

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane MIRA
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Magister
En Microbiologie Appliquée

Thème

*Criblage de Souches Bactériennes Halophiles Extrêmes Locales
Productrices de Substances Antibactériennes*

Présenté par : **BENAOUDIA Lyes**

Membres du jury :

Présidente : **Mme SADOUN Dj.** Professeur, Université A/Mira, Béjaïa
Rapporteur : **M. BENALLAOUA S.** Professeur, Université A/Mira, Béjaïa
Examineurs : **M. ATMANI Dj.** Maître de Conférences, Université A/Mira, Béjaïa
M^{ell}. LOUAILECHE H. Professeur, Université A/Mira, Béjaïa

- Année 2007 -

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

- Mes chers parents et Ma chère femme*
- Mes frères, Mes Sœurs, Ma Belle Sœur ainsi que Ma Nièce Amel,*
- Mes deux Amis et Frères M. BOUCHENOVA F. et M. TAIB N.*

Remerciements

Au terme de ces trois années de travail passées dans le Laboratoire de Microbiologie Appliquée avec l'équipe de Biochimie microbienne, le moment est venu de remercier tous ceux qui m'ont, à divers titres, aidé.

En premier lieu, je remercie mon directeur de mémoire, M. BENALLAOUA Saïd, pour m'avoir accueilli dans le laboratoire de biochimie microbienne, pour son soutien inconditionnel qui a permis la réalisation de ce modeste travail. Sa patience, ces conseils et surtout la confiance qu'il m'a accordée sont dignes de ma plus sincère gratitude.

Aussi, je voudrais sincèrement exprimer ma profonde gratitude pour Mlle BOUKTIT Nadia, pour son aide précieuse notamment dans le suivi pratique. Je la remercie également pour ces conseils et ses encouragements incessants.

Je tiens à témoigner ma gratitude et mes plus sincères remerciements à Mme SADOUN Dj. qui me fait un immense honneur de présider le jury. Je souhaite exprimer toute ma reconnaissance à M. ATMANI Dj. et Mlle LOUAILECHE H. pour l'honneur qu'ils m'accordent en acceptant d'évaluer ce modeste travail.

Je remercie particulièrement M. BELHADI Djellali pour son aide précieuse qui ma permis d'isoler et de purifier des souches et pour avoir témoigné un intérêt particulier à ce travail.

Je remercie également tout le personnel du Laboratoire de Microbiologie Appliquée surtout : M. TOUATI A., Mme NABTI N. et Mlle MAAFERI F.

Je souhaite exprimer toute ma reconnaissance à M. ENACHE M., Docteur au centre de Collection des Microorganismes Japonais RIKEN BioResource, pour sa

disponibilité, ses nombreux conseils avisés et ses réponses à nos questions. Je remercie vivement Mr. OREN A. pour avoir trouvé le temps de répondre à nos questions.

Merci également à mes collègues de Candia particulièrement FEROU DJE A., SAADI H., ABBAS S. et KHERAZ M. pour leur aide précieuse dans mon travail à l'unité Tchîn-Lait. Je remercie KHERAZ A., directeur de production de l'unité Tchîn-Lait (Candia) de m'avoir facilité la tâche à l'unité qui m'a permis d'organiser mes heures de travail ainsi que tout les responsables de production (AOUADENE A.M., ZAIDIA AH., MADDI A., BENALI Y., ATROUCHE L. et BERKATI H.).

Je n'oublie évidemment pas les membres de la promotion de microbiologie appliquée, ainsi que tous les enseignants qui ont contribué à ma formation.

Liste des Abréviations

AP	: A cide P hosphatidique
DO	: D ensité O ptique
<i>E. coli</i>	: <i>E</i> scherichia <i>coli</i>
EDTA	: acide E thylène- D iamine- T étra A cétique
EP	: E au P hysiologique
EPHS	: E au P hysiologique H yper S alée
PG	: P hosphatidyl G lycérol
PGP-Me	: P hosphatidyl- G lycéro P hosphate M éthyle ester
PGS	: P hosphatidyl- G lycéro S ulfate
rpm	: r evolutions p er m inute
S	: S urnageant
SC	: S urnageant C oncentré
SDS	: S odium D odecyl S ulfate

Liste des Figures

Figure 1 : Arbre phylogénétique universel de la vie	5
Figure 2 : Les différentes structures des cores lipidiques chez les Halobactéries.....	8
Figure 3 : Structure de quelques phospholipides des Halophiles extrêmes.....	9
Figure 4 : Fabrique de sel près de San Francisco (rougissement de la saumure).....	12
Figure 5 : Schéma de la classification des bactériocines des bactéries Gram positives	17
Figure 6: Carte de la région de Béjaïa (http://www.Bgayet.net)	29
Figure 7 : Isolement des souches à partir de l'eau.....	31
Figure 8 : Isolement des souches à partir du sol.....	32
Figure 9 : Test d'antagonisme sur milieu solide	34
Figure 10 : Culture en Fermenteur	39
Figure 11 : Protocole de recherche de l'agent antibactérien dans le culot	40
Figure 12 : Recherche de l'activité antibactérienne dans le surnageant.....	41
Figure 13 : Mise en évidence de l'activité antibactérienne dans le surnageant de culture de la deuxième souche	42
Figure 14 : Antagonisme du SC vis-à-vis des germes non halophiles	46
Figure 15 : Quelques photos illustrant l'activité antibactérienne par la méthode des disques d'agar.....	49
Figure 16 : Observations macroscopiques des souches.....	50
Figure 17 : Photos microscopiques de quelques souches halophiles extrêmes étudiées (Forme et Gram) (Grossissement 12x100).....	51
Figure 18 : Cinétique de croissance des souches CD2 et MD3.....	54
Figure 19 : Résultats de la mise en évidence de l'activité antibactérienne dans le surnageant (CD2).....	55
Figure 20 : Résultats de la mise en évidence de l'activité antibactérienne dans le surnageant (MD3).....	56
Figure 21 : Test d'activité du surnageant concentré (CD2) neutralisé vis-à-vis de la souche CD3.....	58
Figure 22 : Effet de la catalase sur l'activité du surnageant concentré	59
Figure 23 : Effet de la température sur l'activité des surnageants concentrés	60
Figure 24 : Effet de la pronase sur le surnageant concentré (MD3).....	61

Liste des Tableaux

Tableau I: Classification des microorganismes en fonction.....	4
Tableau II : Caractéristiques de quelques genres d'Archaea halophiles	7
Tableau III : Distribution des lipides polaires de quelques genres halophiles extrêmes.....	9
Tableau IV : Exemples de bactériocines produites par des souches Gram positives.....	19
Tableau V : Milieux de culture et températures d'incubation des souches halophiles isolées...35	
Tableau VI : Souches isolées à partir des salines de SEDDOUK et FERAOUN	48
Tableau VII: Souches douées d'activité vis-à-vis des germes halophiles	48
Tableau IX : Quelques caractères des souches sélectionnées.....	51
Tableau X : Croissance des souches à différentes concentrations en NaCl (optimum de croissance)	52
Tableau XI : Résultats de l'antibiogramme	53
Tableau XII : Diamètres des zones d'inhibition des surnageants brut et concentré.....	56
Tableau XIII : Résultats des tests d'activité après traitement des surnageants concentré à la catalase	59
Tableau XIV : Résultats de l'effet des protéases sur les surnageant concentrés.....	60
Tableau XV : Résultats des tests d'activité du surnageant concentré dialysé (souche CD2)....	62

Sommaire

Introduction	1
---------------------------	----------

Synthèse Bibliographique

Chapitre I : Les halophiles extrêmes	2
---	----------

Historique	2
-------------------------	----------

I.1. Définition des halophiles	3
---	----------

I.2. Les Archaea Halophiles extrêmes (Halobactéries ou Haloarchaea)	4
--	----------

I.2.1. Caractéristiques des haloarchaea	5
---	---

I.2.2. Les lipides membranaires des Halobactéries	8
---	---

I.2.3. Conditions de culture des halobactéries	10
--	----

I.3. Ecologie des microorganismes halophiles extrêmes	11
--	-----------

I.4. Intérêt des halophiles extrêmes	13
---	-----------

Chapitre II : Les Bactériocines	15
--	-----------

II.1. Bactériocines des bactéries Gram positives	16
---	-----------

II.2. Bactériocines des bactéries Gram négatives	21
---	-----------

Chapitre III : Les Archaeocines	23
--	-----------

III.1. Microhalocines (≤ 10 kDa)	24
---	-----------

III.1.1. Halocine S8 (HalS8)	24
------------------------------------	----

III.1.2. Halocine R1 (HalR1)	24
------------------------------------	----

III.1.3. Halocine H6/H7	25
-------------------------------	----

III.1.4. Halocine A4 (HalA4)	26
------------------------------------	----

III.1.5. Halocine C8 (HalC8)	26
------------------------------------	----

III.2. Halocines (> 10 kDa)	26
--	-----------

III.2.1. Halocine H1 (HalH1)	26
------------------------------------	----

III.2.2. Halocine H4 (HalH4)	27
------------------------------------	----

III.3. Application des Halocines	27
---	----

Partie Pratique

Chapitre I : Matériel et Méthodes	29
I.1. Sites de prélèvements et échantillonnage	29
I.2. Milieux de culture	30
I.2.1. Composition	30
I.2.2. Préparation	31
I.3. Isolement et purification des souches	32
I.3.1. Isolement à partir de l'eau.....	32
I.3.2. Isolement à partir du sol.....	33
I.3.3. Isolement à partir des sédiments	34
I.3.4. Purification des souches.....	34
I.4. Test d'antagonisme en milieu solide	34
I.5. Etude des souches sélectionnées	36
I.5.1. Caractères morphologiques et cultureux.....	36
I.5.2. Standardisation des inocula.....	36
I.5.3. Concentration optimale en NaCl.....	37
I.5.4. Sensibilité des souches aux antibiotiques	37
I.5.5. Recherche de la catalase.....	37
I.5.6. Recherche de l'oxydase.....	38
I.5.7. Cinétique de croissance.....	38
I.6. Mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches CD2 et MD3 sur milieu liquide	38
I.6.1. Test d'activité antibactérienne par la méthode des puits	39
I.6.2. Mise en évidence de l'activité antibactérienne chez la souche CD2	39
I.6.2.1. Recherche de l'activité dans le culot.....	40
I.6.2.2. Recherche de l'activité dans le surnageant	42
I.6.3. Mise en évidence de l'activité antibactérienne chez la souche MD3	43

I.7. Caractérisation des agents antibactériens produits par les souches CD2 et MD3	44
I.7.1. Effet des protéases sur l'activité des surnageants concentrés	44
I.7.2. Effet du pH sur l'activité des surnageants concentrés	44
I.7.3. Effet de la température sur l'activité antibactérienne des surnageants concentrés	45
I.7.4. Action de la catalase sur l'activité des surnageants concentrés	45
I.7.5. Action de la ribonucléase sur les surnageants concentrés.....	45
I.7.6. Action des surnageants concentrés dialysés vis-à-vis des souches halophiles extrêmes et non halophiles	46
Chapitre II : Résultats et Discussions _____	48
II.1. Isolement et purification	48
II.2. Sélection des souches présentant une activité antibactérienne sur milieu solide	49
II.3. Etude phénotypique	50
II.3.1. Description des colonies des souches étudiées.....	50
II.3.2. Etude biochimique	52
II.3.3. La concentration optimale en NaCl	53
II.3.4. Sensibilité aux antibiotiques	53
II.3.5. Cinétique de croissance des souches CD2 et MD3	54
II.4. Mise en évidence de l'activité antibactérienne de CD2 et MD3 sur milieux liquides	56
II.4.1. Recherche de l'activité antibactérienne dans les surnageants	56
II.4.1.1. Souche CD2	56
II.4.1.2. Souche MD3	57
II.4.2. Recherche de l'activité antibactérienne dans les Culots.....	58
II.5. Caractérisation des agents antibactériens	59
II.5.1. Effet du pH sur l'activité des surnageants concentrés	59

II.5.2. Effet de la catalase sur l'activité des surnageants concentrés.....	60
II.5.3. Effet de la température sur l'activité des surnageants concentré.....	61
II.5.4. Effet des protéases et de la ribonucléase A sur l'activité des surnageants concentrés	62
II.5.5. Résultats de la dialyse des surnageants concentrés	63
Conclusion	64
Références	
Annexes	

Introduction

L'extrémophilie désigne l'aptitude de certains organismes à se développer dans des conditions physiques et chimiques défavorables pour la plupart des organismes vivants. Parmi les domaines les plus étudiés de l'extrémophilie se trouvent les hautes températures (thermophilie), mais aussi les fortes salinités (halophilie).

Les milieux hypersalés sont des écosystèmes extrêmes hébergeant une microflore bactérienne particulière adaptée à ces habitats appelée microflore halophile extrême. Cette adaptation est la raison principale de leur étude intensive.

Ces microorganismes atypiques pouvant synthétiser, en conditions de laboratoire, de nouvelles molécules bioactives constituent un outil performant pour la recherche fondamentale du fait qu'ils représentent un modèle unique de stabilité des biomolécules aux conditions extrêmes de l'environnement. Ils représentent donc une source potentielle de nouvelles molécules actives (antibiotiques, halocines, exopolysaccharides, osmorégulateurs, enzymes, etc.) qui peuvent être utilisées dans plusieurs domaines (pharmaceutique, alimentaire, agronomique et clinique).

Dans le domaine agroalimentaire, le recours à des modes de conservation chimique et physique des aliments, constitue des axes de recherche auxquels vient naturellement s'ajouter la voie biologique, qui est à ce titre particulièrement intéressante. Cette alternative, doit nécessairement passer par une phase de criblage de microorganismes capables de synthétiser des substances antibactériennes nouvelles.

La production de substances similaires aux bactériocines par les halophiles extrêmes «les halocines» est une caractéristique universelle de ces microorganismes (Torreblanca et *al.*, 1994). La stabilité aux sels des halocines pourrait être utilisée dans la conservation de produits alimentaires salés.

Cette étude s'intègre dans un cadre de valorisation biotechnologique des ressources microbiennes extremophiles locales. Dans un 1^{er} temps un isolement et une purification des souches à partir de sites locaux ont été entrepris. La deuxième étape a consisté à un criblage de souches présentant une activité antibactérienne. La dernière étape est consacrée à la caractérisation des substances actives.

SYNTHÈSE

BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Les halophiles extrêmes	2
I.1. Définition des halophiles.....	3
I.2. Les Archaea Halophiles extrêmes (Halobactéries ou Haloarchaea).....	4
I.3. Ecologie des microorganismes halophiles extrêmes.....	11
I.4. Intérêt des halophiles extrêmes.....	13
Chapitre II : Les Bactériocines	15
II.1. Bactériocines des bactéries Gram positives.....	16
II.2. Bactériocines des bactéries Gram négatives.....	21
Chapitre III : Les Archaeocines	23
III.1. Microhalocines (≤ 10 kDa).....	24
III.2. Halocines (> 10 kDa).....	26

CHAPITRE I

LES HALOPHILES EXTREMES

Historique

Les premières bactéries rouges ont été décrites pour la première fois en 1879 par Poulsen et fortement étudiées jusqu'à 1915 en raison de leur importance économique (Vreeland, 1992). Klebahn (1919) cité par Grant et ses collaborateurs (2001) établit des critères morphologiques et physiologiques et isola un bacille pléomorphe rouge, à partir du poisson salé, qu'il nomma *Bacillus halobius ruber*. En 1922, Harrison et Kennedy isolèrent une souche pratiquement identique qu'ils nommèrent *Pseudomonas salinaria* (Grant et al., 2001). Dix ans après, Petter changea le nom de *Bacillus halobius ruber* en *Bacterium halobium*. Lockhead (1934) a renommé la souche *Pseudomonas salinria* en *Serratia salinaria* (Vreeland, 1992).

Jusqu'en 1957, il n'y avait que 4 espèces reconnues par la septième édition du Bergey's manuel (*Halobacterium salinarum*, *Halobacterium cutirubrum*, *Halobacterium marismortui* et *Halobacterium trapanicum*) (Grant et al., 2001).

Jusqu'en 1982 une situation confuse s'est installée autour de la taxonomie des halobactéries. Plusieurs de ces auteurs ont travaillé durant une période où la taxonomie bactérienne est réalisée en utilisant un nombre très limité d'analyses qui souvent ne sont pas les mêmes. Par conséquent, les similitudes entre les différents isolats sont passées inaperçues. Cette confusion sera seulement résolue après l'introduction des études phylogénétiques (Vreeland, 1992).

En 1984, Tindall et ses collaborateurs cités par Vreeland (1992) ont décrit deux nouveaux genres de microorganismes haloalcalophiles (*Natronobacterium* et *Natronococcus*) et peu de temps après, Torreblanca et ses collaborateurs (1986) ont proposé de diviser le genre *Halobacterium* en trois nouveaux genres à savoir *Halobacterium*, *Haloferax* et *Haloarcula*. Jusqu'en 1986, la famille des *Halobacteriaceae* comportait six genres et plusieurs espèces (Vreeland, 1992).

Aujourd'hui les études sur les halophiles extrêmes se sont diversifiées et plusieurs genres et espèces ont été décrits en combinant les études phylogénétiques avec les études physiologiques et chimiotaxonomiques, particulièrement l'analyse des lipides membranaires (Kamekura et Dyll-Smith, 1995 ; Oren et *al.*, 1997 ; Hezayen et *al.*, 2002).

I.1. Définition des halophiles

Les microorganismes halophiles sont définis comme étant des organismes « **qui aiment le sel** » (**Salt-Loving**). le nom **halophile** est utilisé généralement pour désigner les microorganismes exigeants une certaine quantité de sel qui est presque toujours le chlorure de sodium. La distinction entre les différents groupes de microorganismes halophiles est basée sur leur niveau d'exigence ou de tolérance aux sels (Kushner, 1992).

En se basant sur la faculté des microorganismes à se développer sur des milieux à différentes concentrations en NaCl, Larsen (1962) a défini différents groupes de microorganismes : Les non halophiles, les faiblement halophiles, les modérément halophiles et les halophiles extrêmes ; ce sont des microorganismes qui présentent une bonne croissance sur des milieux dont la concentration en NaCl est, respectivement, inférieure à 2%, de 2 à 5%, de 5 à 20% et de 20 à 30% (Kushner, 1992).

Depuis, des centaines de bactéries ont été découvertes, selon leur capacité à se développer sur des milieux de concentrations différentes en sel. Des microorganismes intermédiaires aux groupes précédents ont pu être isolés, cela a rendu cette classification nécessairement arbitraire (Kushner, 1992).

En 1978, Kushner a repris la même classification que Larsen et lui rajouta deux nouveaux groupes (Tableau I) : le groupe **Borderline extrême halophile**, ce sont des microorganismes dont la concentration optimale en NaCl est de 2 à 3 M ainsi que le groupe **halotolérant**, ce sont des non halophiles qui peuvent tolérer une concentration élevée en sel ; les halotolérants extrêmes peuvent se développer jusqu'à 2,5M de NaCl (Kushner, 1992).

Tableau I: Classification des microorganismes en fonction de leur tolérance au sel (NaCl) (Kushner, 1992).

Groupes	Concentration en NaCl (M et %)		
	Minimale	Optimale	Maximale
Non halophile	–	< 0,2 (1,16%)	0,3 -1
Faiblement halophile	0,2	0,2-0,5 1,16%-2,9%	2,0
Modérément halophile	0,4	0,5-2,0 2,9%-11,6%	3 -3,5
Borderline extrême halophile	1,0	2,0-3,0 11,6%-17,4%	4,0
Extrême halophile	2,0 (11,6%)	3,0-4,0 17,4%-23,2%	5,2 (29%)
Halotolérant	0-2,5 (14,5%)		
Halophile facultatif	Exigent 0,5M de NaCl seulement sous certaines conditions environnementales		

I.2. Les Archaea halophiles extrêmes (Halobactéries ou Haloarchaea)

Les microorganismes halophiles extrêmes existent dans les trois domaines de la vie à savoir : la famille des *Halobacteriaceae* (**Archaea**), les algues vertes unicellulaires du genre *Dunalliella* (**Eucarya**) et l'espèce *Salinebacter ruber* (Oren, 2002a) ou *Actinopolyspora halophila* (**Bacteria**) (Kamekura, 1998).

L'arbre phylogénétique universel de la vie illustré dans la figure 1 a été établi en se basant sur les séquences nucléotidiques de l'ARNr 16S. Les branches foncées (en gras) représentent les halophiles qui se développent à des concentrations de sels supérieures à 100g/l (Oren, 2002a).

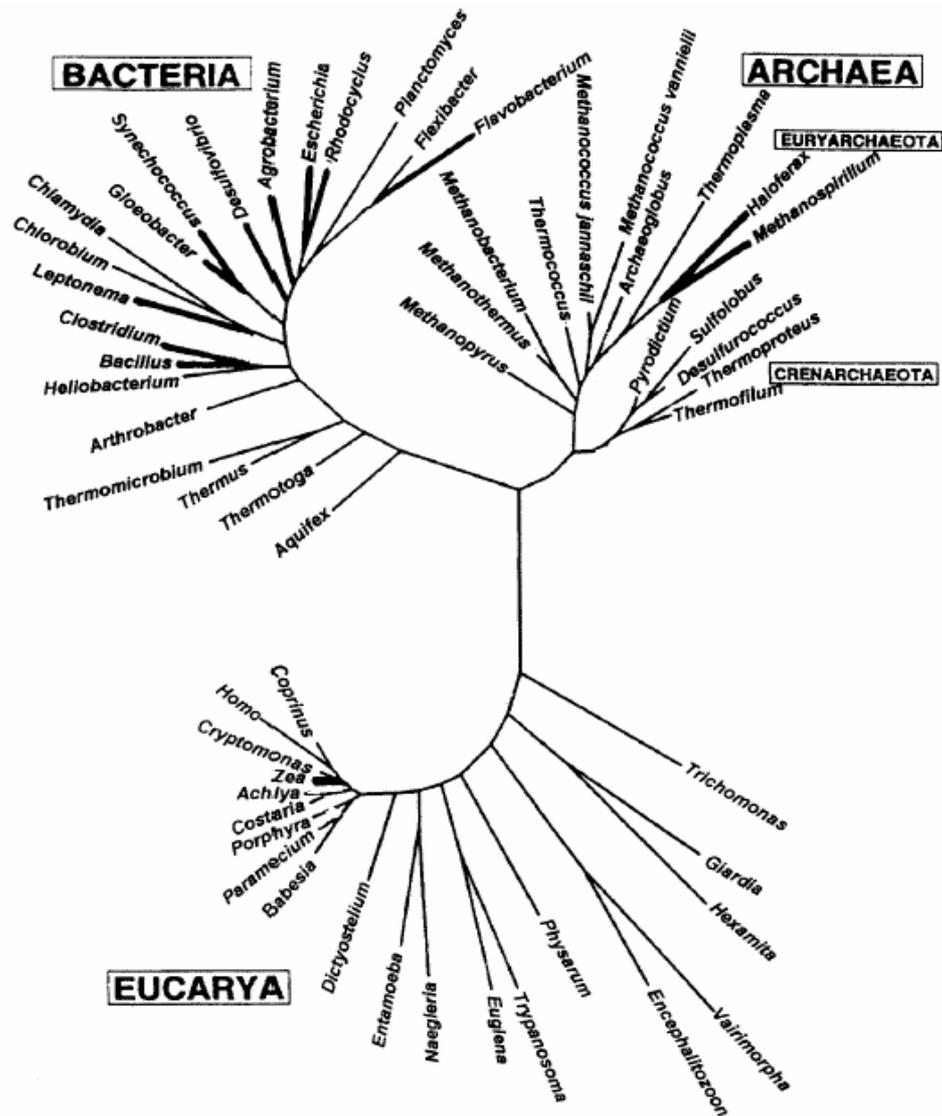


Figure 1 : Arbre phylogénétique universel de la vie (Oren, 2002a)

I.2.1. Caractéristiques des haloarchaea

Les Archaea halophiles extrêmes sont représentés par la famille des *Halobacteriaceae* et par les halophiles extrêmes méthanogènes anaérobies. Ces derniers sont regroupés dans deux genres, *Methanohalobium* et *Methanohalophile* de la famille des *Methanosarcinaceae* (Kamekura, 1998).

Les archaea halophiles appartenant à l'ordre *Halobacteriales*, famille des *Halobacteriaceae* sont considérés comme étant des halophiles par excellence (Oren, 2002b). Ce sont des microorganismes qui exigent 1,5 M de NaCl pour se développer et assurer la stabilité structurale des cellules (Joo et Kim, 2005). Mis à part quelques souches du genre *Natrialba* qui ne sont pas pigmentées, tout les membres de

la famille *Halobacteriaceae* sont pigmentés en rouge ou orange, ce qui est dû à la présence des pigments caroténoïdes C50 (Hezayen et al., 2002). Actuellement la famille *Halobacteriaceae* comporte 22 genres (Savage et al., 2007) qui se divisent essentiellement en deux groupes :

Les microorganismes qui se développent à **pH neutre** ou proche de la neutralité tels que les genres *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Haloferax* et *Halococcus*. Les microorganismes qui se développent à **pH alcalin** (8,5 à 11) sont dit haloalcalophiles tels que les genres *Natronobacterium* et *Natronococcus* (Grant et al., 2001).

