

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

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de de Microbiologie

Spécialité : Biotechnologie microbienne



Réf:

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

MASTER

Thème

***Production de substance antimicrobienne
par des microorganismes halophiles***

*Présenté par :
Djouder Mounira
Soutenu le : 18 /09/ 2023*

Devant le jury composé de :

Mme Salimi A.

MCA

Présidente

Mme Idres N.

MCB

Encadrante

Mme Bouktit N.

MAA

Examinatrice

Année universitaire : 2022 / 2023

Dédicace

Je dédie ce travail :

Au meilleur papa du monde, l'homme qui s'est sacrifié pour me voir réussir dans ma vie, me rendre heureuse. Que Dieu le garde

A ma vie et la source de mon bonheur « ma mère », qui m'a guidée vers Le bon chemin et qui a fait l'impossible pour me voir réaliser mes rêves.

Aux personnes qui m'ont aidée et encouragée : mes très chers frères "Mourad, Abdéslam et Azzedine", ma chère sœur "Siham".

Que Dieu les garde et protège.

A mes cousins et cousines.

A mes chères amies.

Remerciements

Avant toute chose, nous tenons à remercier « Allah » qui nous a donné la force et la volonté pour terminer ce travail.

Profonds remerciements et gratitude s'adressent à l'encadrante Mme Idres Nacera pour sa précieuse aide, ses orientations et le temps qu'elle a accordé pour l'encadrement.

Je tiens aussi à présenter mes vifs remerciements et mon respect au jury pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant d'évaluer ce mémoire.

Mme Salmi Adouda en tant que présidente du jury.

Mme Bouktit Nadia en tant qu'examinatrice.

Je remercie également l'ensemble du personnel de la spécialité biotechnologie microbienne de la faculté des Sciences de la vie et aussi à mes chers amis.

À toutes les personnes qui de près ou de loin m'ont apporté leur aide.

Sommaire

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....	1
Chapitre 1. Halophiles extrêmes	2
1.1. Les procaryotes halophiles.....	2
1.2. Les archées	2
1.3. Caractéristiques différentielles entre les trois domaines du vivant.....	3
1.4. Les Haloarchaea	4
1.5. Principales caractéristiques des halophiles	5
1.5.1. Enzymes	5
1.5.1.1. Protéases	6
1.5.1.2. Lipases et estérase.....	6
1.5.1.3. Alpha-amylase	26
1.5.2. Pigments.....	26
1.5.2.1. Caroténoïdes.....	26
1.5.2.2. Bactériorubérine.....	26
1.5.3. Adaptation macromoléculaire des microorganismes halophiles extrêmes.....	27
1.6. Stratégies adaptation en milieu salé.....	27
1.6.1. Stratégie « Salt-in ».....	27
1.6.2 Stratégie « Osmolytes organiques »	28
Chapitre 2. Les halocines.....	29
2.1. Classification.....	10
2.2. Production d'Halocines.....	11
2.3. Mécanisme d'action des halocines.....	311
2.4. Différentes halocines et leurs caractéristiques	12
Chapitre 3 : Matériel et méthode.....	13
3.1 Matériel	14
3.1.1. Matériel biologique	14
3.1.2. Germes cibles.....	15
3.1.3. Surnageants et Cultures	15
3.1.5. Milieux de culture	15
3.2. Méthodes	16
3.2.1. Centrifugation des cultures halophiles extrêmes.....	16
3.2.2. Préparation du germe cible	16
3.2.2.1. Préparation de l'inoculum	366
3.2.2.2. Culture en Erlenmeyer.....	366
3.2.3. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne	366
3.3. Extraction par solvants organiques	17
3.4. Extraction acide à froid des protéines totales à partir des surnageants de culture	18
3.5. Mise en évidence des activités enzymatiques.....	18
3.6. Effet de la température sur les extraits protéiques	19
Chapitre 4 : Résultats et discussion.....	21
4.1. Activité antimicrobienne des différents surnageants de culture	21
4.2. Activité enzymatique des surnageants de culture.....	22
4.3. Extraction des substances actives à partir des surnageants de cultures	23

4.3.1.Extraction par solvants organiques.....	23
4.3.2. Extraction acide à froid	26
4.4. Traitement des extraits protéiques à la chaleur.....	28
Conclusion.....	29

Références Bibliographiques

Milieus de culture « milieux hypersalés utilisés pour la culture de souches halophiles extrêmes ».

