia of Astrobiology* 6: 26-39

### Y

Yim K J , Cha I-T, Lee H-W, Song H S, Kim K-N, Lee S-J, Nam Y-D, Hyun D-W, Bae J-W, Rhee S-K, Seo M-J, Choi J-S, Choi H-J, Roh S W• Kim D. (2014). *Halorubrum halophilum* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a salt-fermented seafood. *Antonie van Leeuwenhoek* 105: 603-612

### Z

Zacharof M.P, Lovitt R. W. (2012). Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria APCBEE. *Procedia* 11: 50 – 56.

Zamfir M, Callewaert R, Cornea PC, Savu L, Vatafu I, De Vuyst L.( 1999). Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. *Journal of Applied Microbiology* 923–931

Zahar. J R, Weiss ET. (2015). How Can Antibiotic De-Escalation Be Defined and Stratified? *Réanimation* 9: 6-22

## Appareillages et réactifs

### 1)- Appareillage

- Autoclave (PBI international)
- Microscope optique (ZEISSWEST)
- Réfrigérateur (ENIEM)
- Bain- marie muni d'un agitateur rotatif (HMR-Lnv).
- Bain-marie
- Four Pasteur (TRAD RAYPA)
- Centrifugeuse ( 6000rpm (HETTICH, ZENTRIFUGEN. EBA20), 14800 rpm )
- Balance électronique
- Balance analytique de précision (Adventure™)
- Vortex (VELP SCIENTIFICA)
- Etuves (TORRE PICENARDCCR, CBM)
- Four Pasteur
- Microscope photonique
- Micropipette (Fortuna)
- Plaque chauffante et agitateur magnétique (TRADE RAYPA)
- Spectrophotomètre
- venticell
- appareil photo de portable LG (L9)
- Boîtes de Petri
- Erlen-Meyers coniques à col large (25, 50, 100, 250ml, 500 ml )
- Béchers
- Poires
- Bec bunsen
- Portoir
- Spatule, anse de platine
- Eprouvettes graduées

## **Réactifs :**

### **Colorants**

- Fushine
- Lugol
- Violet de gentiane
- Bleu de comassine G250

### **Solvant et Surfactant**

- Acide acétique à 2%
- Acétone
- Acide chlorhydrique
- Ethanol
- Huile à immersion
- Méthanol
- Enzyme (amylase)
- Protéases (pepsine, pronase, chymotrypsine)
- NaOH

**Milieu de culture :****• Milieu complexe (MC)**

Peptone.....	5g/l
Extrait de levure.....	5g/l
Extrait de viande.....	2g/l
NaCl.....	250g/l
KCl.....	2g/l
MgSO <sub>4</sub> .....	20g/l
Citrate tri-sodique.....	3g/l
Agar.....	20g/l
Eau distillée.....	1000ml

Le pH est ajusté à 7 avec (HCl/NaOH)

Stérilisation dans un autoclave à 120°C pendant 20mn.

**• Milieu MC1**

Peptone.....	10 g/l
Extrait de levure.....	2 g/l
Viande de caséique.....	1 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1 g/l
NaCl.....	180 g/l
KCl.....	4 g/l
MgSO <sub>4</sub> .....	20 g/l
Agar.....	20 g/l
Eau distillée.....	1000ml

Le pH est ajusté à 7 avec (HCl/NaOH)

Stérilisation dans un autoclave à 120°C pendant 20mn.

**• Milieu Brown**

Extrait de levure.....	5 g/l
NaCl.....	250g/l
KCl.....	2g/l
MgSO <sub>4</sub> .....	20g/l
Citrate tri-sodique.....	3g/l
Agar.....	20g/l
Eau distillée.....	1000ml

Le pH est ajusté à 7,2 et à 9 avec (HCl/NaOH)

Stérilisation dans un autoclave à 120°C pendant 20mn.

- **Solution saline**

Citrate trisodique.....	3g/l
Nacl.....	250g/l
KCl.....	2g/l
MgSo4.....	20g/l
Eau distillée.....	1000ml

Le pH est ajusté à 7,2 et à 2.

Stérilisation dans un autoclave à 120°C pendant 20mn.

- **Milieu complexe semi solide**

Extrait de levure.....	5 g/l
NaCl.....	250g/l
KCl.....	2g/l
MgSO4.....	20g/l
Citrate tri-sodique.....	3g/l
Agar.....	10g/l
Eau distillée.....	1000ml

Le pH est ajusté à 7 avec (HCl/NaOH)

Stérilisation dans un autoclave à 120°C pendant 20mn.