Ce sont des **aérobies stricts** ou des **anaérobies facultatifs** et possèdent des temps de génération relativement longs (3 à 4 heures pour *Haloferax volcanii*, 8 à 12 heures pour *Halobacterium sp.*). Ce sont des chimioorganotrophes qui se développent dans des milieux complexes (peptone ou extrait de levure). Certaines espèces comme *Haloferax sp.*, peuvent se développer dans des milieux définis avec un sucre simple comme source de carbone. Quelques *Halobacterium sp.* peuvent produire la bacteriorhodopsine et utiliser la lumière du soleil comme une source d'énergie. Les halobactéries sont des microorganismes très sensibles aux traces de détergents (Dyall-Smith, 2006).

Les *Halobacteriaceae* possèdent **une paroi cellulaire peu commune**. Mis à part les Halococci, ces microorganismes n'ont pas de paroi rigide, mais seulement une seule couche de glycoprotéines qui est dite **couche-S (S-Layer)** (Kandler et König, 1998 ; Trachtenberg et al., 2000). Elle peut être facilement enlevée en traitant les cellules avec de l'EDTA (Dyall-Smith, 2006).

La forme des halobactéries est peu commune et peut changer selon les conditions de croissance. Les espèces du genre *Haloarcula* présentent souvent des formes géométriques (carrées ou triangulaires) et celles du genre *Haloferax* se présentent souvent en forme de tasse (décrite aussi comme des chips de pomme de terre). Les halobactéries qui n'ont pas de paroi cellulaire présentent un **Gram négatif** ; en raison de l'épaisseur de la paroi cellulaire riche en polysaccharides, les Halococci présentent un **Gram Positif** (Kandler et König, 1998 ; Dyall-Smith, 2006).

Le tableau ci-dessous illustre quelques caractéristiques de quelques genres haloarchéens.

Tableau II : Caractéristiques de quelques genres d'Archaea halophiles
(Savage et al., 2007)

Caractéristiques	1	2	3	4	5	6
Forme	Cocci	Bâtonnet	Cocci	Pléomorphe	Pléomorphe	Cocci
Taille des cellules (µm)	1-1,5	0,5 - 1 x 2 - 15	0,8 - 1,5	0,2 - 2 x 0,5 - 5	0,4 - 3 x 2 - 3	1 - 2
Concentration en NaCl (M)	1,4 - 5,2	2 - 5,2	2,1 - 5,2	1,7 - 5,2	1 - 5,2	1,4 - 5,2
Concentration optimale en NaCl (M)	3,4	3	2,6 - 4,3	2,5 - 4,3	1,7 - 4,3	2,5 - 3,6
Température optimale	40	37	30-40	35 - 55	32 - 50	35 - 45
pH optimal	9,5 - 10	9,5	6,8 - 9,5	6,5 - 7,5	6,4 - 7,5	9 - 10
Lyse dans l'eau distillée	-	+	-	+	+	-
ADN G+C (mol%)	61,5	65	59,5-66	60,1-65	59,1-64,5	63,5-64
Hydrolyse de :						
- L'amidon	-	-	V	V	V	V
- La caséine	-	ND	-	ND	V	ND
- Tween 80	-	ND	V	V	V	ND
Pigmentation	Orange	Rouge	Rouge	Rouge	Rouge/Rose	Rouge

+ : Présence ; - : Absence ; **ND** : Non Déterminé ; **V** : Variable

1 : *Halalkalicoccus* ; **2** : *Natronobacterium* ; **3** : *Halococcus* ;

4 : *Haloarcula* ; **5** : *Haloferax* ; **6** : *Natronococcus*

1.2.2. Les lipides membranaires des Halobactéries

Les membranes cellulaires des Archaea et particulièrement celles des halobactéries se caractérisent par leur lipides uniques qui contiennent des groupes phytanyl liés au glycérol par une liaison éther (Gibons *et al.*, 2005). La portion hydrophobe de ces lipides est dite « Core » (Kates, 1993).

On distingue différentes structures de cores lipidiques à savoir : le diphytanylglycerol diéther appelé « **Archaeol** » (Figure 2), le dibiphytanyldiglycerol tétraéther appelé **Caldarchaeol** et le dibiphytanyl glycérol nonitol tétraéther appelé « **nonitolcaldarchaeol** » et leurs dérivés (Kates, 1993).

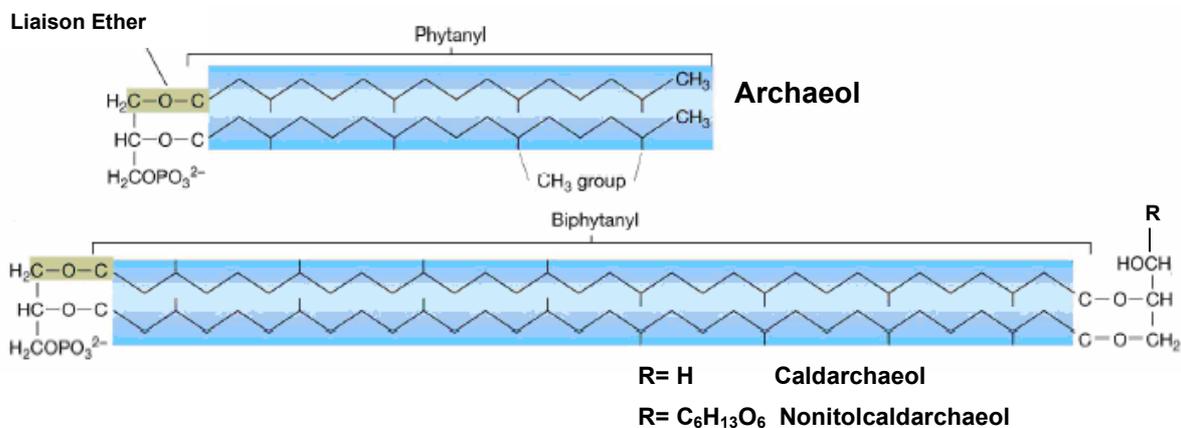
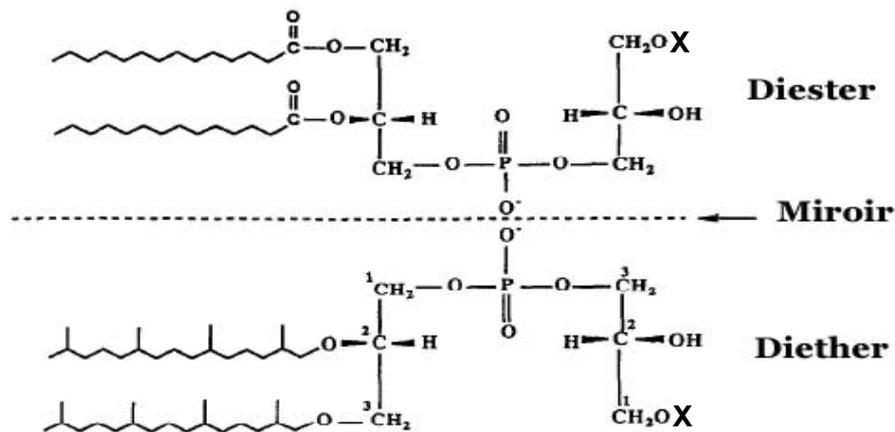


Figure 2 : Les différentes structures des cores lipidiques chez les Halobactéries (Kates, 1996)

Il existe une multitude de structures des lipides polaires chez les halobactéries (phospholipide et glycolipide) qui servent de marqueurs taxonomiques pour distinguer les genres tels que *Halobacterium*, *Haloferax*, *Haloarcula*, *Halococcus*, *Natronobacterium* et *Natronococcus* (Figure3). Il a été montré que le C20, C20 archaeol PGP-Me est le phospholipide majeur de tous ces genres et le C20, C20 archaeol PG ainsi que le PGS sont les phospholipides trouvés en quantité mineur, par contre, l'archaeol AP est trouvé à l'état de trace (Tableau III). Il apparaît que La combinaison entre la composition des glycolipides et phospholipides membranaires est suffisante pour déterminer le genre de chaque halobactérie (Kates, 1993 ; Kamekura et Kates, 1999).



<u>X</u>	<u>Abréviations</u>
H	PG
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ -\text{P}-(\text{OH})_2 \end{array}$	PGP
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ -\text{P}-\text{O}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{OH} \end{array}$	PGP-Me
$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \\ \diagdown \quad / \\ -\text{S}-\text{OH} \end{array}$	PGS

Figure 3 : Structure de quelques phospholipides des Halophiles extrêmes (Kates, 1996).

Tableau III : Distribution des lipides polaires de quelques genres halophiles extrêmes (Kates, 1993)

Genres	PGP- Me	PG	PGS	AP
<i>Halobacterium</i>	+++	+	+	Tr
<i>Haloarcula</i>	+++	+	++	Tr
<i>Haloferax</i>	++	+++	-	Tr
<i>Halococcus</i>	+++	+	-	+
<i>Natronobacterium</i>	+++	+	-	Tr
<i>Natronococcus</i>	+++	+	-	Tr

PGP Me : PhosphatidylGlyceroPhosphate Methylene ester ; **PG :** PhosphatidylGlycerol
AP : Acide Phosphatidique ; **PGS :** PhosphatidylGlyceroSulphate

I.2.3. Conditions de culture des halobactéries

Concentration de sel

Chez les halobactéries la concentration optimale de sel varie entre 15% et 25% en fonction des espèces, mais la plupart se développent à 23% (m/v, sel total). Les souches ayant une concentration optimale de sel faible, se développent bien à des concentrations de sel plus élevées, mais les souches ayant une concentration optimale de sel élevée se développent faiblement aux concentrations plus basses. Par exemple, *Haloferax volcanii* se développe bien à 15% (optimum autour de 18%), tandis que *Haloarcula hispanica* a besoin au moins de 23% pour une bonne croissance et se développe très mal à 18%. En outre, la stérilisation à l'autoclave des milieux contenant des concentrations élevées en sels minéraux peut provoquer la précipitation de quelques composés, pour cela des précautions spéciales doivent être prise avant la stérilisation (Dyall-Smith, 2006).

La température de croissance

La plupart des souches se développent mieux entre 30 et 40°C, et beaucoup sont légèrement thermophiles (par exemple 50°C pour *Halobacterium saccharovorum*). Même la souche *Halorubrum lacusprofundi* isolée en antarctique se développe de façon optimale aux environs de 30°C. La plupart des halobactéries ont un optimum de croissance à 37°C. Cependant, lors de l'incubation de ces souches, la seule précaution à prendre est d'éviter le dessèchement de la gélose lorsque le temps d'incubation est trop long, ainsi elles doivent être maintenues enveloppées dans des sachets en plastique, ou maintenues dans des récipients en plastique (Dyall-Smith, 2006).

Aération

La dissolution de l'oxygène est très faible dans les solutions à concentration de sels élevée (la solubilité de l'oxygène diminue avec l'augmentation du sel), particulièrement à la température élevée. Pour cela les cultures sur milieux liquides doivent être sous agitation, et le volume du milieu liquide doit être aux environs de 1/3 par rapport au volume du récipient (Dyall-Smith, 2006).

Le pH optimal de croissance

Un pH neutre semble être le mieux pour la croissance des *halobactéries* non alcalophiles (un pH de 7,2 à 7,5 est vivement recommandé). Pour les haloalcalophiles, leur pH optimal s'étend entre 8,5 et 9,5 (Dyall-Smith, 2006).

I.3. Ecologie des microorganismes halophiles extrêmes

Depuis des milliers d'années, la couleur rouge vif est toujours associée aux environnements hypersalés ayant des concentrations de sel avoisinant la saturation (figure 4). Cette couleur rouge est observée surtout lors du dernier stade d'évaporation des eaux salées comme elle est observée dans les lacs hypersalés tel que le grand lac salé (Utah), les saumures alcalines du Wadi Natrun (Egypte), le lac Magadi (Kenya) et dans la mer morte. Il a été aussi remarqué que des colonies rouges apparaissent dans les poissons traités avec du sel (obtenu par évaporation solaire) à des fins de conservation vis-à-vis des altérations microbiennes (Oren, 1992).

L'origine de cette couleur rouge, souvent trouvée dans les environnements hypersalés a été découverte au début du 20^{ème} siècle. Elle est provoquée par la présence de microorganismes bactériens (*Halobacterium* et autres genres) et par les caroténoïdes qui se trouvent dans les algues vertes du genre *Dunaliella* (Oren et Rodriguez-Valera, 2001 ; Oren, 2002b). Ainsi, même les environnements extrêmes (hostiles à la vie) caractérisés par l'absence de forme de vie ne sont pas totalement inhabités. Ils hébergent des microorganismes procaryotes et eucaryotes, parfois même des macroorganismes telle que les crevettes (*Artemia salina*) (Oren, 1992).

Plus l'environnement est salé, moins est la diversité des espèces (McGenity et al., 2000) et la structure de l'écosystème est plus simple (Rodriguez-Valera, 1992). Par contre, d'un point de vue quantitatif, les microorganismes halophiles extrêmes se trouvent à une densité élevée, le nombre de 10^7 à 10^8 de bactéries rouges par millilitre n'est pas rare dans ces environnements (Oren, 2002b).

La plupart des études écologiques réalisées dans le passé ont été restreintes à l'isolement et la caractérisation des microorganismes dans leurs environnements. Cette approche a fourni des informations précieuses sur la biodiversité présente dans ces

environnements. Cependant, le pourcentage de microorganismes cultivés sur gélose est généralement faible. Par conséquent, ce genre de données ne traduit pas la structure réelle de cette flore microbienne (Oren, 2002c).

L'application des techniques de la biologie moléculaire et particulièrement le séquençage de l'ARNr 16S a montré que ces microorganismes cultivables sur milieu de culture ne sont pas dominants dans les environnements naturels et que la majorité des microorganismes halophiles extrêmes, écologiquement intéressants, ne sont pas encore isolés (Oren, 2002c).

La plupart des environnements hypersalés engendrés par l'évaporation de l'eau de mer ont une composition chimique uniforme et se caractérisent par une concentration élevée en NaCl, ces derniers sont appelés **Thalassohaline** (Oren, 2002b) et ils sont trouvés surtout dans les salines de fabrication de sel par évaporation d'eau de mer, dans les sebkhas et dans les bords côtiers où l'évaporation est très élevée (Oren, 1992). Par contre les lacs fermés (Land Loked lake) ou encore les lacs désertiques (terminal desertic lakes) proviennent de plusieurs origines athalassohalines dont leur composition chimique est variable.



Figure 4 : Fabrique de sel près de San Francisco (rougissement de la saumure)
(DasSarma et Arora , 2001)

I.4. Intérêt des halophiles extrêmes

Ces microorganismes représentent un potentiel de biosynthèse intéressant de substances bioactives utilisables dans divers domaines.

Quelques applications des microorganismes halophiles sont très anciennes et existaient longtemps avant que les aspects microbiologiques des processus soit connus. La production de certains aliments fermentés traditionnels en Extrême-Orient, tels que la sauce de poissons et la sauce de soja, nécessite la présence d'une variété de microorganismes halophiles. La microbiologie de certains de ces processus n'est pas bien connue (Oren, 2002b).

Le β -carotène accumulé dans certains microorganismes halophiles extrêmes, contribue à l'absorption de l'énergie dans les saumures ce qui augmente l'évaporation d'eau et par conséquent l'augmentation de la production de sel (Litchfield, 2002).

La souche *Haloferax mediterranei*, appartenant à la famille des *Halobacteriaceae*, produit un polymère, le β -hydroxyalcanoate (plus connus sous le nom de polyesters biodégradables), qui est utilisé comme source de matière plastique. La souche peut utiliser l'amidon comme source de carbone (bon marché) pour la production du polymère (Oren, 2002b).

Haloferax mediterranei produit également des quantités importantes d'exopolysaccharides qui peuvent être utilisés comme des gélifiants, des stabilisants ou des épaississants. Elle produit aussi un hétéropolysaccharide sulfaté qui possède une viscosité élevée à de faibles concentrations, ses propriétés rhéologiques sont excellentes, et il est résistant aux pH et températures extrêmes (Oren, 2002b).

Les Archaea halophiles peuvent être utilisés pour la dépollution des environnements par la dégradation des polluants organiques, et dans le traitement des eaux résiduaires concentrées du textile. La production de biosurfactants par les bactéries halophiles peut jouer un rôle important dans la dépollution accélérée des environnements salins pollués par les huiles (Shiraldi et al., 2002 ; Joo et Kim, 2005 ; Romano et al., 2005).

Plusieurs enzymes halophiles ont été testées pour des applications biotechnologiques potentielles à savoir des amylases, des nucléases, et des protéases (Oren, 2002b). Ces enzymes sont fonctionnelles sous des concentrations de sel élevées

où la plupart des protéines sont précipitées ou dénaturée. La plupart des enzymes halophiles sont inactivées et dénaturées à des concentrations de NaCl inférieures à 1M (Joo et Kim, 2005). Cette halotolérance des enzymes peut être exploitée dans toutes les transformations enzymatiques nécessitant une activité de l'eau très basse ou un environnement très salé (Oren, 2002b).

Certains solutés organiques, comme l'éctoine, sont produits à des concentrations élevées à l'intérieur de beaucoup de micro-organismes halophiles en tant qu'osmorégulateurs. Ces substances sont utilisées comme des stabilisants des biomolécules (enzymes et ADN) (Joo et Kim, 2005). Une autre application prometteuse est l'utilisation de la glycine bêtaïne (osmorégulateur produit par certains halophiles) comme un cryoprotecteur lors de la lyophilisation des bactéries (Cleland et *al.*, 2004). Les halobactéries produisent des substances antibactériennes de nature protéique (bactériocines) nommées Halocines (Litchfield, 2002).

CHAPITRE II

LES BACTERIOCINES

La découverte des bactériocines revient à Gratia qui, en 1925, constata qu'une souche d'*Escherichia coli* V, exerçait un antagonisme très spécifique sur une autre souche d'*Escherichia coli* φ. Cette bactériocine a été appelée «principe V», elle est thermostable et précipitable par l'acétone (Moustardier, 1972 ; Cascales et *al.*, 2007). C'est en 1946, que cette substance fut dénommée «colicine» par Gratia et Frédérique (Cascales et *al.*, 2007).

Par la suite, l'appellation commune de «bactériocine» fut donnée par Jacob et ses collaborateurs en 1956, après qu'on est trouvé des substances analogues à la colicine dans d'autres groupes que celui des entérobactéries (Moustardier, 1972).

Les bactériocines sont des molécules de nature protéique, synthétisées par voie ribosomique, sécrétées dans le milieu extracellulaire et douées d'une activité bactéricide dirigée essentiellement contre des espèces taxonomiquement très proches de l'organisme producteur (Tagg et *al.*, 1976 ; Jack et *al.*, 1995). L'acronyme BLIS (Substance Inhibitrice Bacteriocine-Like) est réservé pour les substances antibactériennes qui ne sont pas encore totalement caractérisées (Heng et *al.*, 2007).

Bien qu'il y ait eu beaucoup de discussions au sujet de leur rôle dans la nature, il semble que la raison de l'existence des bactériocines est de fournir à l'organisme producteur un avantage écologique par rapport aux autres bactéries se développant dans le même environnement (Riley et Wertz, 2002).

Selon Heng et *al.* (2007), les bactériocines devraient être indispensables à l'existence et la persistance des lignées bactériennes et archéennes dans la nature. Cependant, dans les conditions de laboratoire où les bactéries sont cultivées en absence de bactéries antagonistes (en des conditions optimales, sans stress et en présence d'un excès de nutriments), ces bactéries peuvent éviter la production de bactériocines.

Il semblerait que tous les membres des Eubactéries et des Archaea, ont une capacité à produire des bactériocines quand elles sont fraîchement isolées à partir de leurs écosystèmes naturels. Lorsque aucune bactériocine n'est produite par un isolat bactérien, cela est dû seulement au fait que les chercheurs n'ont pas encore défini les conditions appropriées d'expression ou de détection de la bactériocine *in vitro*.

Les conditions optimales pour la croissance des souches productrices ne coïncident pas nécessairement avec une production optimale de bactériocine. En effet, la production de bactériocines peut être augmentée quand les cellules productrices sont relativement stressées d'un point de vue nutritionnel ou environnemental (Heng et *al.*, 2007).

Au cours de la dernière décennie, de nombreux groupes de recherche ont consacré beaucoup d'efforts pour l'étude de ce type de substances utilisées comme agents de conservation en industrie alimentaire. Elles empêchent la prolifération de certains agents pathogènes d'origine alimentaire et de certaines maladies infectieuses (Jack et *al.*, 1995).

Les bactéries Gram positives et Gram négatives produisent ce type de substances, toutefois les bactériocines de chaque groupe présentent des caractéristiques bien distinctes.

II.1. Bactériocines des bactéries Gram positives

L'étude de référence sur les bactériocines des bactéries Gram positives est celle de Mattick et Hirsch (1947) qui révèle qu'une partie de l'activité inhibitrice des lactocoques, vis-à-vis des bactéries lactiques, est due à une molécule caractérisée comme étant une protéine antimicrobienne appelée «substance inhibitrice du groupe N» ou nisine (Heng et *al.*, 2007).

Jusqu'à présent c'est la seule bactériocine autorisée comme additif alimentaire, dans plus de cinquante pays (Morisset et *al.*, 2005).

Le succès commercial spectaculaire de la nisine a stimulé la recherche dans le domaine des bactériocines. Durant les trois dernières décennies, la littérature scientifique dans le domaine des bactériocines était dominée par l'étude des bactériocines des bactéries lactiques (Heng et *al.*, 2007). Ainsi le nombre de bactériocines des bactéries

lactiques caractérisées a augmenté de façon importante au cours de ces dernières années (Morisset et *al.*, 2005).

En fonction des caractéristiques structurales, les bactériocines des bactéries lactiques sont regroupées en trois classes (**Classe I** : lantibiotiques, **Classe II** : bactériocines non-modifiées, thermostables et **Classe III** : bactériocines de grande taille, thermolabiles) selon Nes et ses collaborateurs (1996). En raison de la découverte de nouvelles bactériocines qui ne trouvent pas leur place dans cette classification, Kemperman et ses collaborateurs (2003) ont proposé la création d'une autre classe qui représente les peptides antibactériens cycliques.

Récemment Heng et ses collaborateurs (2007) ont proposé une nouvelle classification qui peut être élargie à toutes les bactériocines produites par les bactéries Gram positives (Figure 5).

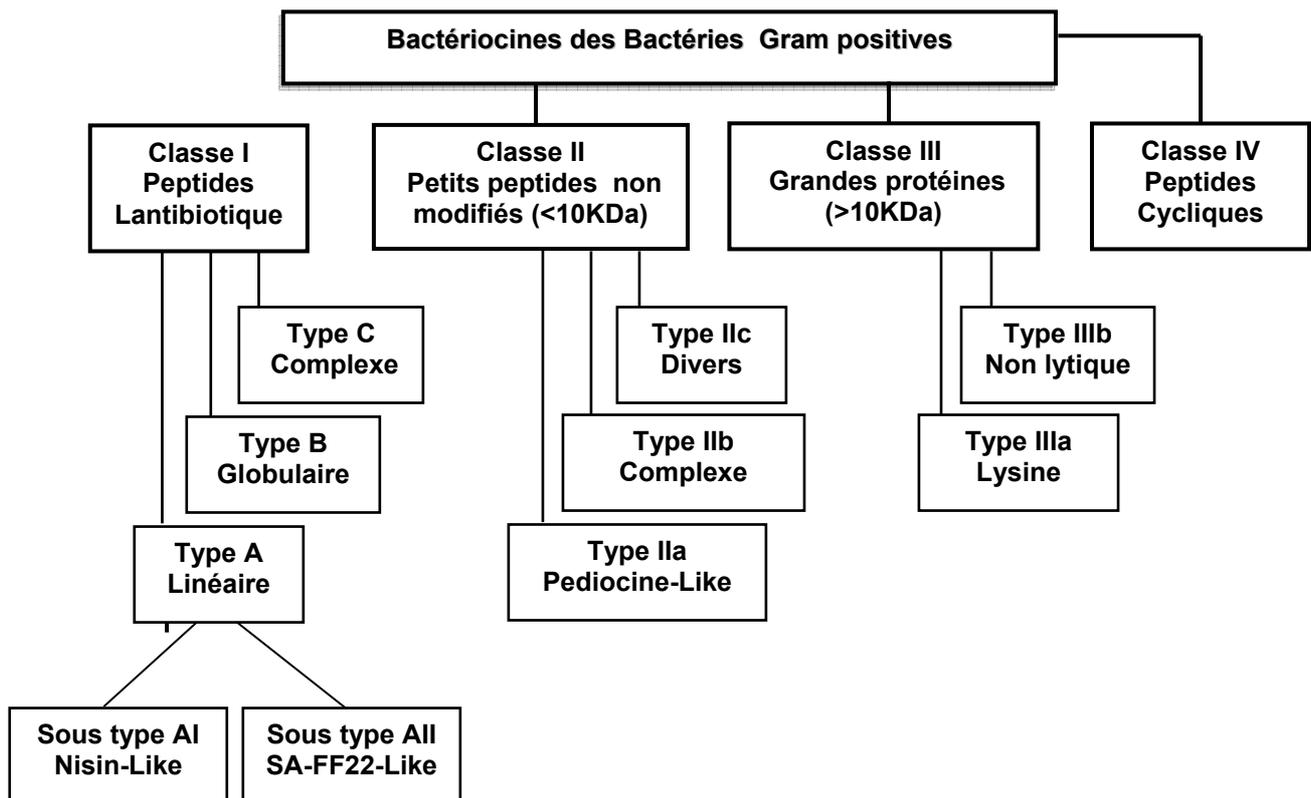


Figure 5 : Schéma de la classification des bactériocines des bactéries Gram positives Heng et *al.* (2007).