Milieu liquide salin (g/l)

Milieu semi solide modifié M372 (g/l)

Milieu pour la production modifié (g/l)

Milieu Halobacterium (MH) (g/l)

I. Appareillage

II. Verrerie et petit matériel

III. Produits chimiques

Résumé

Liste des abréviations

% :	pourcentage
°C :	degré Celsius
µg :	microgramme
µl :	microlitre
DSMZ :	Deutsche Sammlung von Microorganismen and Zellkulturen
Ep :	extrait protéique
h :	heure
kDa :	kilo Dalton
MC :	milieu complexe
MH :	milieu Halobacterium
Mm :	millimètre
mn :	minute
M syth :	milieu synthétique
NaCl :	chlorure de sodium
nm :	nanomètre
DO :	densité optique
rpm :	tours par minute
SC :	surnageant de culture
SC E :	surnageant de culture extrait
V/V :	volume/ volume
ZI :	zone d'inhibition

Liste des figures

-Figure 1	Résumé de la classification actuelle du domaine des archées.....	05
-Figure 2	Protocole de l'extraction acide et à froid des protéines totales	18
-Figure 3	Activité des surnageants de culture sur <i>E.coli</i>	21
-Figure 4	Activités hydrolytiques des différents surnageants, A : estérase ; B : lipase ; C : gélatinase et D : amylase	23
-Figure 5	Extraction liquide - liquide des substances bioactives à partir des surnageants de culture	24
-Figure 6	Extraction des substances bioactives à partir des surnageants de culture B1, A3 et F9 par l'éthanol.....	26
-Figure 7	Activité sur <i>S aureus</i> (A) et hydrolyse de la CMC (B) dans le précipité l'éthanol	
-Figure 8	Activité des Ep sur <i>H.salinarum</i>	27
-Figure 9	Effet de chauffage à 100°/ 5 min sur l'activité de la gélatinase dans le de D1.....	28

Liste des tableaux

* Tableau. I	Comparaison entre les trois domaines du vivant	03
* Tableau. II	Peptides/protéines antimicrobiens, Archaeocines produites par <i>Archaea</i>	10
* Tableau. III	Propriétés biochimiques des halocines produites par différentes souches <i>d'Haloarchaea</i>	13
* Tableau. IV	Origine et caractéristiques des souches <i>d'Haloarchaea</i> utilisées.....	14
*Tableau .V	Paramètres physiques des différentes souches halophytes extrêmes.....	17
*Tableau. VI	Volumes d'extraction des surnageants.....	17
*Tableau .VII	Activité antimicrobienne des surnageants de cultures.....	21
*Tableau .VIII	Activité enzymatique des différents surnageants de culture.....	22
* Tableau .IX	Activités antimicrobienne dans les extraits aux solvants organiques.....	25
* Tableau X	Activités enzymatique dans les extraits aux solvants organiques.....	25
*Tableau .XI	Activités antimicrobienne des extraits protéiques (Ep).....	27

Introduction

Introduction

Actuellement, la biotechnologie revêt une grande importance dans de nombreux domaines d'application tant dans l'industrie que dans la vie quotidienne.

L'utilisation appliquée d'une large gamme de biomolécules telles que les enzymes comme biocatalyseurs, les antioxydants, les antibiotiques et les bioplastiques, entre autres composés naturels commercialisés ou étudiés, est bien établie. Tous les microorganismes halophiles, en particulier les *Haloarchaea*, montrent des voies métaboliques spécifiques adaptées aux conditions extrêmes. Ils sont considérés comme des sources naturelles à partir desquelles des biocomposés naturels peuvent être isolés (**Giani et al., 2019**).