**Milieu A: g/L**

NaCl.....	250g
KCl.....	2g
MgSO4.....	20g
FeCl2.....	0,023g
Extrait de levure.....	10g
Extrait de viande.....	7,5g
Na.Citrate.....	3g



**Milieu B :g/l**

NaCl.....	125g
Extrait de levure.....	5g
CaCl <sub>2</sub> .....	0,12g
Peptone.....	5g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	5g
MgCl <sub>2</sub> .....	50g

**Milieu Halobacterium : g/L**

NaCl.....	250g
KCl.....	5g
MgSO <sub>4</sub> .....	10g
CaCl <sub>2</sub> .....	0,2g
Extrait de levure.....	5g
peptone pancréatique.....	3g

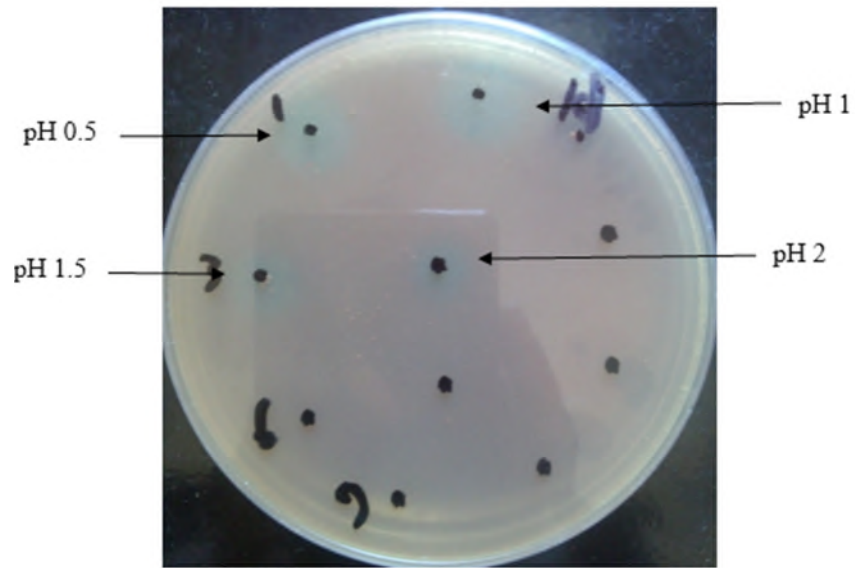


Figure 18 : photographie des zones d'inhibitions totales obtenues après extraction des protéines à différents pH

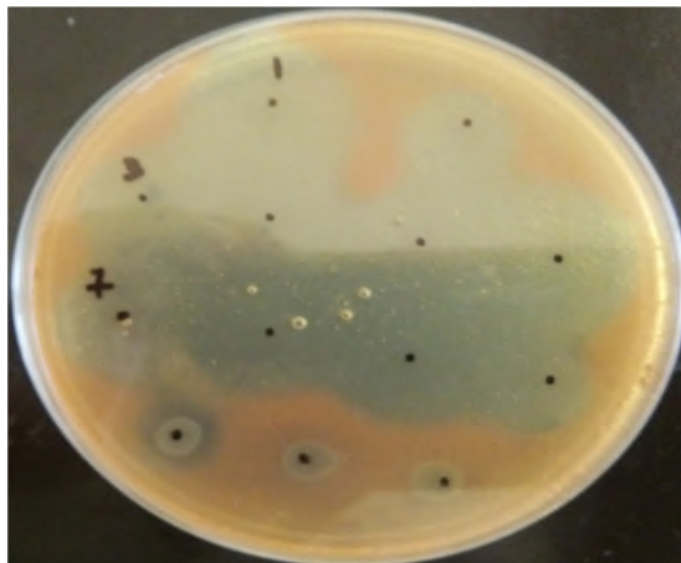


Figure 19 : photographie de l'activité de l'extrait protéique S15 sur *H. salinarum* DSMZ3754 récupéré dans différents tampon de pH

Tableau I : Effet des Ph sur la substance antibiotique

pH	ZI de EP s15 (mm)	ZI de SCs1 (mm)
Témoin	25	6
Témoin- (tampon pH sans les substances actives)	00	
1	14	6
2	16	6
3	22	6
4	19	6
5	23	6
6	17	6
7	17	6
8	16	3
9	14	0
10	11	0
11	06	0
12	04	0