Classe I (Peptides lantibiotiques) : Il s'agit de peptides de taille réduite, contenant des acides aminés inhabituels obtenus par modification post-traductionnelle dont le plus caractéristique est la lanthionine (tableau IV). Pour souligner la présence de ce type d'acides aminés, les bactériocines de classe I ont été nommées lantibiotiques pour « *lanthionine containing antibiotics* ». La structure des lantibiotiques varie essentiellement en fonction de la localisation de ponts établis entre les acides aminés modifiés, ce qui permet de distinguer les types A (lantibiotique linéaire) et B (lantibiotique globulaire) (McAuliffe et *al.*, 2001). Afin de cerner les variétés de lantibiotiques à deux composants récemment décrites telle que la plantaricine, Heng et collaborateurs (2007) ont proposé de créer le type C. Il a été proposé également que les lantibiotiques de type A puissent être subdivisés en deux groupes (I et II) en fonction de leurs tailles, leurs charges et leurs séquences leaders (Heng et *al.*, 2007).

Tableau IV : Exemples de bactériocines produites par des souches Gram positives
(Heng et al., 2007)

Classe	Bactériocines	Souches productrices
Classe I	Type A : Nisine A Salivaricine	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Streptococcus salivarius</i>
	Type B : Mersacidine Cinnamycine	<i>Bacillus sp.</i> <i>Streptomyces cinnamoneus</i>
	Type C : Cytolysine Lacticine 3147	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Lactococcus lactis</i>
Classe II	Type IIa : Pediocine PA1 Listeriocine 743A	<i>Pediococcus acidilactici</i> <i>Listeria innocua</i>
	Type IIb : Enterocine L50 Plantaricine	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>
	Type IIc : Aureocine A53 Sakacine Q	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Lactobacillus sakei</i>
Classe III	Type IIIa : Enterolysine A Millericine B	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Streptococcus milleri</i>
	Type IIIb : Helviticine J	<i>Lactobacillus helveticus</i>
Classe IV	Circularine A Reutericine 6	<i>Clostridium beijerinckii</i> <i>Lactobacillus reuteri</i>

Classe II (petits peptides non modifiés) : elle est constituée essentiellement de petites bactériocines (<10 kDa), sans modification post-traductionnelle (non lantibiotique et acyclique) produites par les bactéries Gram positives. Cette catégorie est la plus largement représentée avec plus de 50 bactériocines caractérisées avec des origines diverses, allant des genres qui colonisent la cavité buccale et le tractus gastro-intestinal (humain et animal) aux espèces les plus connues pour leur utilisation dans l'industrie laitière et alimentaire d'une manière générale. Ce qui a conduit à la création de trois groupes (Heng et al., 2007):

- Type IIa (Pediocines Like) qui regroupe le plus grand nombre de bactériocines, environ 20 membres. Elles se caractérisent principalement par leur action vis-à-vis de *Listeria monocytogenes* (Ennahar et al., 2000);
- Type IIb (Complexe) regroupe les bactériocines qui exigent deux peptides ou plus pour exercer leur action inhibitrice ;
- Type IIc (bactériocines non modifiées diverses) regroupe des peptides variés.

Classe III (les grandes bactériocines) : elle est constituée de bactériocines de grande taille (>10 kDa). Il s'agit de protéines thermolabiles qui se divisent généralement en deux groupes : les enzymes bactériolytiques (ou bactériolysines), qui inhibent les souches sensibles par lyse cellulaire, et les protéines antimicrobiennes non lytiques (Heng et al., 2007).

Classe IV (les bactériocines cycliques) : elle regroupe des agents inhibiteurs circulaires de synthèse ribosomale modifiés post-traditionnellement tels que les premiers et derniers acides aminés du peptide (Heng et al., 2007).

II.2. Bactériocines des bactéries Gram négatives

Les bactéries Gram négatives produisent une grande variété de bactériocines, dont la nomenclature est fonction du nom du genre (klebicine de *Klebsiella pneumoniae*) ou des espèces (colicine d'*Escherichia coli*) des bactéries productrices. Les bactériocines produites par les bactéries du genre *Pseudomonas* sont désignées généralement sous le nom de pyocines (Chavan et Riley, 2007). La plupart des bactériocines des bactéries

Gram négatives ont un spectre d'activité large comparé aux bactériocines des bactéries Gram positives. Cette diversité des bactériocines Gram négatives peut être divisée en trois groupes en fonction de leur taille : les colicines, les microcines et les pyocines (Gillor et *al.*, 2005).

Les colicines sont les bactériocines les plus étudiées, ce sont des molécules de haut poids moléculaire (25–80 kDa), elles sont produites par *Escherichia coli* (Chavan et Riley, 2007). Il y a environ 30 colicines qui ont été identifiées (Gordon et *al.*, 2007), telle que la colicine V38 produite par *Escherichia coli* souche 38 (Leavitt et *al.*, 1997)

D'autres membres de la famille des *Enterobacteriaceae* produisent également des bactériocines. Plusieurs de ces bactériocines sont semblables aux colicines dans leurs structure et fonction ; elles sont souvent nommées colicine-like bactériocines (CLBs).

Les microcines sont des peptides de faible poids moléculaire (<10 kDa) semblables aux bactériocines des bactéries Gram positives (Chavan et Riley, 2007), elles sont thermostables, relativement hydrophobes et résistent à certaines protéases et aux pH extrêmes, telle que la microcine E492 produite par *Klebsiella pneumoniae* (Hetz et *al.*, 2002).

Les pyocines sont produites par les membres du genre *Pseudomonas*. Trois types de pyocines ont été décrites R, F et S (Gillor et *al.*, 2005).

Les pyocines du types R et F possèdent une structure qui ressemble aux bactériophages avec une forme fibreuse, elles sont résistantes aux protéases.

Les pyocines du type S ressemblent aux colicines et elles sont sensibles aux protéases (Chavan et Riley, 2007). Dans ce groupe, les pyocines S1, S2, AP41, et S3 qui sont produites par l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* se présentent en deux composés, une protéine à activité catalytique et une protéine d'immunité qui protège la souche productrice (Baysse et *al.*, 1999).

CHAPITRE III

LES ARCHAEOCINES

Tandis que les bactériocines et les eucaryocines ont été étudiées pendant des décennies, la recherche dans le domaine des archaeocines (des halocines et des sulfolobocines) n'est encore qu'à ses débuts (Shand et Leyva, 2007). Les halocines ont été découvertes pour la première fois par Francisco Rodriguez-Valera et ses collaborateurs en 1982. Le terme « archaeocine » a été inventé pour distinguer les substances antibactériennes de nature protéique produites par les Archaea de celles produites par les membres du domaine Bacteria (Price et Shand, 2000). De la même manière, les substances antibactériennes produites par les membres du domaine Eucarya s'appellent les « eucaryocines » (O'Connor et Shand, 2002). Par conséquent, La production de substances antibactériennes est une caractéristique pratiquement universelle dans les trois domaines de la vie (Shand et Leyva, 2007).

Jusqu'ici, les archaeocines ont été caractérisées seulement à partir de deux groupes de bactéries à savoir les halophiles extrêmes (haloarchaea) du règne Euryarchaea qui produisent des « halocines » (O'Connor et Shand, 2002), et les bactéries du genre *Sulfolobus* appartenant au règne Crenarchaea, qui produisent une sulfolobocine (Prangishvili et al., 2000).

Bien que la production d'halocine est une caractéristique pratiquement universelle des bâtonnets Archaea halophiles (Torreblanca et al., 1994), actuellement, il n'y a que sept halocines et une sulfolobocine qui ont été partiellement ou entièrement caractérisées, mais les études d'antagonisme suggèrent l'existence de centaines halocines différentes (Shand et Leyva, 2007).

Les Halocines se caractérisent par une diversité dans leur taille qui s'étend de 3 à 35 kDa, par une stabilité thermique et une dépendance au sel. Leur spectre d'activité est large vis-à-vis des autres haloarchaea. Actuellement, le mécanisme d'action est connu seulement pour l'halocine H6/H7 (Shand et Leyva, 2007).

Les halocines caractérisées jusqu'à maintenant sont regroupées en deux familles à savoir les microhalocines dont le poids moléculaire ne dépasse pas 10 kDa et les halocines qui sont des protéines de poids moléculaire supérieur à 10 kDa (Shand et Leyva, 2007).

III.1. Microhalocines (≤ 10 kDa)

III.1.1. Halocine S8 (HalS8)

L'halocine S8 est produite par un bâtonnet halophile extrême non caractérisé (souche S8) isolé à partir de cristaux de sel du Grand Lac Salé (Utah). C'est la première microhalocine caractérisée entièrement (au niveau protéique et génétique) (Price et Shand, 2000). Elle se compose de 36 acides aminés avec un poids moléculaire de 3,58 kDa, elle contient quatre résidus de cystéine, qui peuvent former deux ponts disulfures. Actuellement, il n'y a aucune preuve que HalS8 subit une modification post-traductionnelle (Shand et Leyva, 2007).

Il semble qu'elle est insensible à la lyophilisation, la désionisation, les solvants organiques, le traitement avec la trypsine et l'ébullition pendant une heure. Toutefois, son activité est perdue après un traitement avec la protéinase K (Price et Shand, 2000 ; Shand et *al.*, 1999).

III.1.2. Halocine R1 (HalR1)

La deuxième microhalocine caractérisée est l'halocine R1 (HalR1) qui est produite par *Halobacterium salinarum* GN101 isolée d'une fabrique de sel solaire à Guerrerro Negro (Mexico).

Les premières études réalisées sur HalR1 ont montré un poids moléculaire de 6,2 kDa déterminé par SDS-PAGE (Rdest et Sturm, 1987). En revanche, les études ultérieures ont montré que l'halocine R1 est attachée à une autre protéine (porteuse), donnant ainsi un poids moléculaire apparent d'environ 29 kDa déterminé après une purification filtration sur gel. Cependant, lors du chauffage de l'halocine avant la filtration sur gel, cette dernière se dissocie de la protéine porteuse, puis élue à sa vraie masse moléculaire qui est de 3,8 kDa (Shand et *al.*, 1999).

La microhalocine HalR1 se compose de 38 acides aminés et présente une similitude saisissante (71% de similitude) avec HalS8. Toutefois, les petites différences

dans leurs séquences d'acides aminés doivent être à l'origine des différences de spectres d'activité et de thermolabilité des deux microhalocines (Price et Shand, 2000 ; O'Connor et Shand, 2002). Rdest et Sturm (1987) ont montré que HalR1 n'est pas bactéricide vis-à-vis des cellules cibles mais bactériostatique.

III.1.3. Halocine H6/H7

L'halocine H7 (HalH7, autrefois connue sous le nom de HalH6) est produite par *Haloferax gibbonsii* Ma2.39 qui est isolée d'une fabrique de sel solaire en Espagne (Alicante) (Torreblanca et al., 1986). Le poids moléculaire de l'halocine H7 a été estimé à 32 kDa (Torreblanca et al., 1989). Mise dans des conditions dénaturantes (SDS-PAGE), cette halocine présente un peptide avec un poids moléculaire d'environ 3kDa après la libération de la protéine porteuse (Shand et Leyva, 2007).

Par conséquent, HalH7 est classée parmi les microhalocines. Les études de stabilité ont montré que HalH7 est thermorésistante et peut être dialysée (O'Connor et Shand, 2002).

L'exposition des cellules cibles à l'HalH7 provoque un gonflement puis lyse des cellules (action bactéricide), ce qui indique que l'halocine H7 agit préférentiellement sur la membrane des cellules cibles (Torreblanca et al., 1989).

D'autres études se sont intéressées à l'effet de HalH7 sur les variations des volumes intracellulaires, le pH interne, la force motrice des protons et au flux ionique des cellules cibles. Les résultats ont montré que la cible spécifique de l'halocine H7 est l'antiport de Na^+/H^+ , offrant ainsi le premier mécanisme d'action des halocines caractérisées jusqu'à lors. Il semble que l'halocine H7 ait non seulement une action sur l'antiport Na^+/H^+ des haloarchaea mais agit aussi sur ceux des mammifères (Meseguer et al., 1995).

III.1.4. Halocine A4 (HalA4)

L'halocine A4 est produite par une souche Archaea halophile non caractérisée qui est isolée d'une fabrique de sel Tunisienne. La masse moléculaire de l'halocine A4 est de 7,43 kDa, elle a un pHi acide (4,14) et elle est hydrophobe (Shand et Leyva, 2007).

Son spectre d'activité est large vis-à-vis des halobactéries, comme elle inhibe également la souche hyperthermophile appartenant au règne Crenarchaeota *Sulfolobus solfataricus* (Haseltine et al., 2001).

III.1.5. Halocine C8 (HalC8)

L'halocine C8 est produite par *Halobacterium* AS7092 qui est isolée du grand lac salé de Chaidan en Chine (Li et al., 2003). C'est la plus grande microhalocine connue jusqu'à lors. Elle présente un poids moléculaire de 7,44 kDa, 76 acides aminés et 10 résidus de cystéine. L'halocine C8 est obtenue par modification d'une préprotéine de 283 acides aminés (appelé ProC8) à partir de son extrémité C-terminale (Shand et Leyva, 2007).

Elle est thermorésistante, elle se conserve bien à 4°C ou à -20°C pendant une année et son activité est préservée après une dialyse contre de l'eau distillée. Le traitement de l'halocine avec les solvants organiques (méthanol, éthanol et l'acétonitrile) n'affecte pas son activité. Cependant, le traitement de HalC8 avec la protéinase k provoque une perte de son activité contrairement à la trypsine qui n'a pas d'effet sur cette dernière (Li et al., 2003).

III.2. Halocines (> 10 kDa)

III.2.1. Halocine H1 (HalH1)

L'halocine H1 est une protéine de 31 kDa produite par *Haloferax mediterranei* M2a (autrefois appelée Xia3). Elle est thermolabile (dénaturée à une température supérieure à 50°C) (Platas et al., 1996) et exige au moins une concentration de 5% pour garder son activité (sel-dépendante) (Platas et al., 2002). Elle possède un spectre d'activité large vis-à-vis des haloarchaea (Meseguer et al., 1986).

Les paramètres critiques qui favorisent la production optimale de l'halocine H1 sont la concentration de sel (20 % de sel), la température (37°C) et d'une manière plus

importante la source nutritive. Les facteurs qui n'ont aucun effet sur la production d'halocines sont la quantité d'oxygène, la lumière et la taille de l'inoculum. L'activité de l'halocine H1 est détectable pendant la phase exponentielle, contrairement à la plupart des autres halocines qui sont produites au début de la phase stationnaire (Platas *et al.*, 1996). Le mode d'action de l'HalH1 n'est pas encore connu, mais il semble affecter la perméabilité de la membrane des cellules cibles (Shand et Leyva, 2007).

III.2.2. Halocine H4 (HalH4)

L'halocine H4 est la première halocine découverte par Rodriguez-Valera et ses collaborateurs (1982). Elle est produite par *Haloferax mediterranei* R4 (atcc 33500) qui est isolée à partir d'une saline solaire en Espagne (Alicante).

Des travaux effectués par Meseguer et Rodriguez-Valera (1985, 1986) suggèrent qu'il s'agirait d'une protéine d'environ 28 kDa identifiée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence du SDS. Cependant, après la détermination de la séquence en acides aminés de l'halocine (359 acides aminés), il apparaît que le poids moléculaire de l'HalH4 est de 34,9 kDa obtenu à partir d'une préprotéine de 39,6 kDa (Cheung *et al.*, 1997).

L'halocine H4 contient une région hydrophobe de 32 acides aminés au milieu de la séquence de la protéine, qui peut être fonctionnellement importante : par exemple, la fixation de l'halocine sur la cellule cible (Shand *et al.*, 1999).

L'halocine H4 s'adsorbe sur les cellules cibles où elle semble perturber la perméabilité de la membrane qui provoque la lyse des cellules suite à un déséquilibre ionique. Les études menées sur le mode d'action de l'halocine H4 ont montré que les cellules mises en contact avec cette dernière deviennent enflées et acquièrent une morphologie sphérique (Meseguer et Rodriguez-Valera, 1986).

III.3. Application des Halocines

L'utilisation des halocines comme agents chimiothérapeutiques, actifs contre les germes pathogènes humains ou animaux n'a pas été encore concrétisée, mais vu les centaines de différentes halocines qui restent encore non caractérisées, suggère que d'autres halocines puissent avoir des applications cliniques (Shand et Leyva, 2007).

Chez les mammifères, les inhibiteurs d'antiport Na^+/H^+ protègent le myocarde contre les dommages d'ischémie¹. L'inhibition par l'halocine H7 de l'antiport Na^+/H^+ a été montrée chez les haloarchaea (Meseguer et *al.*, 1995) et chez certains chiens. Cette halocine peut servir de traitement pour protéger le myocarde contre les effets nocifs de l'ischémie en diminuant la taille de l'infarctus. Ceci a trouvé une application dans la réduction des dommages liés à la transplantation d'organe (Shand et Leyva, 2007).

La base de cette application biomédicale était la découverte du mécanisme d'action de l'halocine H7. En conséquence, les applications potentielles des autres halocines s'articuleront également sur la découverte de leurs mécanismes d'action. Ces informations donneront à des cliniciens la capacité de prévoir quelles halocines auront des effets pharmaceutiques souhaitables (Shand et Leyva, 2007).

Vu leur stabilité dans les solutions hypersalées, les halocines pourraient trouver des applications dans la conservation des aliments salés (Litchfield, 2002).

Le gène *halI* (gène de l'immunité des haloarchaea) peut servir de marqueur de sélection des haloarchaea (Sun et *al.*, 2005).

¹ Déficience dans l'irrigation sanguine d'un organe

PARTIE PRATIQUE

Chapitre I : Matériel et Méthodes	29
I.1. Sites de prélèvements et échantillonnage	29
I.2. Milieux de culture.....	30
I.3. Isolement et purification des souches.....	32
I.4. Test d'antagonisme en milieu solide	34
I.5. Etude des souches sélectionnées	36
I.6. Mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches CD2 et MD3 sur milieu liquide.....	38
I.7. Caractérisation des agents antibactériens produits par les souches CD2 et MD3	44
Chapitre II : Résultats et Discussions	48
II.1. Isolement et purification.....	48
II.2. Sélection des souches présentant une activité antibactérienne sur milieu solide	49
II.3. Etude phénotypique.....	50
II.4. Mise en évidence de l'activité antibactérienne de CD2 et MD3 sur milieux liquides	56
II.5. Caractérisation des agents antibactériens.....	59

CHAPITRE I MATERIEL ET METHODES

I.1. Sites de prélèvement et échantillonnage

Les salines solaires fabriquées par l'homme sont des écosystèmes connus pour leur abondance en microorganismes halophiles extrêmes. Les prélèvements ont été effectués au mois de Mai 2005 dans deux salines de la région de Béjaïa à savoir, celle d'ICHEKABENE de la commune de FERAOUN et la saline de AIT ALLOUN de la commune de SEDDOUK (figure 6).

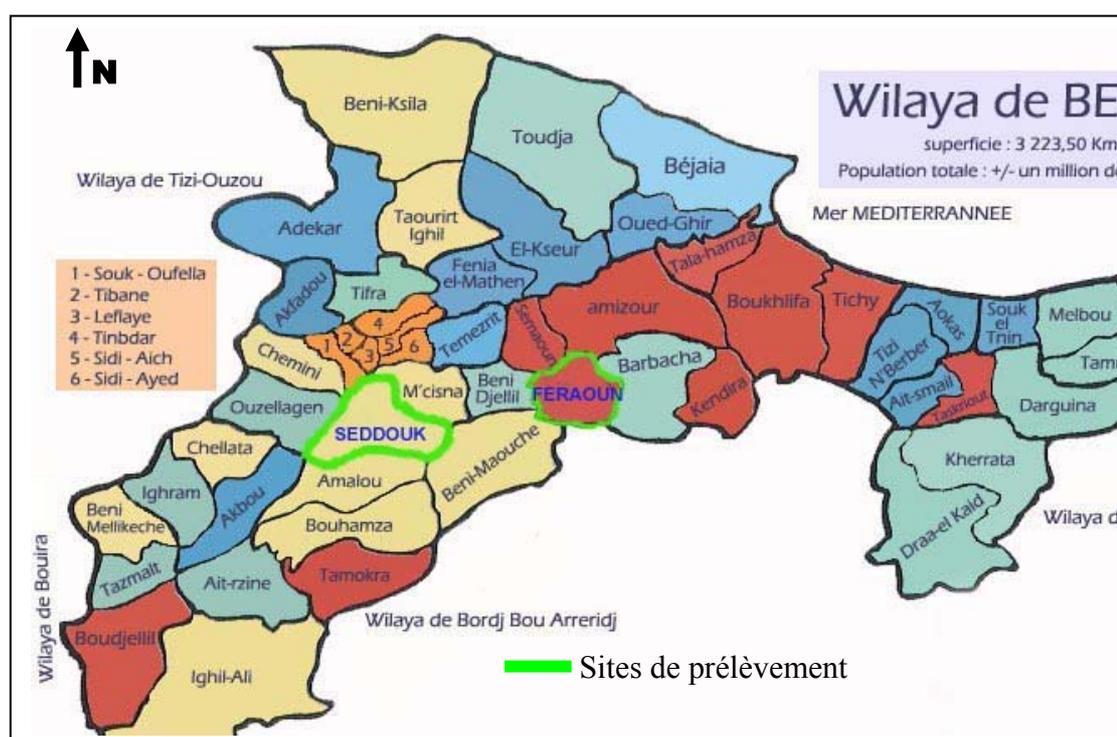


Figure 6: Carte de la région de Béjaïa (<http://www.Bgayet.net>)

Les salines de FERAOUN et de SEDDOUK sont fabriquées par l'Homme. Elles possèdent des sources d'eau très salées qui jaillissent vers plusieurs étangs d'eau artificiels. Ces étangs sont utilisés pour évaporer l'eau à l'air libre afin de récupérer du sel.

Les échantillons d'eau sont prélevés à partir des étangs artificiels des salines, à raison de 5 échantillons. L'échantillonnage du sol a été effectué en prélevant plusieurs portions autour de chaque site. Pour la saline de SEDDOUK, certains bassins naturels contiennent des sédiments qui ont fait également l'objet d'un prélèvement. La température de l'eau dans les salines de FERAOUN et SEDDOUK est respectivement 14,5°C et 13°C, alors que leurs pH sont de 7,5 et 7,7.

I.2. Milieux de culture

I.2.1. Composition

Les microorganismes recherchés sont des halophiles extrêmes aérobies ou aéroanaérobies se développant à des concentrations en NaCl dépassant les 15% à pH neutre ou avoisinant la neutralité.

L'isolement est effectué sur trois milieux de culture de composition différente. Le premier est celui décrit par Rodriguez-Valera et ses collaborateurs (1982) modifié (Milieu M), le casaminoacide a été remplacé par la peptone et l'amidon. Ce milieu a été préparé à trois concentrations différentes en NaCl : 15%, 20% et 25%, appelés respectivement **MA, MB et MC**. Les deux autres milieux ont été recommandés par le Dr. ENACHE² **M1 et M2**.

I.2.2. Préparation

Afin d'éviter la précipitation de l'agar après autoclavage, les sels et l'agar sont préparés et stérilisés séparément (Tindall, 1989).

Les sels sont dissous dans 600 ml d'eau distillée chauffée à 60°C puis ajustés jusqu'à 800 ml. La solution est mise sous agitation jusqu'à dissolution totale des sels. Le pH est ajusté à 8 (avant autoclavage).

Les composés organiques sont dissous dans un premier temps dans 100 ml d'eau distillée à 60°C, puis ajustés jusqu'à 195 ml. La solution est agitée jusqu'à dissolution totale des composés organiques. Le pH est ajusté à 8 avec une solution de NaOH à 1N. Une fois le pH ajusté, l'agar est ajouté à la solution.