De plus, leurs métabolismes adaptés aux conditions extrêmes les rendent potentiellement aptes à être produit à grande échelle avec un risque réduit de contamination microbienne (**Giani et al., 2019**).

Il est de plus en plus important de trouver des solutions alternatives à la résistance aux antibiotiques qui nécessitent davantage de recherche. Il existe diverses substances antimicrobiennes produites par les organismes vivants, comme leurs réactions immunitaires ou de leurs mécanismes de défense, ce qui pourrait renforcer leur capacité à rivaliser pour l'espace et les ressources, autant que les agents anti microbiens qui sont des peptides antimicrobiens prometteurs dotés d'activités inhibitrices et bactéricides qui pourraient constituer l'une de ces solutions.

Plusieurs stratégies ont été mises en œuvre pour contrôler les bactéries pathogènes propagées dans les fromages, l'une d'elles utilise les substances anti microbiennes ou inhibitrices de type bactériocines (BLIS). Pour réduire les agents pathogènes d'origine alimentaire et les bactéries d'altération dans le fromage, les bactériocines peuvent être appliquées de plusieurs manières, telles que l'inoculation du fromage avec une souche productrice de substances anti microbiennes et l'ajout de produits purifiés ou de la bactériocine semi-purifiée comme additif alimentaire (**Aljohani et al., 2022**).

L'objectif principal de notre travail est la mise en évidence de la production de métabolites antimicrobiens de type halocines, à partir des cultures de souches halophiles extrêmes.

Le présent mémoire s'articule sur deux parties, la synthèse bibliographique qui comporte un premier chapitre sur les halophiles extrêmes et le second sur les bactériocines. Dans la partie expérimentale, nous avons d'abord tenté de déterminer la présence de substances antimicrobiennes dans le surnageant de culture, ensuite de procéder à leur extraction. Plusieurs méthodes ont été utilisées pour une extraction simple et facile, par la suite les molécules actives récupérées sont testées pour leur stabilité à la haute température

Chapitre 1. Halophiles extrêmes

Chapitre 1. Halophiles extrêmes

1.1. Les procaryotes halophiles

Les organismes qui vivent dans des écosystèmes hyper salins se caractérisent par leur tolérance et leurs exigences élevées en sel, ils sont généralement appelés «halotolérants ou halophiles ». Les définitions les plus utilisées distinguent ces différentes catégories :

-Halophiles extrêmes : présentent une croissance optimale dans des milieux contenant 2,5 à 5,2 M en sel.

-Halophiles extrêmes limités : se développent mieux dans des milieux contenant 1,5 à 4,0 M en sel.

-Halophiles modérés : prospèrent mieux dans des milieux contenant 0,5 à 2,5 M en sel.

-Microorganismes halotolérants : le sel n'est pas indispensable pour leur croissance, mais ils peuvent se développer même en présence de concentrations très élevées en sel (considérés comme extrêmement halotolérants si la plage de croissance s'étend au-delà de 2,5 M en sel).

Les halophiles sont un groupe d'organismes microscopiques qui peuvent croître et se développer dans les zones à forte concentration en sel (NaCl). Ils sont généralement classés comme légères, modérés ou extrêmes selon l'étendue de leur halotolérance dans les trois domaines du vivant : *Archaea*, *Bacteria* et *Eukarya*. Dans le règne des procaryotes, les halophiles forment divers groupes métaboliques constitués de phototrophes oxygéniques et anoxygéniques ; hétérotrophes aérobies et fermentaires, dénitrifiants, sulfato-réducteurs, et les méthanogènes Les extrémophiles sont des micro-organismes qui nécessitent un environnement extrême pour croissance (**Torregrosa-Crespo et al., 2017**).

Le terme « extrémophile » a été introduit par Mac Elroy en 1974 (**Yadav et al., 2015**).