Tableau II : effet de EP S15 sur la croissance de *Halobacterium salinarum*

Temps 'h)	T	20	30	50
24	0,33	0,36	0,35	0
48	0,33	0,11	0,06	0

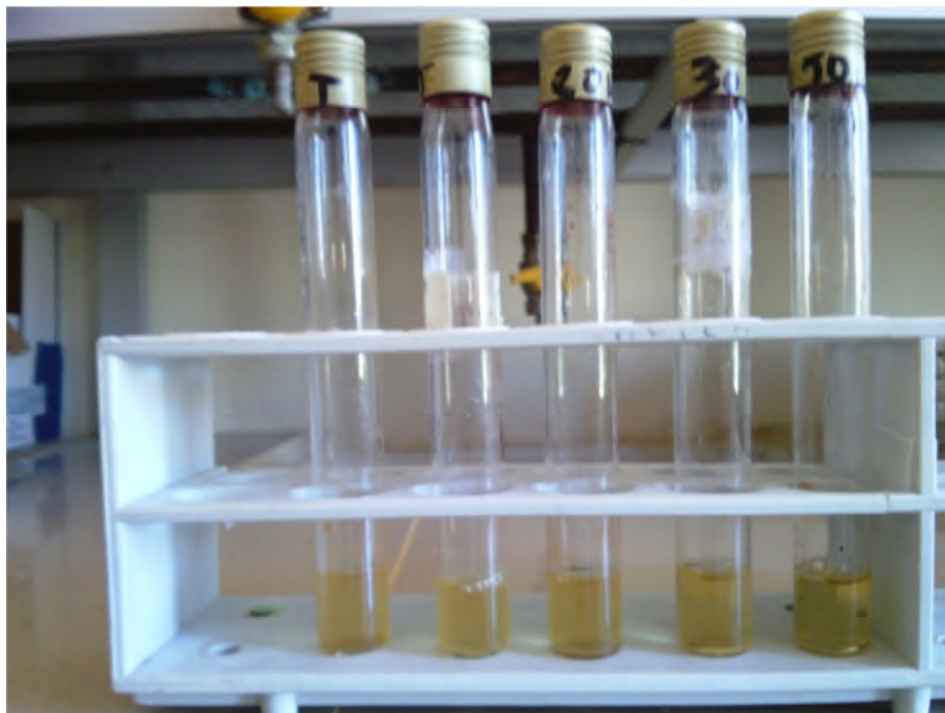


Figure 20 : photographie de l'effet de EP S15 sur la croissance de *Halobacterium salinarum* t, t+MC, +20µl, +30µl, +50µl respectivement.

Tableau III : effet de EP S15 sur la biomasse de *Halobacterium salinarum*

Temps(h)	DO <sub>600nm</sub> de témoin	DO <sub>600nm</sub> 20µL EP 15
0	0,25	0,25
22	0,34	0,25
24	0,39	0,26
48	0,37	0,22
55	0,32	0,16



Tableau 21 : photographie de l'effet d'EP S15 sur la biomasse de *Halobacterium salinarum*

Tableau IV : DO<sub>600nm</sub> de l'absorbance de la souche S3.

DO <sub>600nm</sub>	0	26H	28H	30H	32H	34H
S3t	0,035	0,42	0,7	2	2,4	4,5
s3t+MC	0,035	0,1	0,4	1,9	2	4
s3t+scs15	0,035	0,07	0,5	1,8	1,6	0,4
s3t+scs1	0,035	0,25	0,5	1,7	2	0,7

Tableau V : mesure de l'absorbance des différentes solutions de BSA dilués avec SS

Concentration BSA finale $\mu\text{g} / (\text{ml})$	DO
0	0
250	0,5
500	1,05
750	1,24
1000	1,51

## Résumé

Les méthodes d'extraction et de caractérisation des substances antibiotiques produites par les Haloarchées et spécifiquement sur les Halocines a été faite par extraction acide et à froid, qui a permis d'extraire les substances actives ont été montrées une activité inhibitrice. Ainsi que certains paramètres physico-chimiques ont été effectués sur leurs stabilités sont : effet de pH allant de 1 à 12, les souches S1 et S15 ont montré une stabilité. Résistantes aux enzymes, la souche S1 résiste au pepsine et  $\alpha$ -amylase sensible à d'autres enzymes testés. Les souches S1 et S15 sont thermostables (résistent à une température de 100°C pendant 1h), comme résiste à certains solvants. La souche S15 agit sur d'autres microorganismes (*Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline).

Mots clés : Extraction, Caractérisation, Haloarchaea, Antibiotique, Halocines.

## Abstract

Extraction methods and characterization of antibiotic substances produced by Haloarchaea and specifically on Halocines was made by cold acid extraction, which allowed to extract the active substance have been shown inhibitory activity. As well as some physico-chemical parameters were performed on their stabilities are: pH effect ranging from 1 to 12, S1 and S15 strains showed stability. Resistant enzymes, the S1 strain resistant to pepsin and sensitive  $\alpha$ -amylase other enzymes tested. Strains S1 and S15 are heat stable (resistant to a temperature of 100 ° C for 1 hour), as resists some solvents. The S15 strain acts on other microorganisms (*methicillin-resistant staphylococcus aureus*).

Keywords: Extraction, characterization, Haloarchaea, Antibiotic, Halocines.