² ENACHE Madalin Docteur en enzymologie des archaea halophiles
Actuellement membre du centre Japonais de Collection des Micro-organismes RIKEN BioResource

Les deux solutions sont stérilisées séparément à 120°C/20min. Au terme de l'autoclavage, les deux solutions sont mélangées stérilement et laissées sous agitation jusqu'à obtention d'une solution homogène. Le pH de la solution après mélange doit être entre 7 et 7,2.

I.3. Isolement et purification des souches

Selon Dyall-Smith (2004), la température optimale de croissance des halophiles extrêmes est de 37°C et la plupart sont légèrement thermophiles. Pour cela, l'isolement s'est effectué à deux températures (37°C et 40°C).

I.3.1. Isolement à partir de l'eau

Un échantillon composite a été préparé en mélangeant 20 ml de chacun des cinq échantillons d'eau dans un flacon stérile de 250 ml, constituant ainsi la solution mère à ensemercer sur milieu solide. L'isolement s'est effectué de la manière suivante (figure 7) :

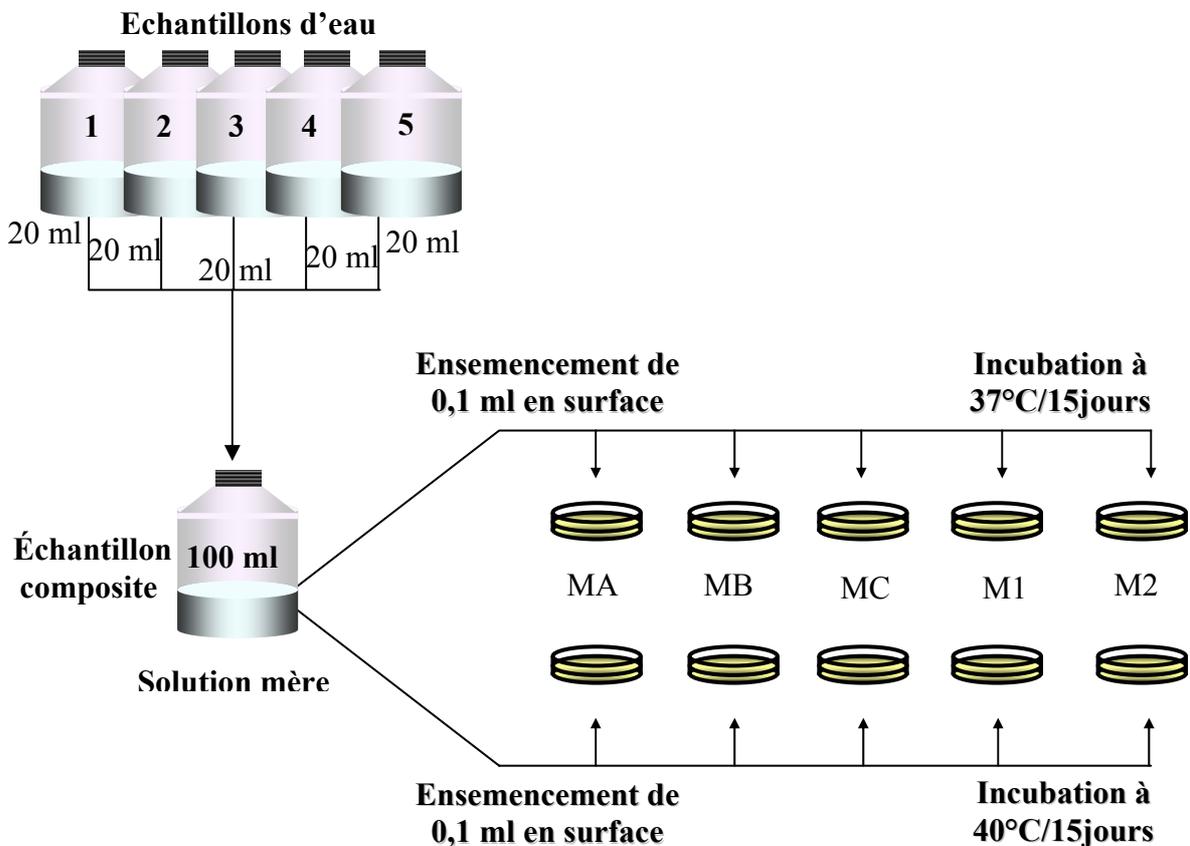


Figure 7 : Isolement des souches à partir de l'eau

I.3.2. Isolement à partir du sol

L'échantillon du sol est constitué du mélange des portions de sol prélevées agitées énergiquement. 10 g d'échantillon sont ajoutés à 90 ml d'eau physiologique hypersalée (EPHS à 15% de NaCl), constituant ainsi la solution mère. L'isolement a été effectué selon le schéma de la figure 8.

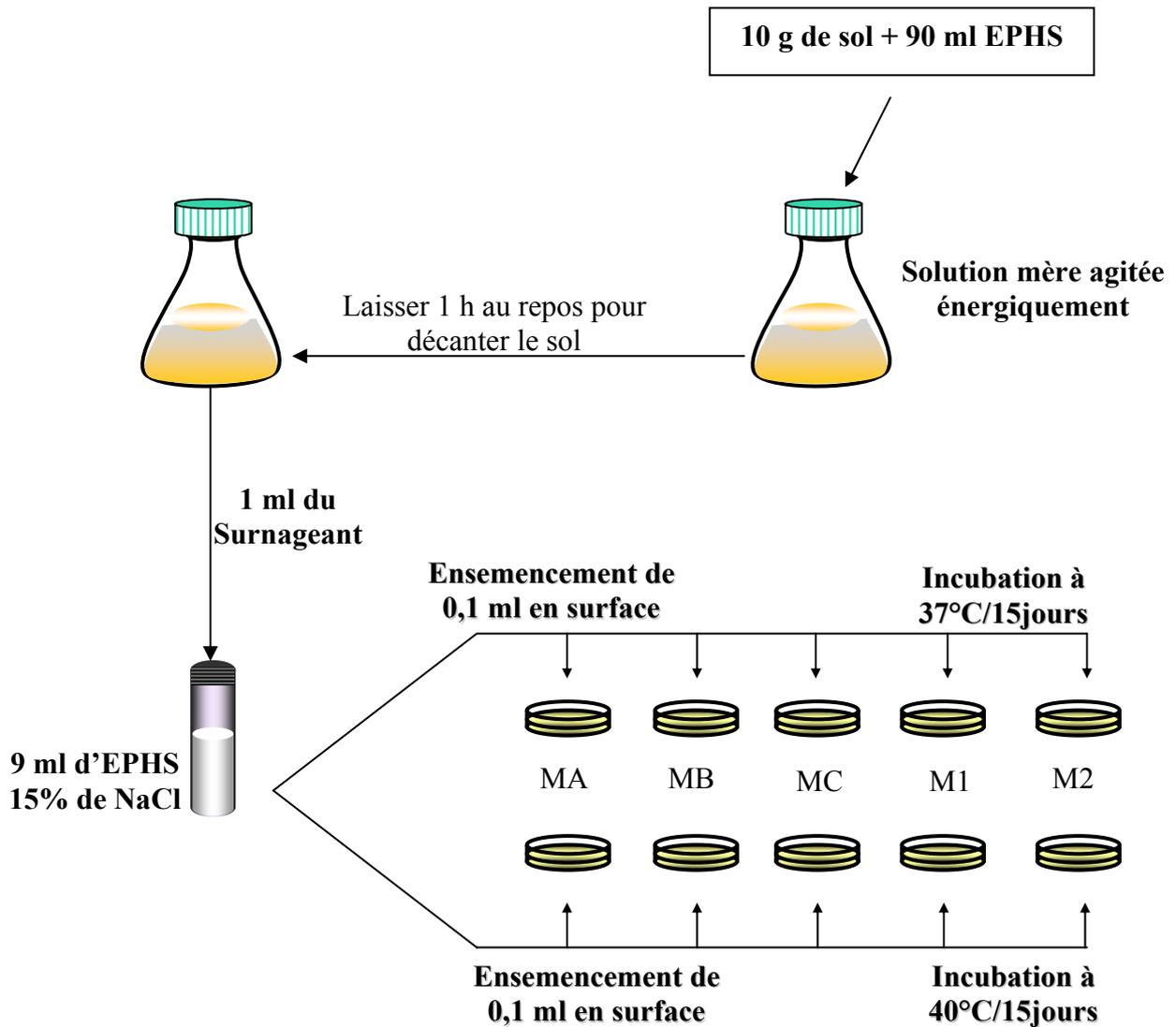


Figure 8 : Isolement des souches à partir du sol

I.3.3. Isolement à partir des sédiments

Les sédiments prélevés à partir de la saline de SEDDOUK sont agités énergiquement puis laissés pendant une heure afin que les débris décantent. 0,1 ml du surnageant estensemencée en surface selon le schéma précédent. Les boites sont incubées à 37°C et 40°C pendant 15 jours.

I.3.4. Purification des souches

Après incubation, la sélection des isolats a été réalisée sur la base des caractères culturaux (couleur, forme, contour, opacité et élévation). Les colonies sélectionnées sont repiquées sur le même milieu d'isolement par la méthode des stries. La sélection des colonies a été effectuée à l'aide d'une loupe binoculaire (10 x 0,8). La pureté des colonies est vérifiée par une observation des cellules à l'état frais. Après plusieurs repiquages, chaque isolat purifié est considéré comme étant une souche à part.

I.4. Test d'antagonisme en milieu solide

Dans le but de détecter les souches halophiles présentant une activité antibactérienne, l'antagonisme des souches isolées, entre elles, a été testé.

La méthode utilisée se base sur la faculté des bactériocines à diffuser à travers la gélose. Pour cela, des disques de gélose contenant la souche à tester sont déposés sur des boites de Pétri préalablementensemencées avec les souches cibles. Cette méthode mise au point par Kekessy et Piguet (1970) se fait en deux étapes (figure 9).

L'activité antibactérienne se traduit par l'apparition de zones d'inhibition autour des disques d'agar.

Devant l'ampleur des combinaisons à réaliser, nous avons choisi de commencer notre sélection par les souches isolées dans les milieux à forte concentration en NaCl à savoir les souches isolées sur les milieux MC et M2 ce qui nous fait un total de 26 souches à tester entre elles.

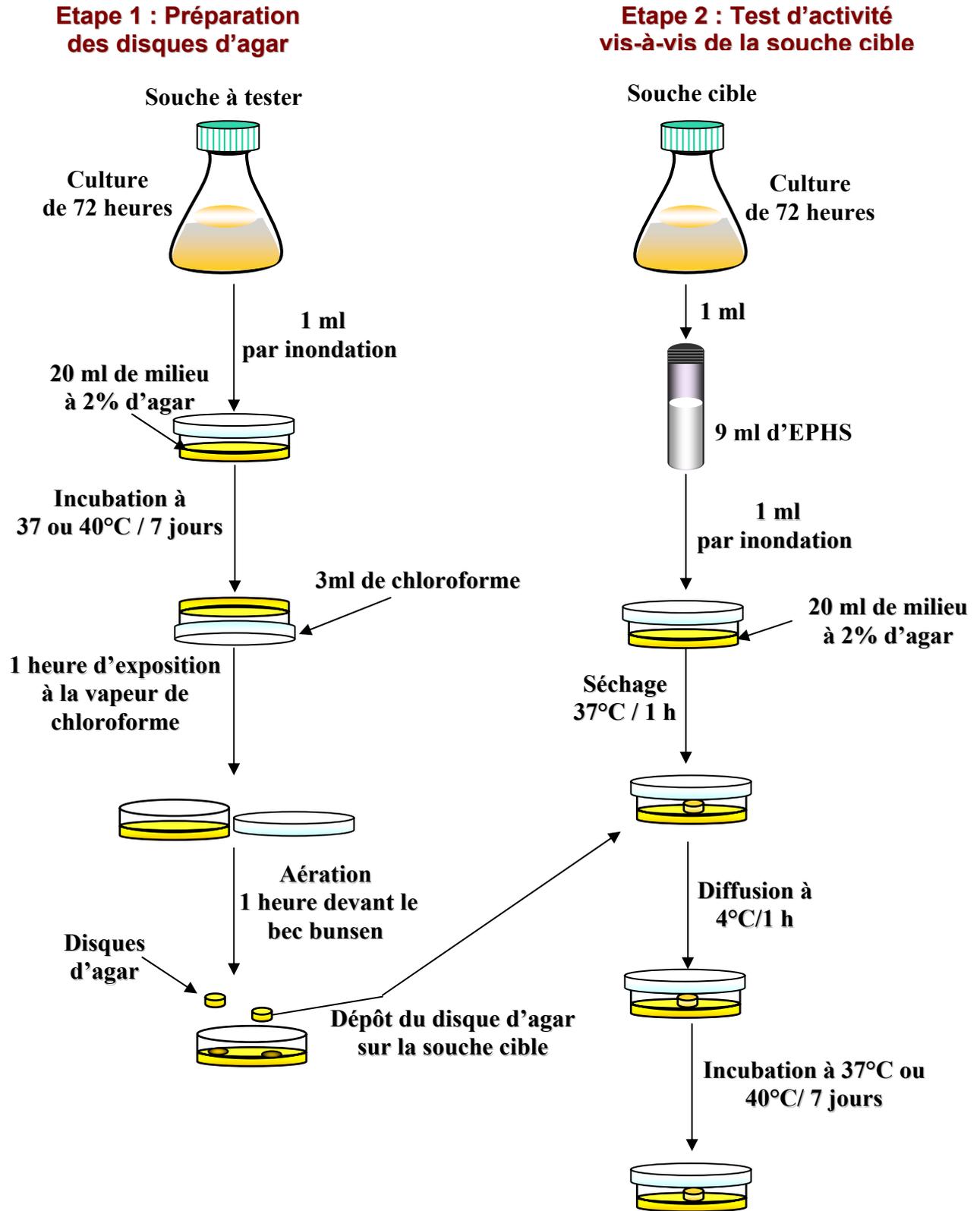


Figure 9 : Test d'antagonisme sur milieu solide

I.5. Etude des souches sélectionnées

Les souches halophiles sélectionnées, les milieux de culture ainsi que les températures d'incubation sont illustrés dans le Tableau V.

Tableau V : Milieux de culture et températures d'incubation des souches halophiles isolées.

Souches	Milieux de culture	Températures d'incubation
CD3	MC	40°C
D2	MC	37°C
CD2	MC	40°C
MS1	M2	37°C
MD3	M2	37°C
MS4	M2	37°C
MS2	M2	37°C

D : Sédiments, **S** : Sol, **M** : Milieu M2, **C** : Milieu MC

Exemple : MD3 = la 3^{ème} souche isolée à partir des sédiments sur le milieu M2

I.5.1. Caractères morphologiques et cultureux

Cette étude consiste à observer les colonies sous une loupe binoculaire pour déterminer les critères suivants : la couleur, l'opacité, le contour, l'élévation et l'aspect de la surface des colonies.

L'observation microscopique à l'état frais permet de déterminer la forme, l'arrangement et la mobilité des cellules.

Coloration de Gram : la technique utilisée est celle de Dussault (1955) appliquée aux bactéries halophiles. Elle consiste à déposer une goutte d'une suspension bactérienne de 72 heures sur une lame, séchée à l'air libre. Afin de dessaler et de fixer la suspension sur la lame, cette dernière est plongée dans une solution d'acide acétique à 2% pendant 5min, puis séchée à l'air libre. Une fois le frottis préparé, une coloration de Gram classique en utilisant le cristal violet est effectuée.

I.5.2. Standardisation des inocula

Des dilutions ont été préparées à partir d'une suspension bactérienne de 72 heures pour chaque souche. Le dénombrement de chaque dilution a été réalisé à l'aide d'une cellule de Malassez. Des mesures de densité optique³ à 600 nm sont

³ Spectrophotomètre SHIMATZU Mini UV-VIS 1240

réalisées en parallèle et des courbes de corrélation Densité Optique = f (nombre de cellules/ml) ont été tracées.

I.5.3. Concentration optimale en NaCl

Le but de cette étude est de déterminer la concentration en NaCl qui permet une croissance optimale pour chaque souche. Pour cela, les milieux M2 et M sont préparés à différentes concentrations en NaCl à savoir : 0 g/l, 50 g/l, 100 g/l, 150 g/l, 200 g/l, 250 g/l et 300 g/l (Oren *et al.*, 1997).

Des erlens de 100 ml contenant 20 ml de chaque milieu sontensemencés avec 1 ml de la même culture de 72 heures de la souche à étudier. Après 72 heures d'incubation dans un bain-Marie agité⁴, la densité optique de chaque culture est mesurée à 600 nm (Oren *et al.*, 1995).

I.5.4. Sensibilité des souches aux antibiotiques

Des boîtes de Pétri contenant 20ml de milieu solide correspondant à chaque souche sontensemencées avec 1ml, par inondation, d'une culture de 72 heures à raison de 10⁶ cellule/ml. Des disques imprégnés d'antibiotiques sont déposés à la surface de chaque boîte. L'incubation est réalisée à la température d'isolement de chaque souche pendant 15 jours. La sensibilité des souches aux antibiotiques se traduit par l'apparition de zones d'inhibition, au moins 2 mm, autour des disques (Montalvo-Rodriguez *et al.*, 1998 ; Xin *et al.*, 2000). Les antibiotiques étudiés sont : le chloramphénicol (30 µg), l'érythromycine (15 µg), la rifampicine (5 µg), la pénicilline (6 µg) et l'ampicilline (10 µg).

I.5.5. Recherche de la catalase

Elle est mise en évidence par contact de la culture avec une solution d'eau oxygénée, une goutte de cette dernière est placée sur une lame et une colonie y est déposée : un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulles traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de la catalase (Guiraud, 1997).

⁴ Bain Marie agitateur Memmert

I.5.6. Recherche de l'oxydase

Elle consiste à détecter la cytochrome oxydase qui intervient dans la phosphorylation oxydative. Elle est mise en évidence en déposant une goutte de substrat incolore (oxalate de N-diméthyle paraphénylène diamine) sur un disque en papier stérile puis une colonie y est déposée.

La lecture est effectuée après quelques secondes. La réaction est positive s'il y a apparition d'une couleur rouge violette (Guiraud, 1997).

I.5.7. Cinétique de croissance

Des cinétiques de croissance ont été réalisées pour les souches CD2 et MD3 : 200 ml de milieu de culture (MC et M2) dans un erlen de 500 ml ont étéensemencés par une suspension bactérienne de 07 jours. Le suivi de la croissance bactérienne a été réalisé en mesurant la densité optique à 600 nm à des intervalles de 24 heures (Rdest et Sturm, 1987). Des courbes de croissance ont été établies pour chaque souche.

I.6. Mise en évidence de l'activité antibactérienne sur milieu liquide

Les tests d'antagonisme effectués sur milieu solide ont permis de retenir deux souches douées d'une activité antibactérienne vis-à-vis de plusieurs souches halophiles. Des cultures liquides en fermenteur des deux souches ont été réalisées. Les tests d'activité antibactérienne ont été effectués par la méthode des puits.

I.6.1. Test d'activité antibactérienne par la méthode des puits

Les souches cibles sont repiquées dans des erlens de 100 ml contenant 20 ml de milieu d'isolement liquide correspondant à chaque souche. L'incubation est réalisée à 37°C ou à 40°C /3 jours, selon la souche, dans un bain-marie agité. Au terme de l'incubation, des inocula de 10^7 cellules /ml sont préparés.

L'antagonisme des échantillons est vérifié par la méthode des puits décrite par Li et ses collaborateurs (2003). Elle consiste à ensemercer par inondation 1ml d'inoculum de la souche cible sur une boîte de Pétri contenant 20 ml du milieu adéquat à 1,2% d'agar, la boîteensemencée est séchée pendant une heure. Des puits de 11mm de diamètre sont réalisés sur la boîte séchée à l'aide de tubes à hémolyse stériles. Les

échantillons à tester sont déposés dans les puits à raison de 200 µl par puits et incubés à 4°C/1h pour faciliter leur diffusion. Le germe cible est incubé à 37°C ou 40°C pendant 7 jours en vérifiant la boîte régulièrement. L'activité antibactérienne se traduit par l'apparition de zones d'inhibition autour des puits.

I.6.2. Mise en évidence de l'activité antibactérienne chez la première souche

- **Pré culture**

La souche conservée dans son milieu d'isolement à 4°C est repiquée en déposant 3 colonies dans 1 ml de milieu de culture (MC) pendant 24 h/40°C afin de réactiver la souche. Un repiquage sur boîte de Pétri a été réalisé. Au terme de 7 jours d'incubation à 40°C, une préculture de 100 ml dans un erlen de 500 ml a été préparée en raclant plusieurs colonies avec une anse de platine. L'incubation est réalisée dans un bain-Marie agité à 40°C/3 jours. La charge cellulaire est déterminée par une mesure de la DO à 600 nm.

- **Culture en fermenteur**

Un fermenteur⁵ (figure10) contenant 1,8 L de milieu de culture liquide MC préalablement stérilisé à 120°C/20min à l'autoclave a étéensemencé stérilement avec 10 % (v/v) de préculture à raison de 10⁷ cellules/ml.

La température de la culture est maintenue à 40°C. L'agitation est de type axial à 100 rpm. La culture est alimentée en permanence avec de l'air stérilisé à travers une membrane de nitrate de cellulose de 0,45 µm de diamètre et le débit a été réglé en fonction de la production de mousse. La culture a été réalisée sans ajout d'anti-mousse et à pH libre.

Au bout de 03 jours de fermentation, la culture est centrifugée⁶ à 6000 g/20min à 4°C. Le surnageant et le culot obtenus sont testés pour leur antagonisme vis-à-vis des souches cibles.

⁵ H.W.S Borosilikatglas 3,3 DN 150

⁶ Centrifugeuse Sigma 6K15

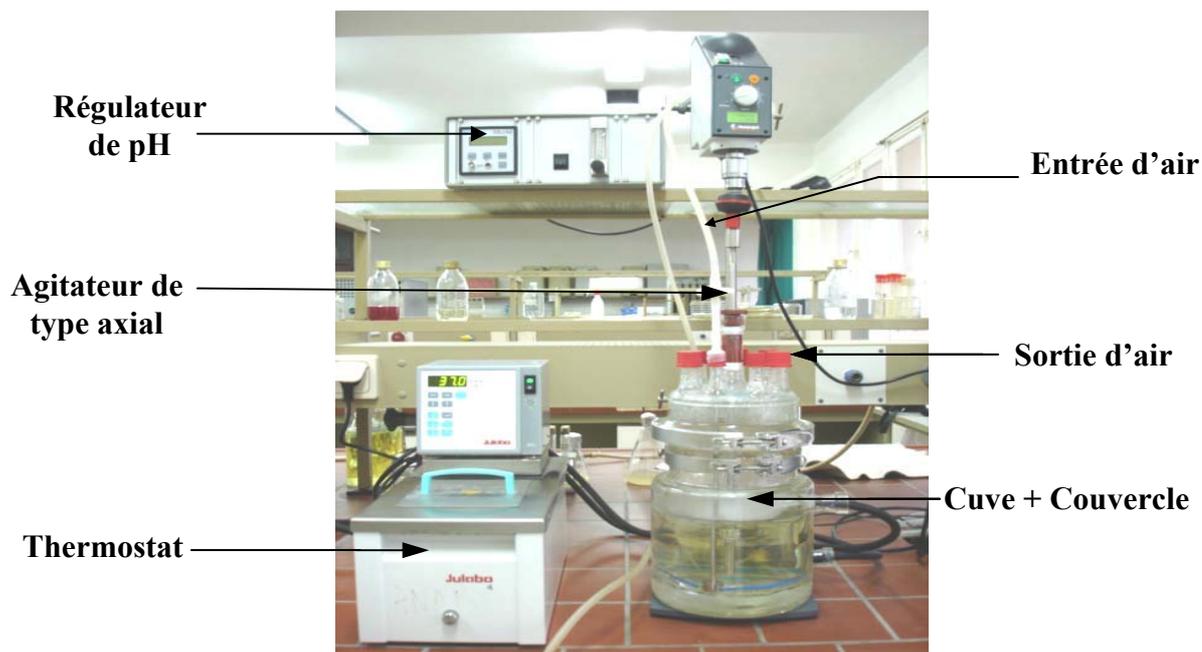


Figure 10 : Culture en Fermenteur

I.6.2.1. Recherche de l'activité dans le culot

Le culot a été traité selon le protocole modifié de Yang et ses collaborateurs (1992) pour récupérer l'agent antibactérien qui serait préalablement adsorbé sur la paroi des cellules.

Pour éviter la lyse osmotique des cellules halophiles et préserver l'intégrité des constituants sels dépendants, nous avons remplacé le tampon phosphate préconisé par Yang et ses collaborateurs, par de l'eau physiologique hypersalée à 15 % en NaCl.