«Extrême » est un terme relatif faisant référence à la capacité de certains organismes non seulement à endurer mais aussi à se développer activement dans des conditions qui seraient mortelles ou trop dures pour l'existence humaine (**Atanasova N et al., 2021**).

-Les archées halophiles (*Haloarchaea*) : sont pour la plupart aérobies, bien que certaines espèces puissent se développer de manière anaérobie en utilisant le nitrate comme accepteur final d'électrons (dénitrification). La plupart des espèces sont généralement pigmentées en rouge (**Torregrosa-Crespo et al., 2017**).

1.2. Les archées

Les archées sont des micro-organismes dotés d'une grande capacité à coloniser certains environnements les plus inhospitaliers dans la nature, parvenant à survivre dans des endroits aux conditions extrêmes. Leurs protéines et enzymes sont stables et peuvent agir dans des conditions

extrêmes dans lesquelles d'autres protéines et enzymes se dégraderaient. Ces propriétés en font des candidats idéaux pour une utilisation dans un large éventail d'applications biotechnologies (Aparici et al., 2023).

Les archées sont bien connues pour leurs nombreuses lignées extrémophiles et polyextrémophiles, principalement (hyper) thermophiles et/ou halophiles, et ainsi que l'importance écologique des espèces méthanogènes et oxydantes de l'ammoniac (Saavedra-Bouza et al., 2023).

1.3. Caractéristiques différentielles entre les trois domaines du vivant

Les archées partagent certaines caractéristiques avec les bactéries et d'autres avec les eucaryotes (Tableau I).

Tableau I. Comparaison entre les trois domaines du vivant (Elie, 2022)

Caractéristiques	Bactéries	Archées	Eucaryotes
Taille	1 à 5 µm	1 à 5 µm	> 5 µm jusqu'à 500 µm
ADN	ADN nu dans un chromosome unique et circulaire Gènes en continu ADN circulaire absence de noyau réplication, transcription, traduction de l'ADN directement dans le cytoplasme	Gènes en mosaïque ADN circulaire absence de réplication, : noyau transcription, traduction de l'ADN directement dans le cytoplasme	génomique : 3 types de génomes nucléaire (matériel génétique de l'individu codé dans son ADN), répartis sur plusieurs ADN linéaires organisés en chromosomes différenciés. L'ADN possède aussi des séquences non codantes (introns). Génomes non nucléaires : dans les mitochondries et chloroplastes, souvent circulaires, sans introns
Gènes codant	Très différents de ceux des Archées et Eucaryotes	Similaires	
Gènes du Métabolisme	Similaires		Très différents de ceux des procaryotes
Enveloppe du noyau	Sans		Enveloppe nucléaire en double membrane
Organites	Sans		Oui : réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, plastes divers, mitochondries, lysosomes, etc.
Reproduction	Division en deux		Mitose, méiose, fécondation

Ribosomes (système de synthèse des protéines)	Type 70S libres	Type 70S libres (certains similaires à ceux d'Eucaryotes)	Dans le cytoplasme : type 80S, dans les mitochondries : type 70S
Paroi cellulaire	Complexe avec peptidoglycane	Complexe sans Peptidoglycane	Simple sans peptidoglycane
Différenciation	Rudimentaire		Tissus et organes
Structure des lipides de membrane	Phospholipides avec liaisons type ester (linéaires), glycolipides chez les cyanobactéries	Phospholipides avec liaisons type éther (ramifiées)	Phospholipides avec liaisons type ester (linéaires), glycolipides
ARN polymérase	1 seul type	Plusieurs types	
Lysosomes	Sans		Oui (sauf érythrocytes)
Premier acide aminé dans la synthèse des protéines	Formyl-méthionine	Méthionine	
Histones associés à l'ADN	Non	Oui	
Moyens de Déplacement	Flagelle simple, ou Glissement	Flagelle simple	Flagelle complexe, cils ; pattes, ailes, nageoires (chez animaux, plantes)
Possibilité de croissance aux hautes températures (> 100°C)	Non	Oui pour espèces Hyper thermophiles	Oui
Réactions aux Antibiotiques	Arrêt de la croissance	Pas d'action	