Le culot resuspendu dans l'EPHS à pH 6 avec des proportions de 1: 5 (culot, EPHS), est centrifugé⁷ à 8000 g/ 20min à 4°C. Le culot récupéré est resuspendu dans de l'EPHS à pH 2 puis agité à 4°C/1h. Après l'agitation, la suspension est centrifugée à 8000 g/ 20min à 4°C (figure 11). Le surnageant récupéré est testé avec la méthode des puits en utilisant comme souches cibles CD3, D2 et MS1.

⁷ Centrifugeuse Sigma 2-16K

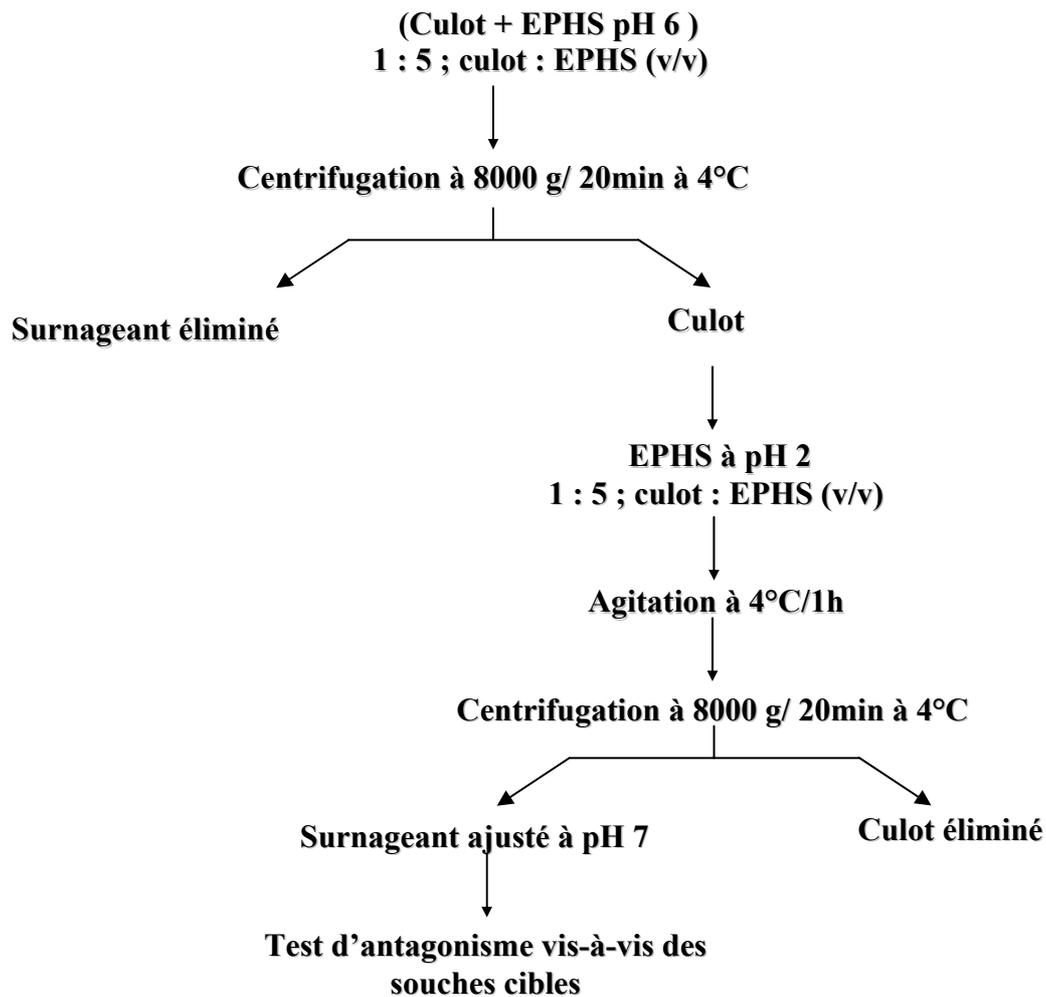


Figure 11 : Protocole de recherche de l'agent antibactérien dans le culot

I.6.2.2. Recherche de l'activité dans le surnageant

Une fois récupéré, le surnageant a été filtré sur des membranes de nitrate de cellulose à 0,45 μm . Cette filtration a pour but d'éliminer les cellules qui persistent après la centrifugation et éviter ainsi la reprise de croissance des souches dans le surnageant ou dans les puits qui masqueraient les zones d'inhibition.

Un test d'antagonisme vis-à-vis des souches cibles par la méthode des puits et la mesure du pH⁸ ont été effectués sur le surnageant filtré.

⁸ pH-mètre Hanna 211

Une concentration progressive du filtrat a été réalisée à l'aide d'un évaporateur rotatif⁹ sous vide à 40°C selon le protocole indiqué sur la figure 12.

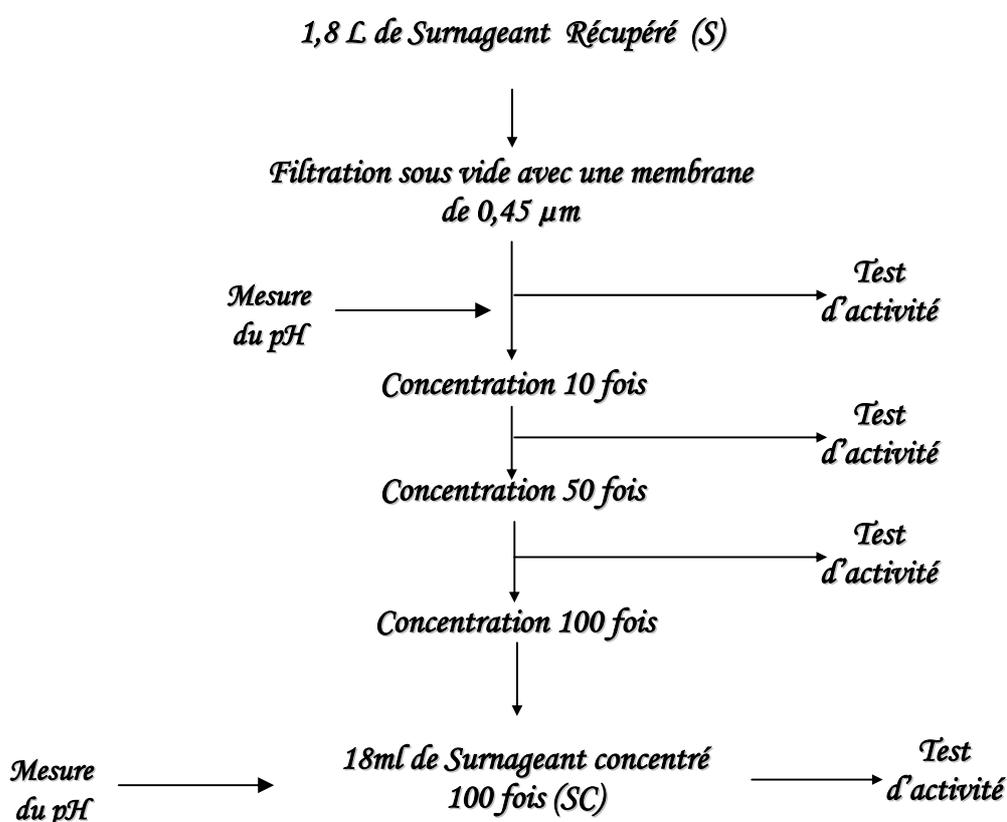


Figure 12 : Recherche de l'activité antibactérienne dans le surnageant

I.6.3. Mise en évidence de l'activité antibactérienne chez la deuxième souche

Comme pour la souche précédente, l'activité inhibitrice de la deuxième souche pourrait être due à un agent antibactérien qui s'adsorbe sur la paroi de la souche productrice ou qui est excrété dans le surnageant de culture.

Pour mettre en évidence l'activité antibactérienne de la deuxième souche, une culture de 2 L a été réalisée de la même manière que la culture précédente (I.6.2.), sauf pour la température d'incubation qui est de 37°C.

La mise en évidence de l'activité antibactérienne dans le culot a été effectuée selon le protocole de Yang et ses collaborateurs (1992) décrit dans la figure 11. Par

⁹ Evaporateur rotatif de type Büchi Waterbath B-480

contre, la recherche de l'activité antibactérienne dans le surnageant a été réalisée de la manière suivante :

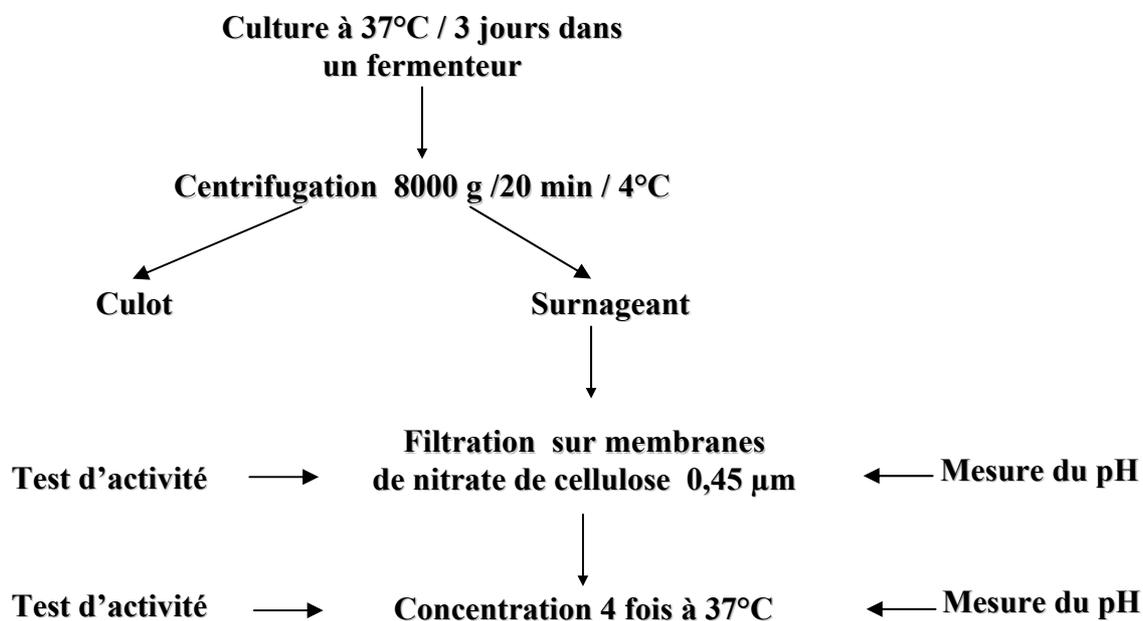


Figure 13 : Mise en évidence de l'activité antibactérienne dans le surnageant de culture de la deuxième souche

I.7. Caractérisation des agents antibactériens produits par les souches sélectionnées

Le travail effectué à ce niveau, nous a permis d'isoler et de sélectionner deux souches douées d'activité inhibitrice vis-à-vis des souches halophiles isolées. L'activité inhibitrice a été mise en évidence dans les surnageants concentrés des deux souches. Dans le but de vérifier la nature chimique des substances actives, les surnageants concentrés ont subis plusieurs traitements.

I.7.1. Effet des protéases sur l'activité des surnageants concentrés

Afin de vérifier la nature protéique des agents antibactériens, les surnageants concentrés sont soumis à l'action de protéases à savoir : l' α -chymotrypsine, la

trypsine, la papaïne et la pronase préparées à une concentration finale de 1mg /ml puis incubés pendant 1 heure à 37°C.

200 µl de chaque mélange (enzyme + SC) sont testés vis-à-vis des germes cibles puis incubés à 37°C pendant 7 jours. Les résultats obtenus sont comparés à ceux de deux témoins : les surnageants concentrés non traités et l'enzyme testée seule.

La sensibilité de l'agent antibactérien aux enzymes se traduit par la perte de la zone d'inhibition autour des puits, tandis que sa résistance à ces enzymes se traduit par la persistance des zones d'inhibition (Motta et *al.*, 2004).

I.7.2. Effet du pH sur l'activité des surnageants concentrés

Vu le pH neutre du surnageant concentré de la deuxième souche, l'hypothèse de l'action des acides organiques est écartée dès le départ.

Le pH relativement acide du surnageant concentré (pH=5,42) de la première souche pourrait nous laisser penser que l'inhibition des souches cibles serait due à l'action des acides organiques. A ce titre, le surnageant concentré a été neutralisé avec une solution de NaOH (10 M), puis testé sur les germes cibles. Le résultat obtenu est comparé à celui du surnageant concentré non neutralisé. L'action des acides organiques est révélée par la disparition de la zone d'inhibition autour du SC neutralisé, si la zone d'inhibition persiste cela exclu l'action des acides organiques (Benkerroum et *al.*, 2000).

I.7.3. Effet de la température sur l'activité antibactérienne des surnageants concentrés

Afin de tester l'effet de la température sur les agents antibactériens, les surnageants concentrés ont été traités à différentes températures à savoir : 60°C, 80°C, 100°C et 120 °C pendant 15 minutes, puis vérifiés pour leur activité antibactérienne vis-à-vis des germes cibles. Les résultats sont comparés à ceux des surnageants concentrés non traités (témoins) (Motta et *al.*, 2004).

I.7.4. Action de la catalase sur l'activité des surnageants concentrés

L'activité antibactérienne pourrait être due à l'action de l'eau oxygénée, dans le but de vérifier cette hypothèse le surnageant concentré a été traité avec la catalase à une concentration finale de 2 mg/ml. L'activité du SC traité est comparée à celle du SC non traité ainsi que l'enzyme seule. La présence d'eau oxygénée est révélée par la disparition de la zone d'inhibition autour du puit contenant le SC traité (Benkerroum et *al.*, 2000).

I.7.5. Action de la ribonucléase A sur les surnageants concentrés

Afin de vérifier la nature nucléique des substances actives, Les surnageants concentrés traités avec la ribonucléase A, à une concentration finale de 0,5 mg/ml, ont fait l'objet de tests d'activités vis-à-vis des germes cibles et les résultats obtenus sont comparés à ceux de deux témoins : les surnageants non traités et l'enzyme seule. La présence de ribozymes est révélée par la perte de l'activité antibactérienne du surnageant concentré traité (Haseltine et *al.*, 2001).

I.7.6. Action des surnageants concentrés dialysés vis-à-vis des souches halophiles extrêmes et non halophiles.

L'antagonisme des surnageants concentrés a été mis en évidence vis-à-vis des souches cibles halophiles extrêmes. Cependant, la mise en évidence de l'activité antibactérienne des surnageants concentrés vis-à-vis des germes non halophiles nécessite l'élimination des sels qui se trouvent en forte concentration dans les surnageants concentrés. En effet, la saturation des surnageants concentrés en sel peut inhiber les germes non halophiles.

Les deux surnageants concentrés ont été dialysés pendant une nuit à 4°C contre de l'eau distillée puis concentrés au moyen d'un évaporateur rotatif. Les dialysats concentrés ont été testés vis-à-vis des germes cibles halophiles extrêmes afin de vérifier le maintien de l'activité après dialyse.

Les dialysats des deux surnageants concentrés ont été testés pour leur activité vis-à-vis des germes non halophiles à savoir : *E. coli*, *Pseudomonas sp.*, *Enterobacter sp.* et *Staphylococcus sp.*¹⁰

Les tests d'activité vis-à-vis des germes non halophiles ont été effectués par la méthode des puits sur gélose Mueller Hinton (figure 14)

¹⁰ Souches isolées et identifiées par le **Dr. TOUATI A.**
Docteur en microbiologie à l'université A/Mira de Bejaïa
Laboratoire de Microbiologie Appliquée

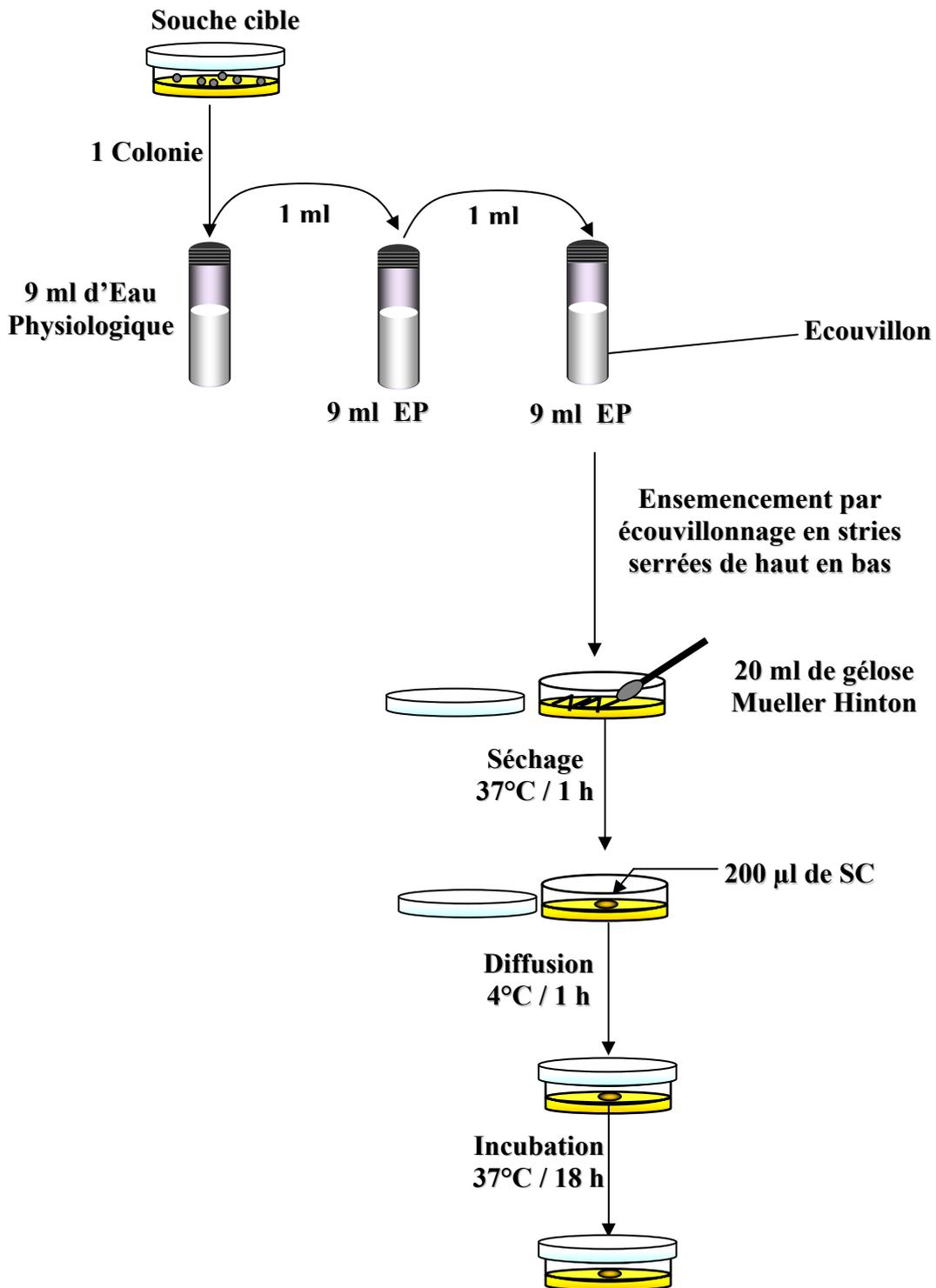


Figure 14 : Antagonisme du SC vis-à-vis des germes non halophiles

CHAPITRE II

RESULTATS ET DISCUSSION

II.1. Isolement et purification

Après purification des isolats par plusieurs repiquages sur milieu solide, nous avons obtenu 54 isolats dont 9 à partir de la saline de FERAOUN et 45 à partir de la saline de SEDDOUK. Les différents isolats sont répartis sur les deux sites en fonction du milieu et de la température d'isolement.

Les souches obtenues à partir de la saline de FERAOUN sont toute isolées du sol à 37°C sur le milieu MA (15% de NaCl). Les colonies sont toutes de couleur blanche. Aucune souche n'a été isolée dans ce site sur les milieux à forte concentration en NaCl et MgCl₂ à savoir MB, MC, M1 et M2.

La saline de SEDDOUK présente une diversité microbienne plus importante que celle de FERAOUN, puisque les isolements ont conduit à une collection de souches plus importante (45 isolats). Nous avons constaté aussi que la plupart des souches isolées sur les milieux MB, MC, M1 et M2 sont pigmentées avec une prédominance de la couleur rouge. Toutes les souches ont été obtenues à partir du sol et des sédiments à l'exception de deux souches qui ont été isolées à partir de l'eau. Cela est peut être dû à la saturation de cette dernière en sels. Les noms attribués aux souches sont illustrés dans le Tableau VI.

Tableau VI : Souches isolées à partir des salines de SEDDOUK et FERAOUN

Site FERAOUN			
Milieu MA			
37°C		40°C	
FA1, FA2, FA3, FA4 FA5, FA6, FA7		FA8, FA9	
Site SEDDOUK			
Milieu M1		Milieu M2	
37°C	40°C	37°C	40°C
M1D1, M1D2, M1D3, M1D4	/	MS1, MS2, MS3, MS4	MD1, MD2, MD3, MD4
Milieu MA		Milieu MB	
37°C	40°C	37°C	40°C
AE1, AE2, AD1, AD2, AD3, AD4, AD5	AD6, AD7,	BD1, BD2, BD3, BE1, BE2, BE3,	BD4, BD5, BD6
Milieu MC			
37°C		40°C	
E1, E2 D1, D2, D3, D4, D5, CS1, CS2, CS3, CS4, CS5, CS6		CD2, CD3	

E : Eau, F : FERAOUN, M1 : Milieu M1, A : Milieu MA, B : Milieu MB

II.2. Sélection des souches présentant une activité antibactérienne sur milieu solide

Les tests d'activité effectués par la méthode des disques d'agar ont permis de détecter 12 souches ayant une activité inhibitrice vis-à-vis d'au moins une souche cible halophile. Les résultats sont illustrés dans le tableau VII et la figure 15.

Tableau VIII: Souches douées d'activité vis-à-vis des germes halophiles.

Souches productrices	Souches cibles inhibées	Souches productrices	Souches cibles inhibées
MD3	D2, CD2, CD3, MS2, MS4, CS3	D3	MD3, MD4
MD4	D3, CD2	D4	MS2
MS2	D3, CS4	D5	MD4, D2
MS3	D2	CD3	MD4, D3
CD2	MD2, MS1, CD3, D2	CS3	D2, MD2
D2	MD4	CS6	MD2

Les souches CD2 et MD3 présentent des activités antibactériennes vis-à-vis de 4 et 6 souches cibles respectivement, ces deux souches ont été sélectionnées pour la suite de notre étude.

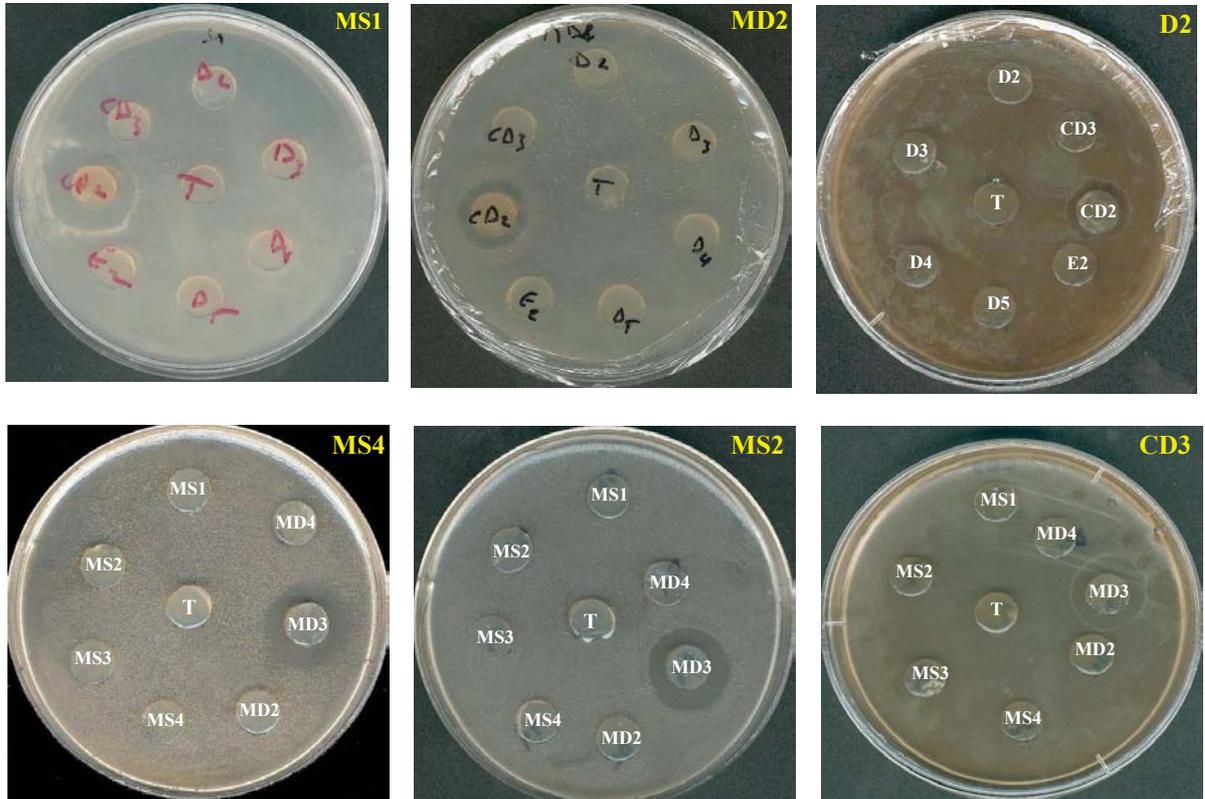


Figure 15 : Quelques photos illustrant l'activité antibactérienne par la méthode des disques d'agar

II.3. Etude phénotypique

II.3.1. Description des colonies des souches étudiées

L'observation des colonies nous a permis de constater que la majorité apparaît lisse à contour circulaire régulier et à élévation bombée (tableau VIII). Leur couleur est différente d'une souche à une autre avec une prédominance de la couleur rouge (figure16). L'une des caractéristiques des halobactéries est la présence en quantité élevée de pigments caroténoïdes (C_{50}) dans les membranes des cellules ce qui confère aux colonies la couleur rouge (Oren et Rodriguez-Valera, 2001). Une étude de la chromogénèse est nécessaire pour identifier la substance responsable de cette couleur. L'aspect opaque des colonies indique la présence de vacuoles à gaz à l'intérieur des

cellules (Joo et Kim, 2005). Les images ci-dessous représentent les colonies des souches étudiées photographiées à l'aide d'un appareil photo numérique¹¹.

Tableau VIII : Description des colonies des souches étudiées

Souches	Examen macroscopique				
	Chromogénèse	Opacité	Contour	Elévation	Surface
CD2	Crème	Translucide	Régulier	Bombée	Lisse
CD3	Rouge	Opaque	Régulier	Bombée	Lisse
D2	Centre : Orange Contour : translucide	Opaque	Régulier	Bombée	Lisse
MS1	Rouge	Opaque	Régulier	Bombée	Lisse
MS2	Orange	Opaque	Régulier	Bombée	Lisse
MS4	Centre : Rouge Contour : translucide	Contour Transparent	Régulier	Bombée	Lisse
MD3	Translucide	Translucide	Régulier	Bombée	Lisse

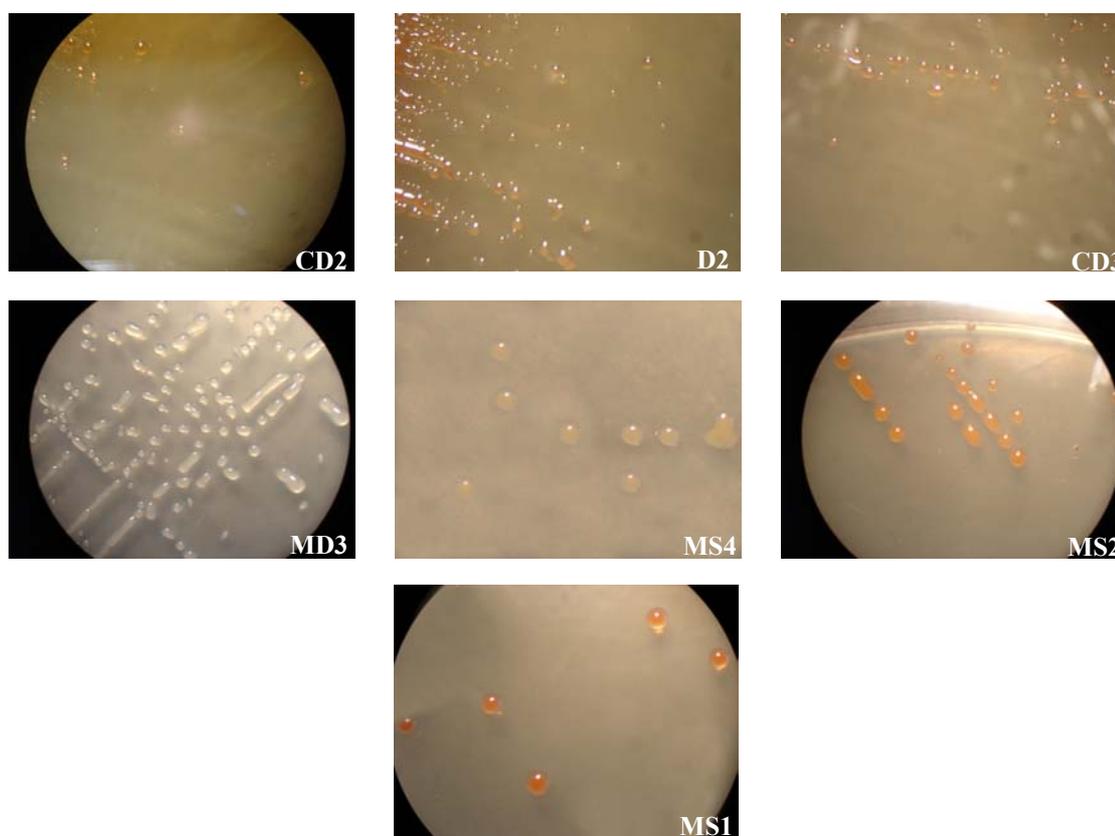


Figure 16 : Observations macroscopiques des souches

¹¹ Appareil photo numérique Sony DSC P100 5.1 M Pixel

II.3.2. Etude biochimique

Les souches étudiées sont toutes à Gram négatif, mobiles et à catalase positive. Hormis MS2 et CD3 toutes les souches sont oxydase positives (Tableau IX, figure 17). Elles se présentent sous différentes formes. Les résultats des critères étudiés coïncident avec ceux des *Halobacteriaceae* décrits dans le Bergey's manuel (Grant et al., 2001).

Tableau IX : Quelques caractères des souches sélectionnées

Souches	Gram	catalase	oxydase	Mobilité	forme
CD2	-	+	+	+	cocci
D2	-	+	+	+	Disques pléomorphes
MS1	-	+	+	+	pléomorphe
MS2	-	+	-	+	pléomorphe
MS4	-	+	+	+	pléomorphe
CD3	-	+	-	+	cocci
MD3	-	+	+	+	Bacille

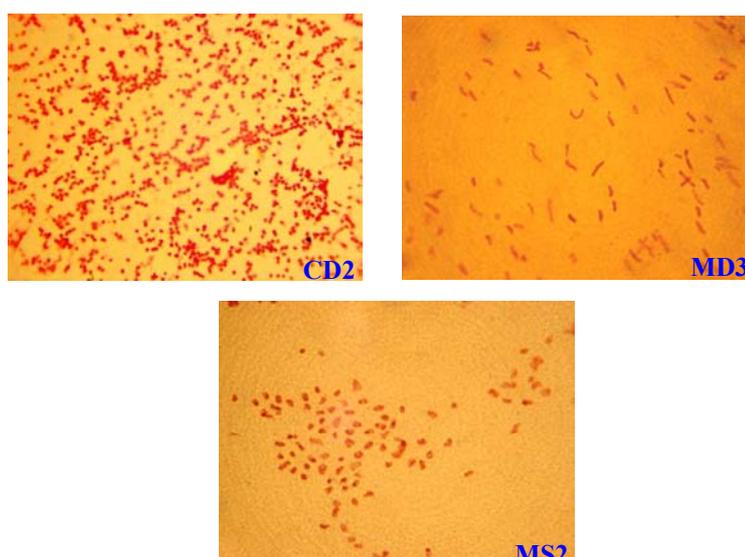


Figure 17 : Photos microscopiques de quelques souches halophiles extrêmes étudiées (Forme et Gram) (Grossissement 12x100)

II.3.3. La concentration optimale en NaCl

La concentration optimale en NaCl a été déterminée en mesurant la croissance des souches dans des milieux de concentration en NaCl croissante. La concentration optimale en NaCl dans le milieu est celle qui présente la densité optique la plus élevée.

Les résultats obtenus, montrent que les souches CD2, MD3 et D2 présentent des optimum de croissance à 200 g/l de NaCl et ceux de CD3, MS1, MS2 et MS4 à 250 g/l de NaCl (Tableau X).

En comparant ces résultats à la classification de Kushner (tableau I), il apparaît clairement que les souches étudiées appartiennent au groupe **des halophiles extrêmes**.

Nous constatons aussi que les souches ne présentent aucune croissance au-dessous d'une concentration de 100 g/l de NaCl (soit 1,72 M). L'intervalle de concentration en NaCl qui permet une croissance est compris entre 100 g/l et 300 g/l de NaCl pour toutes les souches testées.

Tableau X : Croissance des souches à différentes concentrations en NaCl
(optimum de croissance)

Concentration en NaCl (g/l)	Do (600 nm)						
	CD2	MD3	CD3	D2	MS1	MS2	MS4
0	0	0	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0	0	0
100	1,486	0,487	0,465	0,900	0,990	0,025	0,393
150	1,568	0,550	1,802	1,081	1,016	0,367	0,643
<u>200</u>	<u>1,784</u>	<u>0,558</u>	1,871	<u>1,938</u>	1,0267	0,524	0,965
<u>250</u>	0,648	0,180	<u>1,919</u>	1,366	<u>1,161</u>	<u>0,792</u>	<u>1,100</u>
300	0,385	0,022	0,855	0,793	1,035	0,391	1,070

II.3.4. Sensibilité aux antibiotiques

La gamme d'antibiotiques qui inhibe les Archaea est différente de celle qui inhibe les bactéries. Beaucoup d'antibiotiques agissent sur les bactéries mais n'ont aucun effet sur les Archaea (Oren, 2002a).

Les résultats obtenus montrent que toutes les souches sont résistantes vis-à-vis des antibiotiques qui agissent sur la synthèse du peptidoglycane pariétal (Pénicilline et

Ampicilline) et sur la synthèse des protéines (Chloramphénicol et l'Érythromycine). Ces antibiotiques agissent surtout sur les bactéries, mais ils n'agissent pas sur les Archaea halophiles (Kandler et König, 1998 ; Oren, 2002c).

La Rifampicine est un antibiotique qui bloque la transcription de l'ADN en ARNm en se fixant sur l'ADN polymérase (Yala et al., 2001). Nos résultats montrent que deux souches (MD3 et MS1) sont résistantes à la Rifampicine alors que les cinq autres souches s'avèrent sensibles. Ces résultats suggèrent que les souches étudiées appartiendraient aux archaea halophiles extrêmes. Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau XI (voire annexe).

Tableau XI : Résultats de l'antibiogramme

Souches	Antibiotiques				
	Chloramphénicol	Erythromycine	Ampicilline	Pénicilline	Rifampicine
CD2	R	R	R	R	S
CD3	R	R	R	R	S
D2	R	R	R	R	S
MD3	R	R	R	R	R
MS1	R	R	R	R	R
MS2	R	R	R	R	S
MS4	R	R	R	R	S

R : Résistante ; S : Sensible

II.3.5. Cinétique de croissance des souches CD2 et MD3

La majorité des haloarchaea produisent des halocines à la phase de transition entre les phases exponentielle et stationnaire (Shand, 2006). Dans le but de déterminer le temps d'incubation des cultures pour la production de substances antibactériennes, il est nécessaire de connaître la cinétique de croissance des souches productrices.

Les cinétiques obtenues (figure 18) montrent la fin de la phase exponentielle à 72 heures et le début de la phase stationnaire à 96 heures pour les deux souches. Ces résultats nous ont amenés à choisir un temps d'incubation de 96 heures qui coïncide avec le début de la phase stationnaire.

Comme la phase de latence est estimée à 24 heures pour les deux souches, les cultures sontensemencées avec des souches à la phase exponentielle de manière à réduire le temps d'incubation à 72 heures.

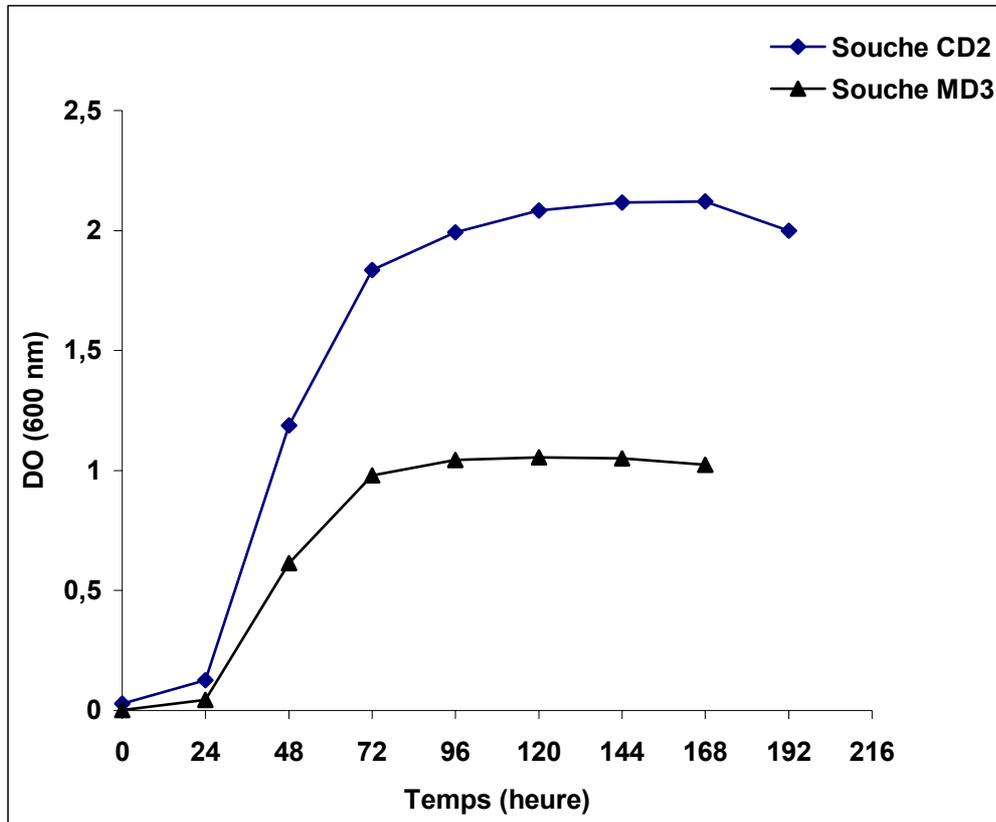


Figure 18 : Cinétique de croissance des souches CD2 et MD3

II.4. Mise en évidence de l'activité antibactérienne de CD2 et MD3 sur milieux liquides

Les agents responsables de l'inhibition des souches cibles diffusant à travers la gélose sont excrétés en dehors de la cellule productrice (agents extracellulaires). Par conséquent, en milieu liquide, ces agents se trouveraient dans les surnageants de culture des souches productrices. Cependant, ces agents antibactériens peuvent s'adsorber sur la paroi cellulaire.

II.4.1. Recherche de l'activité antibactérienne dans les surnageants

II.4.1.1 Souche CD2

Le pH du surnageant filtré (1800 ml) de la souche CD2 récupéré est de 5,77. Les résultats des tests d'activité effectués sur le surnageant filtré n'ont montré aucune zone d'inhibition autour des puits. Cela est probablement dû à une faible concentration de l'agent antibactérien. Des concentrations de 10, 50 et 100 fois ont été réalisées sur le surnageant. Seul le surnageant concentré 100 fois (pH 5,42) a révélé des zones d'inhibition (Figure 19). Les diamètres des zones d'inhibition sont calculés de la manière suivante :

Diamètre d'une zone d'inhibition = Diamètre mesuré – Diamètre du puit (11mm)

A cet effet, il y'a lieu de signaler que le surnageant de culture de l'halocine H6 produite par *Haloferax gibbonsii* a été concentrée 400 fois (20 L à 50 ml) (Torreblanca et al., 1989), celui de l'halocine HalR1 produite par *Halobacterium* GN101 a été concentrée 100 fois (Rdest et Sturm, 1987). Le faible rendement de l'activité antibactérienne pourrait être expliqué d'une part, par une faible production de l'agent antibactérien dans un milieu et des conditions de culture non optimisées et, d'autre part, par une perte de l'agent antibactérien lors de la filtration du surnageant.

En effet, il a été montré qu'une quantité considérable d'halocines s'adsorbe d'une manière non spécifique sur les membranes de nitrate de cellulose (Torreblanca et al., 1989).

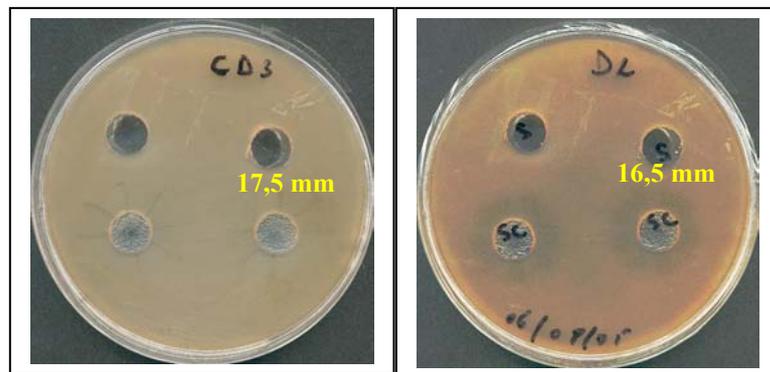


Figure 19 : Résultats de la mise en évidence de l'activité antibactérienne dans le surnageant (CD2)

II.4.1.2. Souche MD3

Le pH du surnageant filtré (1600 ml) de la souche MD3 récupéré est de 6,87. Les résultats des tests d'activité effectués sur le surnageant de la souche MD3 ont mis en évidence une activité antibactérienne vis-à-vis des souches CD2, MS4, CD3 et D2 (tableau XII). Cela démontre que l'agent antibactérien est produit à une concentration plus élevée par rapport à la souche précédente ou/et cet agent est plus actif que celui produit par la souche CD2. Afin d'augmenter la concentration de l'agent responsable de cette inhibition, nous avons concentré le surnageant 4 fois. Les tests effectués montrent une augmentation des zones d'inhibition par rapport à celles engendrées par le surnageant brut (figure 20). Par contre les souches MS2 et CS3 n'ont pas été inhibées avec le surnageant brut ni avec le surnageant concentré. Il faut signaler que ces deux souches ont présenté une sensibilité vis-à-vis de MD3 en milieu solide. Cela pourrait supposé que ces souches soit inhibées par une autre substance qui n'est pas révélée sur milieu liquide. Le pH du surnageant après concentration est de 7,05.

Tableau XII : Diamètres des zones d'inhibition des surnageants brut et concentré

Echantillon	Souches	
	Souche cible CD2	Souche cible MS4
Surnageant brut	8,1 mm	10,4 mm
Surnageant concentré 4 fois	11,2 mm	12,6 mm

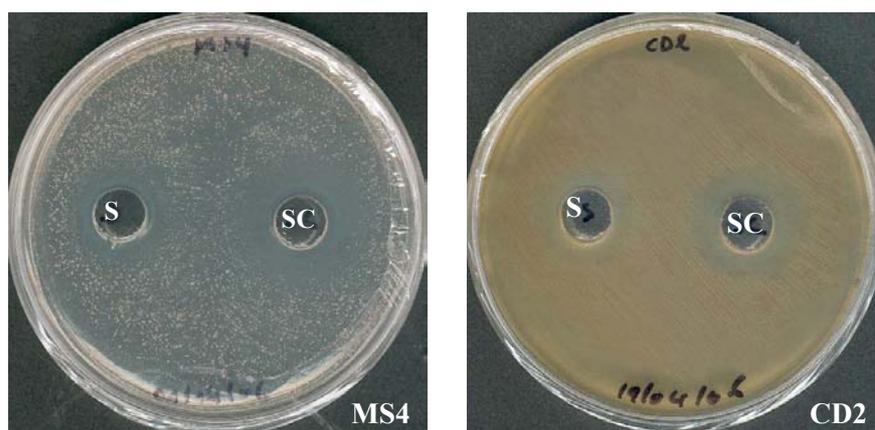


Figure 20 : Résultats de la mise en évidence de l'activité antibactérienne dans le surnageant (MD3).

II.4.2. Recherche de l'activité antibactérienne dans les Culots

Les deux culots, des souches MD3 et CD2, récupérés ont été traités suivant le protocole de Yang et ses collaborateurs (1992), dans le but de libérer les substances qui pourraient s'adsorber sur la paroi des cellules productrices. Ce protocole modifié a été établi à l'origine pour extraire les bactériocines des bactéries lactiques.

Afin de préserver l'intégrité des cellules et stabiliser les substances sels-dépendantes, nous avons remplacé le tampon phosphate préconisé par Yang et ses collaborateurs par de l'eau physiologique hypersalée à 15% de NaCl. Le lavage du culot récupéré avec de l'EPHS à pH 06, permet d'éliminer les débris et les organites qui se trouveraient dans le culot et favorise l'adsorption des substances actives sur la paroi des cellules. Le traitement du culot avec de l'EPHS à pH 2 permet de libérer les substances adsorbées sur les cellules. Le surnageant récupéré est testé pour son activité vis-à-vis des souches cibles.

Les résultats obtenus n'ont décelés aucune zone d'inhibition autour des puits contenant le surnageant de désorption. Ce résultat montre que l'agent antibactérien ne s'adsorbe pas sur les cellules ou il s'adsorbe à une concentration non décelable.

II.5. Caractérisation des agents antibactériens

L'activité antibactérienne révélée dans les surnageants peut être imputée à un certain nombre d'agents antibactériens qui peuvent inhiber les bactéries halophiles extrêmes à savoir : les acides organiques, les bactériophages, les halocines et l'eau oxygénée.

Cependant l'inhibition par les bactériophages est peu probable du fait que ces virus ne se diffusent pas à travers la gélose (Kekessey et Piguet, 1970 ; Tagg et McGiven, 1971)

Pour vérifier ces hypothèses, plusieurs tests ont été effectués sur les surnageants concentrés obtenus à partir des deux souches

II.5.1. Effet du pH sur l'activité des surnageants concentrés

Le pH acide (5,42) induit par la souche CD2 dans le surnageant peut être dû à la sécrétion d'acides organiques dans le milieu de culture. Ces acides peuvent inhiber le développement des souches cibles.

Les tests d'activité effectués sur le surnageant neutralisé (souche CD2) ont montré des zones d'inhibition vis-à-vis des souches cibles à la fois dans les puits contenant le surnageant concentré et le surnageant concentré neutralisé (figure 22). Le surnageant concentré de la souche CD2 ne perd pas son activité malgré la neutralisation du pH, ce qui montre que les acides organiques n'ont pas d'effet inhibiteur sur les souches cibles.

Le pH du surnageant concentré MD3 est de 7,05, ce qui nous mène à écarter d'avance l'effet inhibiteur des acides organiques vis-à-vis des souches cibles.

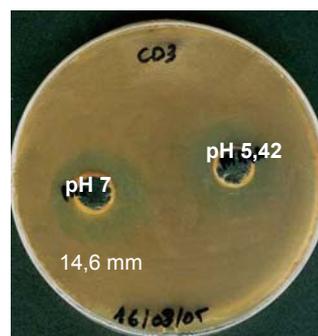


Figure 21 : Test d'activité du surnageant concentré (CD2) neutralisé vis-à-vis de la souche CD3

II.5.2. Effet de la catalase sur l'activité des surnageants concentrés

La présence d'eau oxygénée dans les surnageants concentrés peut inhiber les souches cibles. Le traitement des surnageants concentrés à la catalase a pour but d'éliminer le peroxyde d'hydrogène qui pourrait s'y trouver. Les résultats des tests d'activité révèlent des zones d'inhibition autour des puits contenant les surnageants concentrés et les surnageants concentrés traités à la catalase (Tableau VII, Figure 22) pour les deux souches.

Tableau XIII : Résultats des tests d'activité après traitement des surnageants concentré à la catalase

Echantillons	SC de la souche MD3		SC de la souche CD2		
	CD2	MS4	D2	CD3	MS1
SC	13,9 mm	10,9 mm	15	16,5	17
SC + Catalase	13,7 mm	10,5 mm	15,1	16	17,2
Catalase	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm

Ces résultats montrent que l'inhibition des souches cibles n'est pas due à l'effet inhibiteur de l'eau oxygénée dans les surnageants. Par ailleurs, on rappelle que les souches cibles sont toutes à catalase positive.