1.4. Les *Haloarchaea*

Les *Haloarchaea* sont des micro-organismes halophiles extrêmes appartenant au domaine *Archaea*, phylum *Euryarchaeota*. Ils sont (majoritairement) aérobies, généralement pigmentés en rouge et constituent les communautés microbiennes prédominantes dans les environnements halophiles extrêmes. *Haloarchaea* nécessite au moins 1,5 M en NaCl, mais la plupart des espèces se développent mieux de 3,5 à 4,5 M en NaCl. Elles ont été isolées à partir de différents habitats alcalins et salés des lacs, des marines et des sols salins. Les haloarchées sont souvent considérées comme une source fiable pour l'obtention de nouvelles enzymes, de nouveaux gènes, des composés bioactifs et d'autres molécules d'importance industrielle. Les antibiotiques protéiques peuvent être utilisés en tant

qu'agents conservateurs dans l'industrie alimentaire, l'industrie du cuir et dans la lutte contre des bactéries infectieuses (Karthikeyan et al., 2013 ; Lizama et al., 2021).

Haloarchaea forme une seule classe ; *Halobacteria*, 3 ordres, *Natrialbaes* ; *Halobacteriales* ; *Haloferacales* et 5 familles (Figure 1).

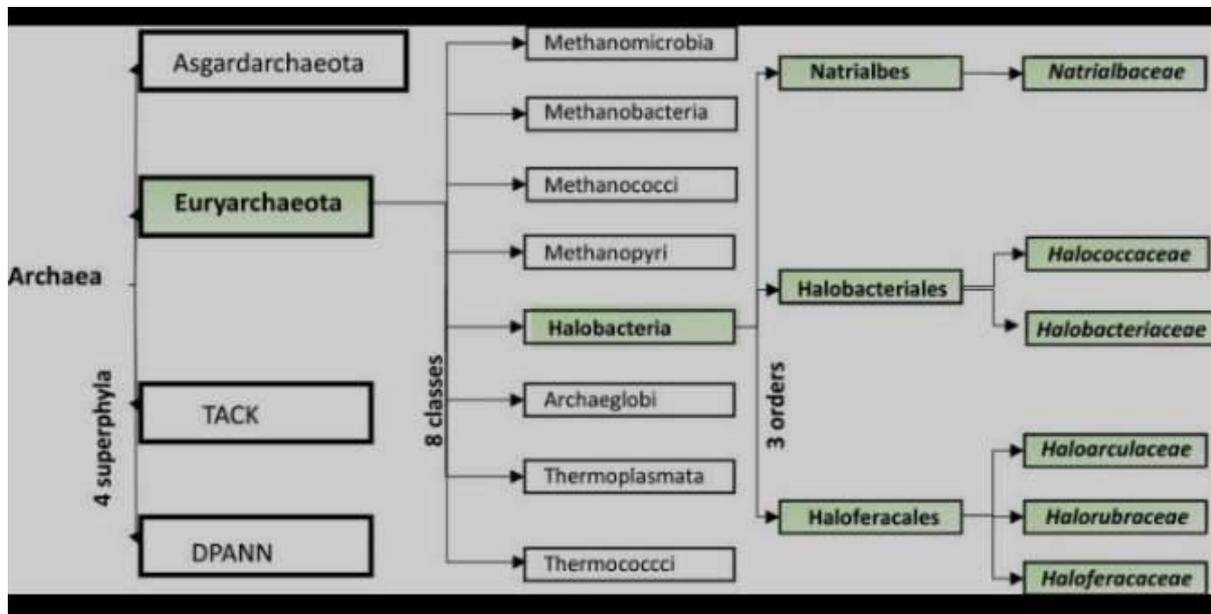


Figure 1. Résumé de la classification actuelle du domaine des archées. La couleur verte met en évidence les groupes des halophiles extrêmes (Martínez Martínez et al., 2022).