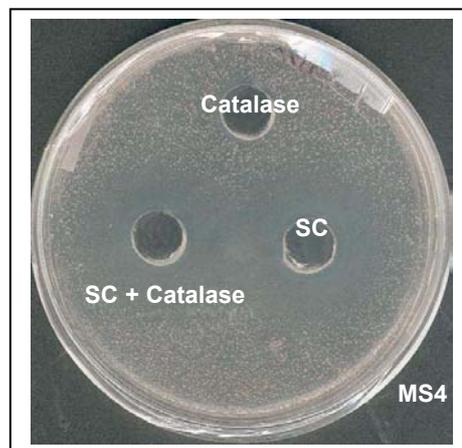


Figure 22 : Effet de la catalase sur l'activité du surnageant concentré

II.5.3. Effet de la température sur l'activité des surnageants concentrés

Les résultats obtenus après le traitement des surnageants à différentes températures 60°C, 80°C, 100°C et 120°C pendant 15 minutes ont montré des zones d'inhibition dans les puits contenant les surnageants traités à 60°C vis-à-vis des germes cibles (figure 23). Cependant les autres surnageants traités à 80°, 100°C et 120°C ont perdu leur activité inhibitrice. Par conséquent, les agents antibactériens produit par les deux souches ne résistent pas à un traitement thermique au-delà de 60°C pendant 15min, ce qui montre que les agents antibactériens produits sont thermolabiles.

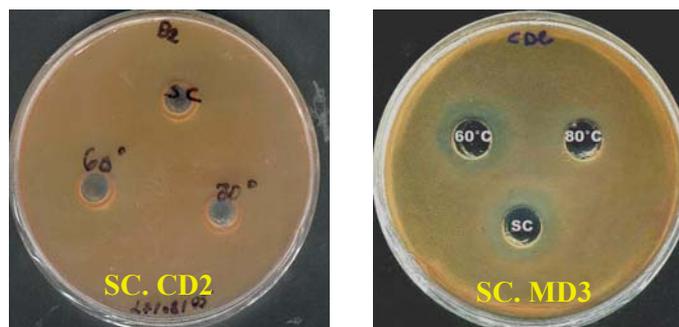


Figure 23 : Effet de la température sur l'activité des surnageants concentrés

II.5.4. Effet des protéases et de la ribonucléase A sur l'activité des surnageants concentrés.

La perte de l'activité antibactérienne du surnageant concentré après un traitement avec des protéases permet de révéler le caractère protéique de l'agent responsable de l'inhibition des souches cibles.

La possibilité que les souches cibles soient inhibées par les protéases ou la ribonucléase A utilisées, nous a amené à faire un puit témoin contenant l'enzyme testée dans chaque boîte de Pétri.

Le tableau ci-dessous représente les résultats des tests d'activité, des surnageants concentrés traités par les enzymes testées et leurs témoins, effectué vis-à-vis des souches cibles. Ces résultats sont observés pour toutes les souches cibles (CD3, D2, MS1, MS4, et CD2) et pour les deux surnageants concentré.

Tableau XIV : Résultats de l'effet des protéases sur les surnageant concentrés

Boîte Pétri Puits	Boîte 1	Boîte 2	Boîte 3	Boîte 4	Boîte 5
Surnageant concentré	+	+	+	+	+
Surnageant concentré traitée	+	+	+	+	+
Enzyme testée	Pronase +	Papaïne +	Trypsine +	α -chymotrypsine +	Ribonucléase A +

+ : Présence d'une zone d'inhibition

Les résultats montrent que toutes les souches cibles elles-même sont sensibles aux enzymes utilisées. Cet obstacle rend ces tests non exploitables. Par conséquent, nous avons essayé de contourner cet obstacle en éliminant l'action des enzymes par un traitement thermique à 60°C / 15min (Haseltine et *al.*, 2001 ; Motta et *al.*, 2004).

Le SC MD3 traité avec la pronase ainsi que ses deux témoins (Pronase et SC non traité) ont subi un traitement thermique à 60°C /15min suivi d'un test d'activité vis-à-vis de la souche MS4.

Le résultat obtenu montre une zone d'inhibition autour du puits contenant le SC (Figure 24). Cela montre que ce traitement thermique n'affecte pas l'activité antibactérienne du SC. Par contre, la pronase et le SC traité à la pronase ont perdu leur activité inhibitrice vis-à-vis de la souche MS4 après le traitement thermique, qui est traduit par l'absence de zones d'inhibition autour des puits. La perte de l'activité inhibitrice de l'enzyme est due à la dénaturation de la pronase par la chaleur. Cependant, le SC traité avec la pronase a perdu son activité parce que l'agent antibactérien a été détruit par la pronase. Ce qui confirme le caractère protéique de l'agent antibactérien produit par la souche MD3.

Comme la zone d'inhibition du SC traité a été totalement perdue, cela suggère que l'activité antibactérienne du SC MD3 est due seulement à une substance de nature protéique, ce qui exclut l'inhibition par des bactériophages.

Par défaut d'échantillon le traitement thermique n'a pas été effectué sur le SC de la souche CD2

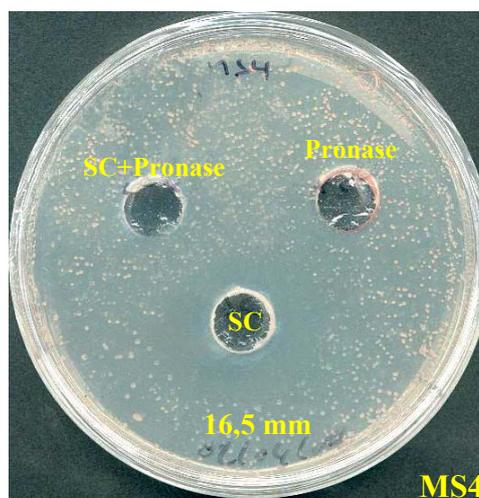


Figure 24 : Effet de la pronase sur le surnageant concentré (MD3)

II.5.5. Résultats de la dialyse des surnageants concentrés

Dialysé, le surnageant concentré de la souche CD2 a été testé vis-à-vis des souches halophiles et non halophiles. Les résultats obtenus révèlent que les souches cibles halophiles (CD3, D2 et MS1) sont toujours inhibées contrairement aux souches non halophiles où aucune zone d'inhibition n'a été décelée (Tableau XVII). Cela indique que cette substance antibactérienne est non sels-dépendante et n'a pas d'effet sur les germes non halophiles testés.

La dialyse du surnageant concentré (Souche MD3) a fait précipiter directement les constituants du surnageant à cause de l'élimination totale des sels. Les résultats obtenus montrent une perte de l'activité antibactérienne du surnageant dialysé vis-à-vis des souches halophiles et non halophiles. Cela indique que l'agent antibactérien est sel dépendant.

Tableau XV : Résultats des tests d'activité du surnageant concentré dialysé (souche CD2)

Souches	D2	CD3	MS1
Surnageant concentré dialysé	18,5 mm	19 mm	20,5 mm

Conclusion

Dans cette étude, nous avons recherché des souches halophiles extrêmes locales productrices de substances antibactériennes. Les isollements à partir de deux salines de la région de Bejaia ont abouti à une cinquantaine de souches se développant à de fortes concentrations en sel.

Le criblage de souches présentant une activité antibactérienne s'est porté sur 26 souches dont 12 se sont révélées douées d'une activité inhibitrice vis-à-vis d'au moins une souche halophile. Deux souches performantes ont été sélectionnées (CD2 et MD3).

Les substances antibactériennes produites par les souches sélectionnées ont été mises en évidence dans le surnageant concentré 100 fois pour la souche CD2 et dans le surnageant brut pour la souche MD3.

L'apparition de zones d'inhibition autour des puits contenant le SC traité à la catalase et le SC neutralisé a permis d'écartier l'effet inhibiteur de l'eau oxygénée et des acides organiques pour les deux souches. La perte de l'activité antibactérienne du SC (MD3) après un traitement à la pronase suggère que cette activité est due à la présence d'une substance antibactérienne possédant un caractère protéique. Cependant, les résultats obtenus pour le SC de la souche CD2 ne sont pas suffisants pour se prononcer sur la nature de l'agent antibactérien produit par la souche CD2.

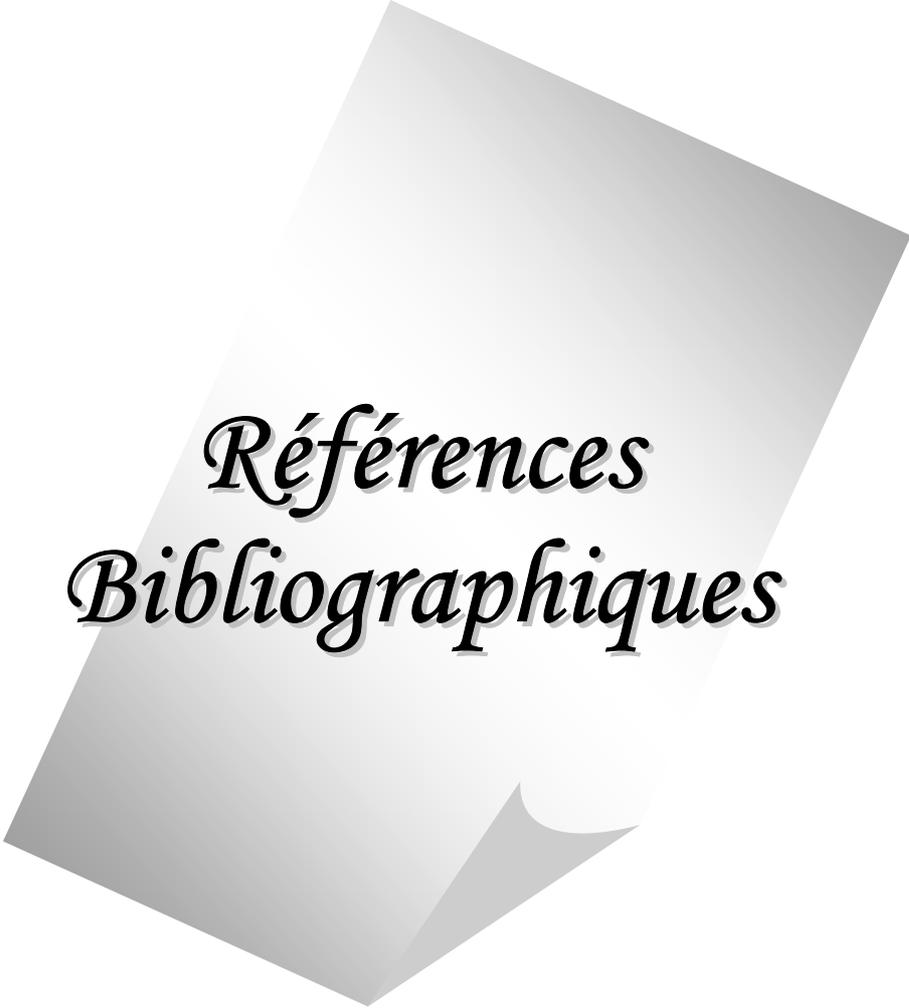
La dialyse ayant provoqué la précipitation des constituants d'une part et la perte de l'activité antibactérienne du SC dialysé d'autre part confirment le caractère sel-dépendant de la substance. Par contre, le SC de la souche CD2 ne perd pas son activité vis-à-vis des souches cibles halophiles testées après dialyse. Par conséquent la substance antibactérienne est sel non dépendante.

Les tests d'antagonisme effectués vis-à-vis des germes non halophiles révèlent que le surnageant concentré (souche CD2) n'a pas d'effet inhibiteur sur ces dernières.

Les résultats obtenus après le traitement des surnageants à différentes températures 60°C, 80°C, 100°C et 120°C pendant 15 minutes ont montré que les substances actives des deux souches ne résistent pas à un traitement à 80°C et plus, ce qui confirme leur thermolabilité.

En perspective de ce travail, plusieurs voies d'investigations sont envisageables :

- Etude taxonomique approfondie des souches productrices.
- Optimisation des milieux de production et des méthodes de récupération des substances.
- Approfondir la caractérisation des agents antibactériens notamment leur nature chimique.
- Purification des substances.
- Elargir le spectre aux germes pathogènes et halophiles contaminant des produits salés.



*Références
Bibliographiques*

Références Bibliographiques

- Baysse C., Meyer J.M., Plesiat P., Geoffroy V., Michel-Briand Y. and Cornelis P. (1999).** Uptake of Pyocin S3 Occurs through the Outer Membrane Ferripyoverdine Type II Receptor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **181** (12) : 3849–3851
- Benkerroum N., Oubel H., Zahar M., Dlia1 S. and Filali-Maltouf A. (2000).** isolation of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis subsp. lactis* and application to control *Listeria monocytogenes* in Moroccan jben. *Journal of Applied Microbiology* **89** : 960- 968.
- Cascales E., Buchanan S.K., Duche D., Kleanthous C., Llobès R., Postle K., Riley M., Slatin S. and Cavard D. (2007).** Colicin Biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **71** (1): 158 - 229.
- Chavan M.A. and Riley M.A. (2007).** Molecular Evolution of Bacteriocins in Gram-Negative Bacteria, In *Bacteriocins : Ecology and Evolution*, Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg : 19-43.
- 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. *Journal Bacteriology* **179** : 548 - 551.
- Cleland D., Krader P., McCree C., Tang J. and Emerson D. (2004).** Glycine betaine as a cryoprotectant for prokaryotes. *Journal of Microbiological Methods* **58** : 31- 38.
- DasSarma S. and Arora P. (2001).** Halophiles. *Encyclopaedia of life sciences*, Nature Publishing Group: 1- 9.
- Dussault H. P. (1955).** An improved technique for red halophilic bacteria. *Journal Bacteriology* **70** : 484-485.
- Dyall-Smith M.L. (2004).** The Halohandbook : Protocols for halobacterial genetics Ver 4.9. Haloarchaeal Genetics Laboratory, Department of Microbiology and Immunology, University of Melbourne, Australia : 5 - 7.
- Dyall-Smith M.L. (2006).** The Halohandbook : Protocols for halobacterial genetics Ver 6.01. Haloarchaeal Genetics Laboratory, Department of Microbiology and Immunology, University of Melbourne, Australia : 6 - 9.
- Ennahar S., Sashihara T., Sonomoto K. and Ishizaki A. (2000).** Class Iia bacteriocins : biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews* **24** : 85-106.

Gibons J.A.E., Miller M.R., Davies N.W., Neill G.P., Nichols D.S. and Volkman J.K. (2005). Unsaturated diether lipids in the psychrotrophic archaeon *Halorubrum lacusprofundi*. *Systematic and Applied Microbiology* **28** : 19-26.

Gillor O., Nigro L.M. and Riley M.A. (2005). Genetically engineered bacteriocins and their potential as the next generation of antimicrobials. *Current Pharmaceutical Design*. **11** : 1067-1075.

Gordon D.M., Oliver E. and Littlefield-Wyer J. (2007). The Diversity of Bacteriocins in Gram-Negative Bacteria, In *Bacteriocins : Ecology and Evolution*, Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg : 5 - 18.

Grant W.D., Kamekura M., McGenity T.J., and Ventosa A. (2001). Classe III. Halobacteria In *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd Ed. Springer-Verlag, New York 1 : 294 - 334.

Guiraud G.P. (1997). *Microbiologie alimentaire*, Ed. Duno, Paris 652 p

Haseltine C., Hill T., Montalvo-Rodriguez R., Kemper S.K., Shand R.F., Blum P. (2001). Secreted euryarchaeal microhalocins kill hyperthermophilic crenarchaea. *Journal of Bacteriology* **183** : 287- 291.

Heng N.C.K., Wescombe P.A., Burton J.P., Jack R. and Tagg J.R., (2007). The Diversity of Bacteriocins in Gram-positive Bacteria, In *Bacteriocins : Ecology and Evolution*, Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg : 45 - 92.

Hetz C., Bono M., Barros L. and Lagos R. (2002). Microcin E492, a channel-forming bacteriocin from *Klebsiella pneumoniae*, induces apoptosis in some human cell lines. *PNAS* **99** (5) : 2696 - 2701.

Hezayen F.F., Tindall B.J., Steinbüche and Rehm B.H.A. (2002). Characterization of novel halophilic archaeon, *Halobiforma haloterrestriis* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Natronobacterium nitratireducens* to *Halobiforma nitratireducens* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52** : 2271 - 2280.

Jack R.W., Tagg R.J. and Ray B. (1995). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiological Reviews* **59** (2) : 171 -200.

Joo W.A. and Kim C.H. (2005). Proteomic of halophilic Archaea. *Journal of Chromatography B* **815** : 237- 250.

Kamekura M. and Dyll-Smith M.L. (1995). Taxonomy of the family *Halobacteriaceae* and the description of two new genera *Halorubrabacterium* and *Natrialba*. *Journal of General Applied Microbiology* **41** : 333-350.

Kamekura M. (1998). Diversity of extremely halophilic bacteria. Review, *Extremophiles* **2** : 289 - 295.

Kamekura M. and Kates M. (1999). Structural diversity of Members of *Halobacteriaceae*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. **63** : 969 - 972

Kandler A. and Konig H. (1998). Cell wall polymer In Archaea (Archaeobacteria). *CMLS. Cellular and Molecular Life Sciences* **54** : 305-308.

Kates M. (1993). Membrane lipids of Archaea, In the biochemistry of Archaea, Ed. Elsevier science publisher BV : 261-295.

Kates M. (1996). Structural analysis of phospholipids and glycolipids in extremely halophilic archaeobacteria. *Journal of Microbiological Methods* **25** : 113-128.

Kekessy D.A. and Piguet J.D. (1970). New Method for Detecting Bacteriocin Production. *Applied Microbiology, American Society for Microbiology*, **20** (2) : 282 - 283.

Kemperman R., Kuipers A., Karsens H., Nauta A., Kuipers O. and Kok J. (2003). Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. *Applied and Environmental Microbiology* **69** : 1589 - 1597.

Kushner D.J., (1992). Growth and nutrition of halophilic bacteria, In *The biology of halophilic bacteria*, CRC Press : 87-90.

Leavitt R.W., Braithwaite C. and Jensen M.M. (1997). Microcin C38 produced by *Escherchia coli* strain 38. *Avian Diseases* **41** : 568 - 577

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** : 401 – 407.

Litchfield CD. (2002). Halophiles. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **28** : 21 - 22.

McAuliffe O., Ross R.P. and Hill C. (2001). Lantibiotiques : structures, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews* **25** : 285 - 308.

McGenity T.J., Gemmell R.T., Grant W.D. and Stan-Lotter H. (2000). Origins of halophilic microorganisms in ancient salt deposits. Minireview, *Environmental Microbiology* **2** (3) : 243 - 250.

Meseguer I. and Rodriguez-Valera F. (1985). Production and purification of halocin H4. *FEMS Microbiology Letters* **28** : 177 - 182.

Meseguer I. and Rodriguez-Valera F. (1986). Effect of halocin H4 on cells of *Halobacterium halobium*. *Journal of General Microbiology* **132** : 3061–3068.

Meseguer I., Rodriguez-Valera F. and Ventosa A. (1986). Antagonistic interactions among halobacteria due to halocin production. *FEMS Microbiology Letters* **36** : 177-182.

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

Montalvo-Rodriguez R., Vreeland R.H., Oren A., Kessel M., Betancourt C. and Lopez-Garriga J. (1998). *Halogeometricum borinquense* gen. nov., sp. nov., a novel halophilic archaeon from Puerto Rico. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48** : 1305 - 1312.

Morisset D., Berjeaud J.M., Frère J. and Héchard y. (2005). Bactériocines de bactéries lactiques, In *Bactéries lactiques et probiotiques*, Ed. Tec et Doc Lavoisier : 113-194.

Motta A.S., Cladera-Olivera F. and Brandelli A. (2004). Screening for antimicrobial activity among bacteria isolated from the Amazon Basin. *Brazilian Journal of Microbiology* **35** : 307-310.

Moustardier G. (1972). *Bactériologie médicale*, 4^{ème} Ed. Librairie Malaine S.A. Editeur, Paris : 261-275.

Nes I.F., Diep D.B., Havarstein L.S. bururberg M.B., Eijsink V. and holo H. (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **70** : 113-128.

O'Connor E.M. and Shand R.F. (2002). Halocins and sulfolobocins: The emerging story of Archaeal protein and peptide antibiotics. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **28** : 23–31.

Oren A. (1992). Ecology of extremely halophilic microorganisms, In *The biology of halophilic bacteria*, CRC Press : 25-28.

Oren A., Gurevich P., Gemmell R.T. and Teske A. (1995). *Halobaculum gomorerense* gen. nov., sp. Nov. a Novel Extremely Halophilic Archaeon from the Dead Sea. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45** (4) : 747-754.

Oren A., Ventosa A. and Grant W.D. (1997). Proposed minimal standards for description of new taxa in the order Halobacteriales. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47** (1): 233 - 238.

Oren A. and Rodriguez-Valera F. (2001). The contribution of halophilic Bacteria to the red coloration of saltern crystallizer ponds. *FEMS Microbiology Ecology* **36** : 123-130.

Oren A., (2002a). Taxonomy of halophilic microorganism : Archaea, Bacteria and Eucarya, In *Halophilic Microorganisms and Their Environments*, Ed. Springer : 23-26.

Oren A. (2002b). Diversity of halophilic microorganisms : Environments, physiology and applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **28** : 56 - 63.

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

Platas G. Meseguer I. and Amils R. (1996). Optimization of the production of a bacteriocin from *Haloferax mediterranei* Xia3. *Microbiologia sem* **12** : 75- 84

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

Prangishvili D., Holz I., Stieger E., Nickell S., Kristjansson J.K. and Zillig W. (2000). Sulfolobocins, specific proteinaceous toxins produced by strains of the extremely thermophilic Archaeal genus *Sulfolobus*. *Journal of Bacteriology* **182** : 2985 - 2988

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

Rdest U. and Sturm M. (1987). Bacteriocins from halobacteria protein purification. *Micro to Macro* : 271 - 278.

Riley M.A. and Wertz J.E. (2002). Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annual Review of Microbiology* **56** : 117 - 137

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

Rodriguez-Valera F. (1992). Introduction to saline environments, In the biology of halophilic bacteria, CRC Press : 01 - 03.

Romano I., Gambacorta A., Lama L., Nicolaus B. and Giordano A. (2005). *Salinivibrio costicola* subsp. *Alcaliphilus* subsp. Nov., a haloalkaliphilic aerobe from Campania Region (Italy). *Systematic and Applied Microbiology* **28** : 34 - 42.

Savage KN., Krumholz KR., Oren A. and Elshahed MS. (2007). *Haladaptatus paucihalophilus* gen. nov., sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a low-salt, sulfide-rich spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**: 19 - 24.

Shand R.F., Price L.B. and O'Connor E.M. (1999). Halocins: protein antibiotics from hypersaline environments. In *Microbiology and biogeochemistry of hypersaline environments*. CRC Press, Boca Raton, FL : 295 - 306.

Shand R.F. (2006). Detection, quantification and purification of halocins: peptide antibiotics from haloarchaeal extremophiles, In *Methods in Microbiology Extremophiles*, Ed. Elsevier /Academic Press, Amsterdam **35** : 703 - 718

Shand R.F. and Leyva K. J. (2007). Peptide and Protein Antibiotics from the Domain *Archaea*: Halocins and Sulfobiocins, In *Bacteriocins : Ecology and Evolution*, Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg : 93 - 109.

Shiraldi C., Giuliano M and De Rosa M. (2002). Perspectives on biotechnological applications of Archaea. *Heron Publishing-Victoria, Canada* **1** : 75-86.

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 - 549.

Tagg J. R. and McGiven A. R. (1971). Assay System for Bacteriocins. *Applied Microbiology* **21** (5) : 943.

Tagg J.R., Dajani A.S., and Wannamaker L.W. (1976). Bacteriocins of Gram-positive Bacteria. *Bacteriological reviews, American Society for Microbiology* **40** (3) : 722-756.

Tindall B.J. (1989). Cultivation and preservation of members of the family *Halobacteriaceae*. Technical information sheet N°6. Published by UNISCO/WFCC-Education Committee : 1- 4.

Torreblanca M., Rodriguez-Valera F., Juez J., 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. *Systematic and Applied Microbiology* **8** : 89 - 99.

Torreblanca M., Meseguer I. and Rodriguez-Valera F. (1989). Halocin H6, a bacteriocin from *Haloferax gibbonsii*. *Journal of General Microbiology* **135** : 2655-2661

Torreblanca M., Meseguer I. and Ventosa A. (1994). Production of halocin is a practically universal feature of Archaeal halophilic rods. *Letters Applied Microbiology* **19** : 201 - 205.

Trachtenberg S., Pinnick B. and Kessel M. (2000). The Cell Surface Glycoprotein Layer of the Extreme Halophile *Halobacterium salinarum* and Its Relation to *Haloferax volcanii*: Cryo-electron Tomography of Freeze-Substituted Cells and Projection Studies of Negatively Stained Envelopes. *Journal of Structural Biology* **130** : 10 - 26.

Vreeland R.H. (1992). Taxonomy of halophilic bacteria In *The biology of halophilic bacteria*, CRC Press : 105-109.