TACK : est un groupe d'archées : *Thaumarchaeota*, *Aigarchaeota*, *Thermoproteota* et *Korarchaeota*, les premiers groupes découverts.

DPANN : est acronyme un super phylum nanoarchées ou archées ultra-petites en raison de leur taille plus petite (nanométrique) par rapport aux autres archées).

La phylogénie des *Haloarchaea* (classe, ordre, famille, genre et espèce) est donnée en **annexe III**.

1.5. Principales caractéristiques des halophiles

1.5.1. Enzymes

Les enzymes sont des catalyseurs qui ont une application potentielle dans alimentaire, la formulation de détergentes, récupération des métaux, la transformation du cuir et dans plusieurs autres secteurs d'activité. Les enzymes extrêmophiles, en particulier extracellulaires, se sont avérés plus intéressantes pour des applications industrielles, car elles peuvent survivre et catalyser des réactions dans des environnements inhabituels (Yadav et al., 2015).

De plus, ils présentent une capacité particulière à tolérer des températures élevées tout en restant stables à des pH et des concentrations en sel et pH élevés (Gunjal et Badodekar, 2021).

1.5.1.1. Protéases

En général, les protéases haloarchéennes présentent une activité optimale à une concentration élevée en sel, bien que certaines d'entre elles puissent être stables et actives à des concentrations plus faibles. Les enzymes protéolytiques sont utilisées dans les domaines, pharmaceutique, alimentaire, des détergents, du cuir, de la soie et des produits agrochimiques. En termes de production, les protéases représentent le cœur du marché mondial des enzymes (Torregrosa-Crespo et al., 2017).

Les protéases halophiles sont les plus largement utilisées. Parmi ces enzymes, la protéase de *Hfx. lucentensis* VKMM 007 est non seulement stable dans différents solvants polaires et non polaires (polyéthylène glycol, éthanol, butanol, acétone, DMSO et xylène) en conservant plus de 50 % de son activité d'origine, mais son activité a également été augmentée en présence de 25 % d'éthanol. De plus, les solvants hexane et toluène ont montré un effet stimulant sur l'activité de la protéase purifiée de *Halobacterium sp.* Et l'éthanol n'a montré aucun effet inhibiteur (Amoozegar et al., 2017).

1.5.1.2. Lipases et estérase

Les estérases et les lipases hydrolysent les liaisons ester entre un résidu d'acide gras et un conjugué estérifié, tel qu'un glycérol ou un phosphate. Les lipases hydrolysent préférentiellement les triglycérides d'acides gras à longue chaîne en acides gras et en glycérol, alors que les estérase hydrolysent généralement les esters solubles dans l'eau, y compris les triglycérides avec des acides gras à chaîne courte (Amoozegar et al., 2017 ; Torregrosa-Crespo et al., 2017).

Les lipases et les estérases sont parmi les biocatalyseurs les plus importants pour les applications biotechnologiques. Une étude sur les lipases et estérase isolées de cinq souches d'archées halophiles provenant de différents environnements hypersalins en Turquie a montré que les activités les plus importantes sont obtenues à pH 8–8,5, entre 60–65 °C et à 3–4,5 M en NaCl pour estérase et à pH 8, 45–65 °C et 3,5–4 M en NaCl pour la lipase (Amoozegar et al., 2017).

Les deux enzymes ont des applications dans la modification même à ces taux en NaCl, la formulation de détergents, les industries cosmétiques, pharmaceutiques, du cuir, du textile, du papier, la production de biodiesel et de biopolymères ou le prétraitement des eaux usées riches en lipides. Ces applications nécessitent souvent des conditions réactionnelles agressives (Torregrosa-Crespo et al., 2017).

1.5.1.3. Alpha-amylase

Les amylases sont un groupe d'enzymes qui dégradent l'amidon en oses simples. Ces protéines sont produites par une grande variété d'organismes et sont censées être des plus précieuses enzymes industrielles. Cependant, les conditions extrêmes requises pour de nombreuses opérations industrielles limitent l'applicabilité de la plupart des amylases trouvées dans la nature. Les archées halophiles impliquent une excellente source de nouvelles protéines qui tolèrent des conditions difficiles, car elles vivent dans des environnements avec des concentrations en sel et températures élevées (**Gómez-Villegas et al., 2021**).