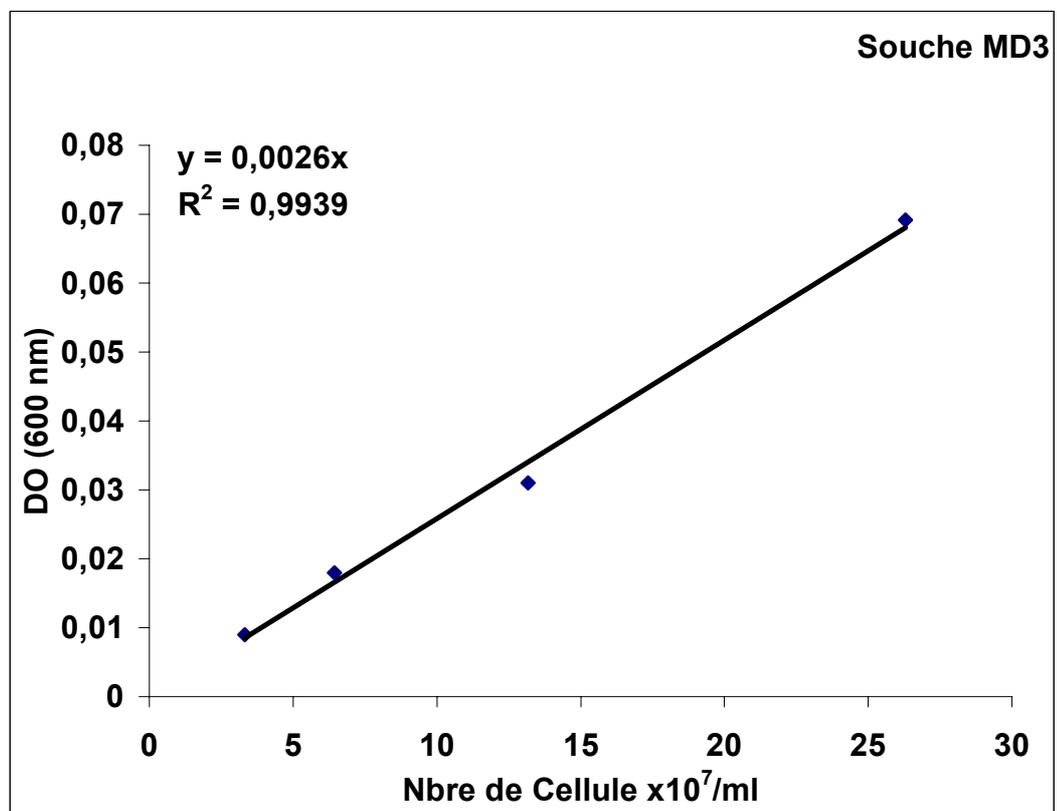
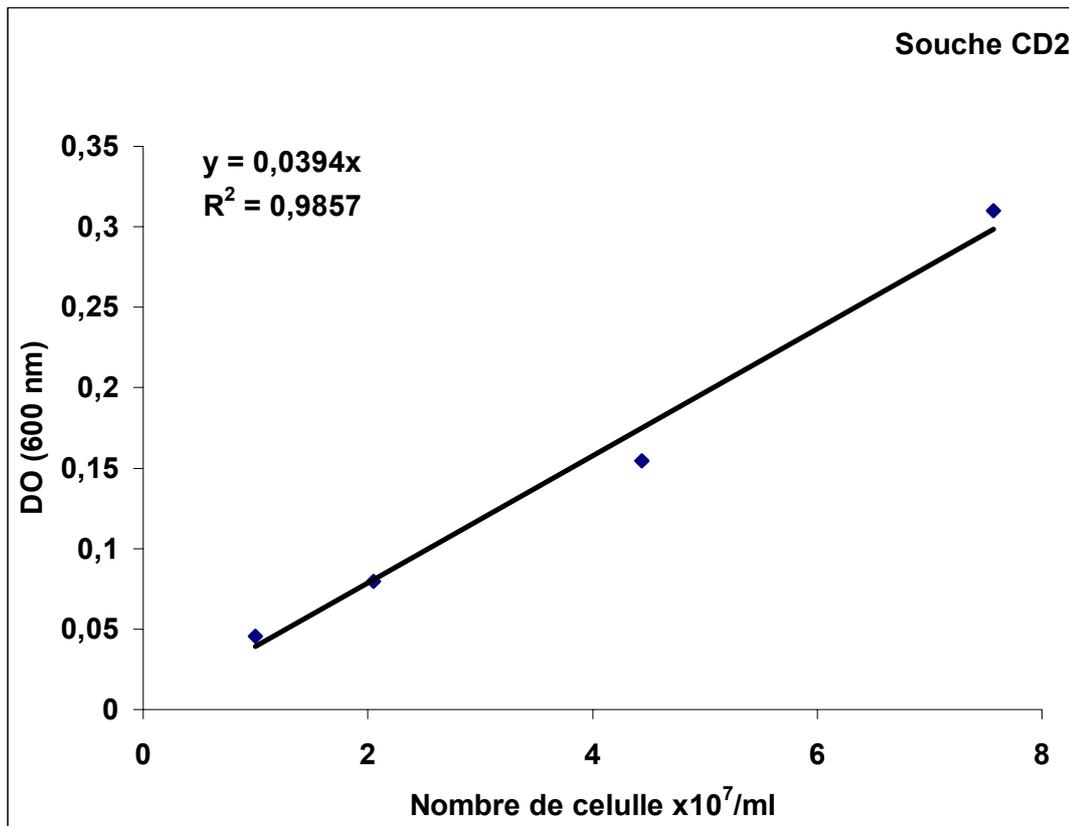
Xin H., Itoh T., Zhou P., Suzuki K., Kamekura M. and Nakase T. (2000). *Natrinema versiform* sp. Nov., an extremely halophilic archaeon ferom Aibi salt lake, Xinjiang, China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50** : 1297 - 1303.

Yala D., Merad A.S., Mohamedi D. and Ouar Korich M.N. (2001). Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb* **91** : 5 - 11.

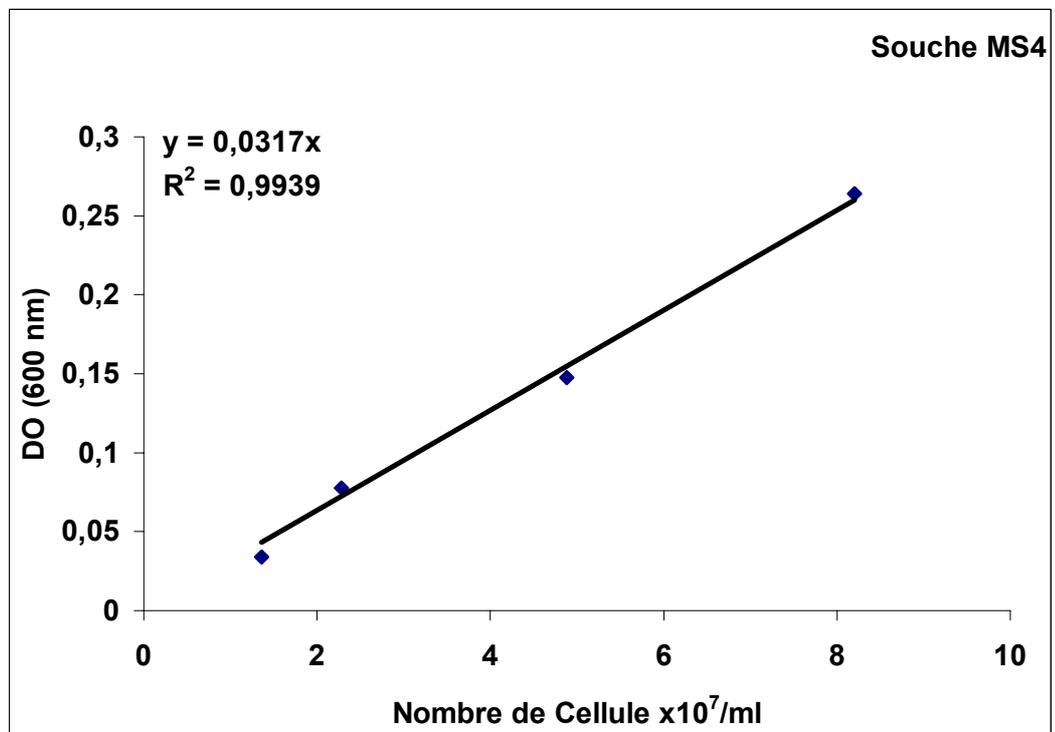
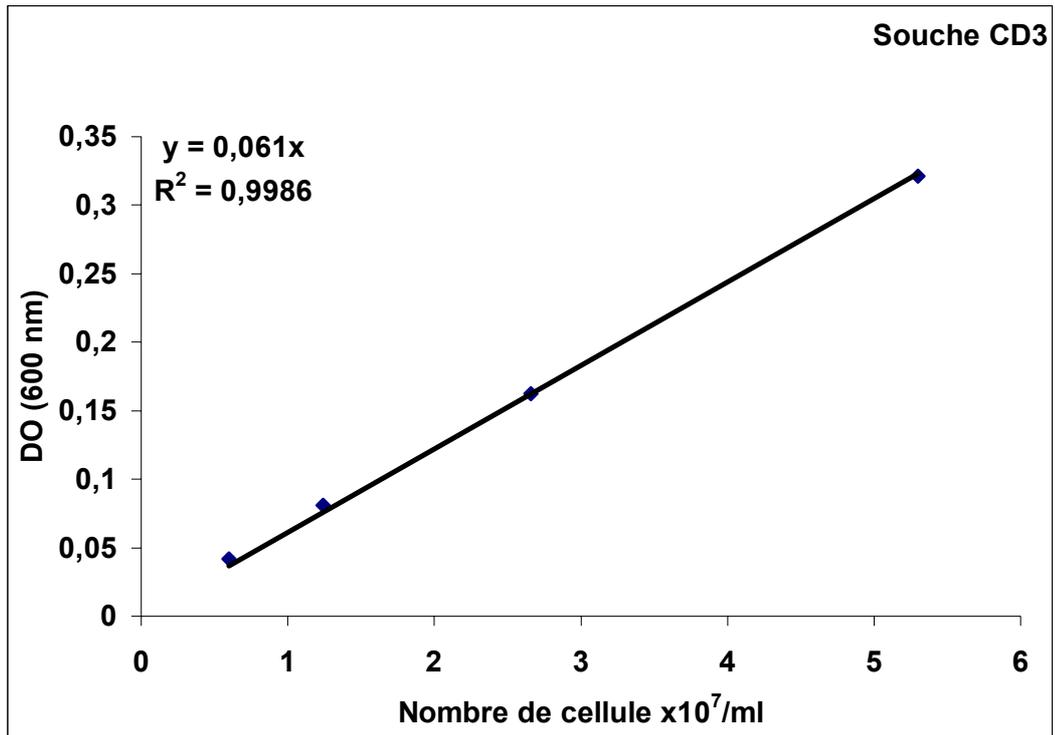
Yang R., Johnson M.C. and Ray B. (1992). Novel Method to Extract Large Amounts of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology **58** (10) : 3355 - 3359.

Annexes

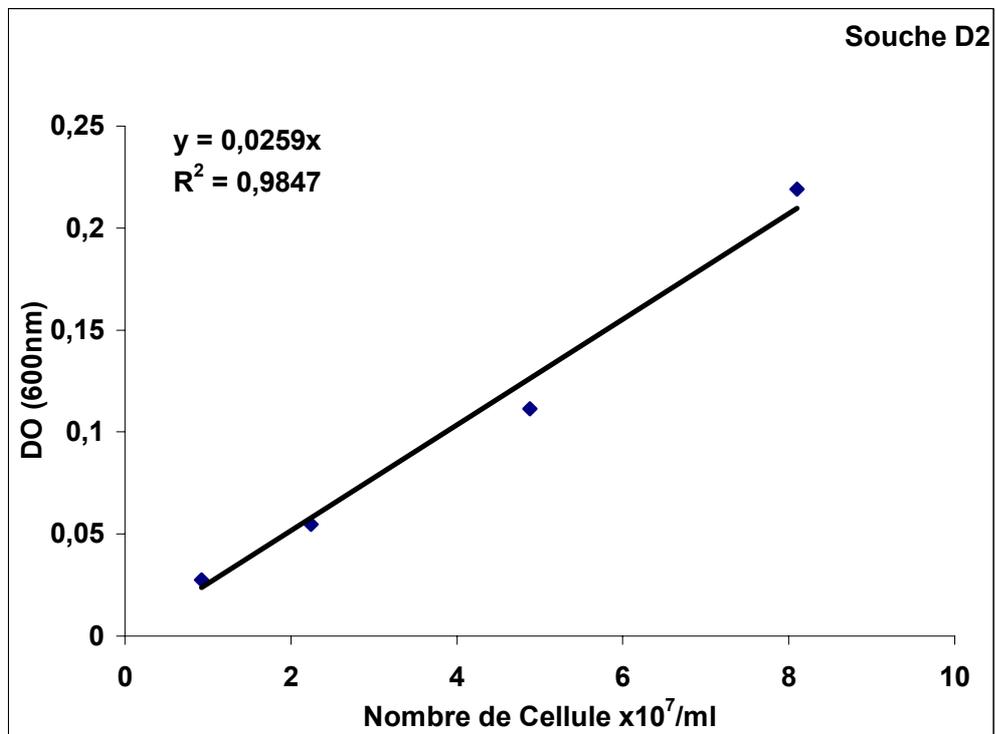
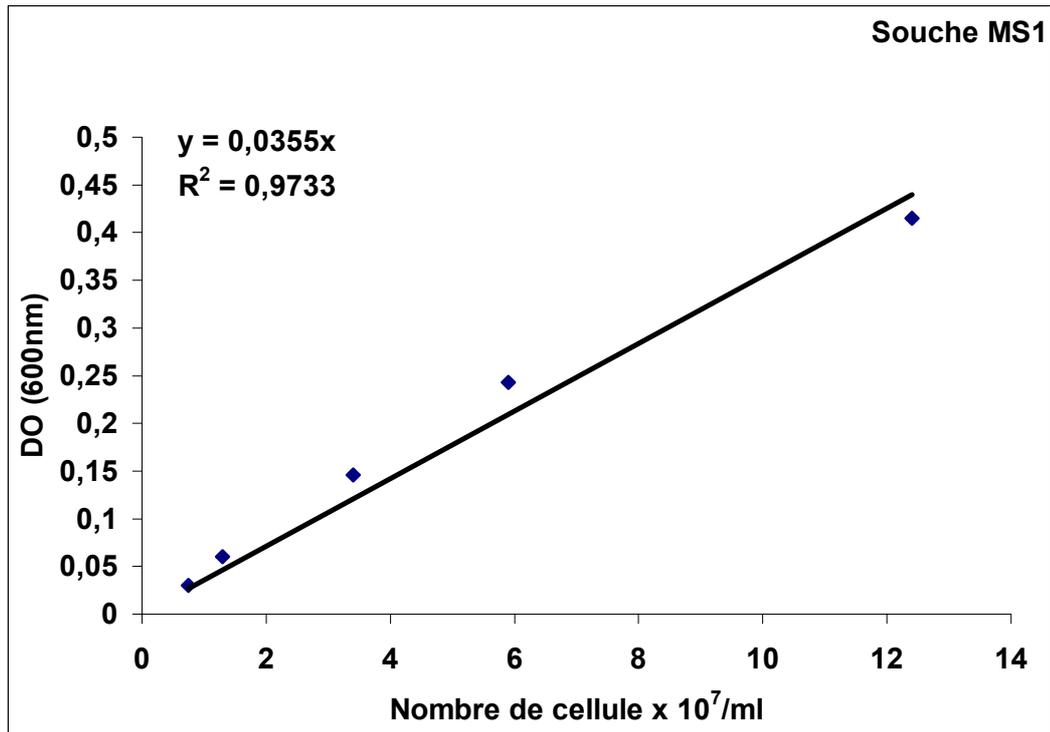
Annexe



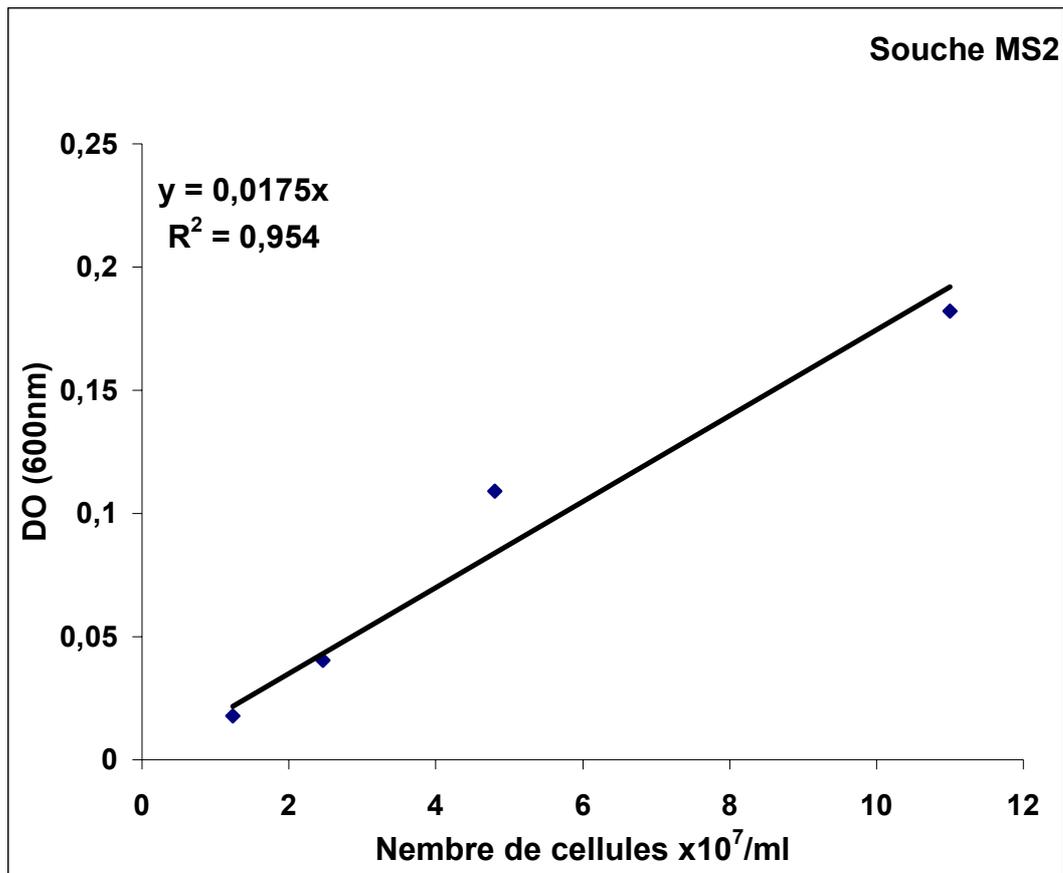
Annexe



Annexe



Annexe



Résultats de l'antibiogramme

Souches	Zones d'inhibition (mm)				
	Chloramphénicol	Erythromycine	Ampicilline	Pénicilline	Rifampicine
CD2	0	0	0	0	19
CD3	0	0	0	0	26
D2	0	0	0	0	22,6
MD3	0	0	0	0	0
MS1	0	0	0	0	0
MS2	0	0	0	0	11,3
MS4	0	0	0	0	24,9

Annexe

Milieux de culture

Eau physiologique

Chlorure de sodium 8,5g

Eau distillée 1000ml

Autoclaver 20min à 120°C

Mueller Hinton

Extrait de viande 2g

Hydrolysate acide de caséine 17,5g

Amidon 1,5g

Agar 5g

pH 7,4

Autoclaver 15min à 115°C

Milieu M (en g/l)

Extrait de levure 10

Peptone pepsique de viande 1

Amidon soluble 2

KCl 2

Na₃-citrate 3

MgSO₄ 7H₂O 20

FeCl₂ 0,072

NaCl 150, 200 ou 250

Milieu M1 (en g/l)

Extrait de levure.....	1
Peptone pepsique de viande.....	1
Amidon soluble.....	2
K ₂ SO ₄	5
CaCl ₂	0,1
MgCl ₂ , 6H ₂ O	180
NaCl.....	125

Milieu M2 (en g/l)

Extrait de levure.....	1
Peptone pepsique de viande.....	1
Amidon soluble.....	2
K ₂ SO ₄	5
CaCl ₂	0,1
MgCl ₂ , 6H ₂ O	32
NaCl.....	205

Résumé

Des isollements à partir de deux salines de la région de Bejaia à savoir celle de FERAOUN et SEDDOUK ont abouti à une cinquantaine d'isolats. Le criblage de souches à activité antibactérienne a porté sur 26 souches dont 12 se sont révélées douées d'une activité inhibitrice vis-à-vis d'au moins une souche halophile extrême. Deux souches performantes CD2 et MD3 sont sélectionnées. Après production de l'agent antibactérien sur milieu liquide en fermenteur, les surnageants et les culots sont récupérés. Les tests effectués sur les deux culots révèlent une absence totale d'activité antibactérienne. Par contre dans les surnageants, l'activité antibactérienne a été révélée dans le surnageant brut pour la souche MD3 et le surnageant concentré 100 fois pour la souche CD2.

Les résultats obtenus après les tests de caractérisation ont montré que les substances actives des deux souches :

- Ne résistent pas à un traitement à 80°C/15min.
- Ne perdent pas leurs activités à pH 7, ce qui exclu l'effet inhibiteur des acides organiques.
- Le traitement à la catalase n'affecte pas leur activité inhibitrice ce qui permet d'écarter l'inhibition par l'eau oxygénée.
- Le traitement des surnageants avec les différentes protéases et la Ribonucléase a permis de suggérer que la substance active de la souche MD3 est de nature protéique. Cependant nous ne pouvons pas se prononcer sur la nature de la substance antibactérienne de la souche CD2.
- La dialyse des surnageants concentrés a montré que la substance antibactérienne de la souche MD3 est sel-dépendante, contrairement à celle de CD2.

Mots clés : Haloarchaea, halocine, bactériocine, criblage

Abstract

Fifty isolates were obtained from two Bejaia salt-saltens (FERAOUN and SEDDOUK).

Screening of strains with antimicrobial activity of 26 isolates allowed the selection of 12 isolates with an antimicrobial activity toward at least an extreme halophilic strain. Of theme, 2 isolates called CD2 and MD3 are retained. After production of the antimicrobial agent on liquid medium using a fermentor, the supernatants and the pellet were recovered. Activity were not found in the pellet, but in the supernatants of MD3 and in the 100 times-supernatant concentrated of CD2.

Characterization of the active substances showed that these substances are susceptible to an 80°C/15min treatment, and the treatment with catalase does not affect their inhibiting activities.

The treatment of the supernatants with various proteases allowed to hypothesize that the substance produced by of MD3 isolate is of protein nature, however we are not able to precise the nature of the antimicrobial substance produced by the CD2 isolate.

The dialysis of the concentrated supernatants showed that the antimicrobial substance of MD3 isolate is salt dependent, contrary to that of CD2.

Mots clés : Haloarchaea, halocin, bacteriocin, Screening

ملخص

إن تحليل العينات المأخوذة من ملاحتي "فرعون" و "صدوق" بمنطقة بجاية أدى إلى الحصول على خمسين عزلة بكتيرية. و قد تم اختيار 26 عزلة من بين هذه الخمسين لدراسة نشاطها المثبط للبكتيريا، مما أظهر 12 عزلة مثبطة للبكتيريا المحبة للملح. من بينها اختيرت عزلتين (MD3 و CD2) ذات تأثير فعال. و لدراسة نوعية هذه المواد المثبطة تم وضع كل من العزلتين في وسط نمو سائل خاضع لآلة مخمرة، ثم عزل مكوناتها بألة الطرد المركزي والحصول على جزأين : الجزء الراسب و الجزء الطافي. اختيار الأجزاء الراسبية لكل من العزلتين MD3 و CD2 بين الانعدام الكلي للنشاط المثبط للبكتيريا، على عكس الأجزاء الطافية فقد لوحظ ؛

- ظهور القدرة النشاطية المثبطة في الجزء الطافي للعزلة MD3 و في الجزء الطافي المركز 100 مرة للعزلة CD2.
 - بعد إجراء اختبارات التشخيص تبين أن هذه المواد الناشطة المثبطة للبكتيريا :
 - غير مقاومة لدرجة حرارة 80°م/15 دقيقة.
 - لا تفقد خاصيتها في الوسط المعتدل، الشيء الذي يستبعد التأثير المثبط للأحماض العضوية.
 - لا تتأثر بالمعالجة بأنزيم "الكاتالاز" مما يستبعد أيضا التثبيط بالماء الأكسجيني.
 - المعالجة للأجزاء الطافية بمختلف الأنزيمات البروتينية، و الريبونوكلياز سمحت لنا باعتبار أن المادة الناشطة الناتجة من العزلة MD3 ذات طبيعة بروتينية، بينما لا يمكن استخراج نتيجة حول طبيعة المادة المثبطة للبكتيريا بالنسبة للعزلة CD2.
 - نزع الأملاح المعدنية لا يفقد خاصيتها للعزلة CD2 مما يسمح لنا القول أن المادة المثبطة مستقلة عن الأملاح المعدنية، على عكس المادة المثبطة للعزلة MD3 التي تعتمد على وجود الأملاح المعدنية.
- الكلمات المفتاحية :** هتواركي، هتوسين، بكتريسيين، إختيار