Les amylases sont utilisées industriellement dans la première étape de production de sirop de maïs riche en fructose (hydrolyse de l'amidon de maïs). Elles sont également utilisées dans l'industrie du textile dans le processus de désencollage, e sont également ajoutées aux détergents à lessive. Les amylases ont été caractérisées à partir de nombreuses souches halophiles, notamment halophiles modérées tels que *Halomonas meridiana* et les espèces halophiles extrêmes *Haloarcula hispanica* et *Natronococcus amylolyticus* (**Dassarma et al., 2010**).

1.5.2. Pigments

Les milieux hypersalins sont caractérisés par une coloration rouge orangée, due à la présence de micro-organismes pigmentés, dont *Dunaliella*, riche en B-carotène, *Haloarchaea* producteurs de bactériorubérine, et les bactéries halophiles, comme *Salinibacter ruber* produisant un caroténoïde appelé salinixanthine (**Yadav et Singh, 2015**).

1.5.2.1. Caroténoïdes

Plus de 750 caroténoïdes d'importance commerciale potentielle ont été isolés de source microbienne, en particulier *d'Haloarchaea* qui représentent un grand réservoir de caroténoïdes de type bactériorubérine. Ces derniers sont particulièrement intéressants pour leur facilité d'extraction, leur tolérance au sel et leur application biologique contre les maladies infectieuses, les tumeurs ou le développement du cancer (**Moopantakath et al., 2021**).

1.5.2.2. Bactériorubérine

La bactériorubérine joue un rôle biologique important en tant qu'antioxydant qui protège les cellules contre les dommages oxydatifs. Cette activité antioxydante est liée au nombre de paires de doubles liaisons conjugués, la longueur de la chaîne carbonée et la concentration de la bactériorubérine. Elle

protège vis-à-vis de la lumière intense, l'irradiation gamma et également contre les dommages de l'ADN résultants de la radiographie, irradiation UV.

La bactériorubérine augmente la rigidité membranaire en agissant comme un « rivet » dans les cellules membranaires. Elle diminue également la perméabilité à l'eau en agissant comme une barrière et permet ainsi le passage de l'oxygène et autres molécules, ce qui rend les souches capables de survivre à faible température ou conditions hypersalins. L'autre rôle biologique de la bactériorubérine est de faire partie des bactériorhodopsine. Des études par cristallographie ont démontré que la bactériorubérine fournit un soutien structurel à l'archaerhodopsine qui est un complexe protéine-caroténoïde rétinien présent dans la membrane pourpre de *Halorubrum sp.* (Giani et al., 2019).

1.5.3. Adaptation macromoléculaire des microorganismes halophiles extrêmes

Au niveau des protéines, l'adaptation moléculaire des organismes halophiles est liée à la composition spécifique du protéome, caractérisée par une faible hydrophobicité ; surreprésentation des résidus acides, en particulier l'aspartate ; une utilisation importante de valine et thréonine contrairement à la cystéine. Au niveau de l'adaptation de l'ADN, l'abondance des dinucléotides GA, AC et GT peut être partiellement couplée aux besoins spécifiques en acides aminés, tandis que l'abondance des dinucléotides CG peut être une signature halophile supplémentaire de stabilité de l'ADN à haute concentration en sel (Paul et al., 2008).

1.6. Stratégies adaptation en milieu salé

Les micro-organismes qui s'adaptent aux environnements modérés et riches en sel utilisent une variété de solutés, organiques et inorganiques, pour contrer la pression osmotique externe. Les solutés organiques peuvent être zwitterioniques, non chargés, ou anioniques.

La grande variété des micro-organismes halophiles induit une diversité considérable de mécanismes par lesquels les micro-organismes halophiles et halotolérants peuvent contrebalancer la grande pression osmotique générée par le milieu salin (Roberts, 2005 ; Thakur et al., 2022).

1.6.1. Stratégie « Salt-in »

La première stratégie, dite "Salt-in", est basée sur l'accumulation intracellulaire de concentrations molaires de potassium et de chlorure, qui nécessite une adaptation de la machinerie enzymatique à des concentrations salines élevées. Les protéines cytoplasmiques nécessitent une forte concentration de sel pour qu'elles soient actives et stables. Pour atteindre cet objectif, ces micro-organismes ont un protéome acide, qui est un système qui nécessite relativement peu d'énergie. Cette stratégie est utilisée par un nombre limité d'halophiles, les archées de la classe *Halobacteria* étant les représentants

principaux, qui accumulent du KCl à des concentrations égales ou supérieures aux concentrations de NaCl du milieu extracellulaire. Dans le domaine des bactéries, le seul ordre dans lequel cette stratégie a été caractérisée est *Halanaerobiales*, dans lequel on trouve des bactéries anaérobies fermentatives ou homoacétogènes.

Le protéome des archées halophiles est très acide, les protéines ont une faible teneur de résidus hydrophobes en surface tels que la lysine, alors qu'ils ont une forte teneur en résidus chargés négativement tels que l'aspartate. L'intérieur des protéines est riche en valine et pauvres en isoleucine. L'utilisation des résidus négatifs en surface permet une meilleure organisation de l'eau à la surface des protéines et peut ainsi empêcher leurs agrégations (**MartínezMartínez et al., 2022 ; Thakur et al., 2022**).

1.6.2 Stratégie « Osmolytes organiques »

Une autre stratégie est connue sous le nom de mécanisme "osmolytes organiques", stratégie "low-salt", "salt-out" ou "soluté compatible». Plutôt que d'accumuler des sels inorganiques, les micro-organismes utilisent des solutés organiques pour maintenir l'équilibre osmotique à l'intérieur de la cellule. Les solutés compatibles comprennent les polyols, les sucres, le glycérol, l'écytoïne, qui n'interfèrent pas avec l'activité des enzymes.

Les osmolytes organiques pourraient également être divisés en trois catégories chimiques : les solutés zwitterioniques (bétaine, ectoïne), les solutés non chargés (saccharose, tréhalose) et les solutés anioniques (ex β -glutamate, hydroxybutyrate) (**Slizewska et al., 2022**).

Les osmolytes protègent les protéines halophiles de leur dégradation dans un solvant tel que l'eau, de plus, ils leur permettent de s'adapter aux variations extrêmes des conditions salines. Ces osmolytes sont sans charges positives ou négatives, et sont solubles dans l'eau (**Gunjal et Badodekar, 2021**).

Chapitre 2 Les halocènes

Chapitre 2. Les halocines

2. Halocines

La première découverte de bactériocines dans le domaine *Archaea* a été confirmée chez *Haloarchaea*, d'où l'appellation : halocines. Ce sont des peptides ou des protéines antibiotiques sécrétés dans l'environnement pour tuer ou inhiber les souches haloarchées sensibles qui occupent la même niche. La production d'halocines est une caractéristique universelle des halobactéries et bien qu'il semble que des centaines de différents types existent, seules quelques halocines ont été étudiées en détail (Karthikeyan et al. 2013).

2.1. Classification

Les halocines peuvent être divisées en deux groupes, halocines de masses moléculaires élevées et des peptides de faible masse moléculaire (microhalocines). Elles varient en fonction de leurs masses moléculaires, leurs propriétés principales, essentiellement leur thermostabilité, et la concentration en NaCl nécessaire pour rester actives (Quadri et al., 2016).

Tableau. II. Peptides/protéines antimicrobiens, Archaeocines produites par *Archaea* (Kumar et al., 2021)

Archeocines			
Caractérisation	Halocines (AMP sécrétoire) Produit à partir de membres de l'ordre <i>Halobacteriales</i> (<i>Euryarchaeota</i>)		Sulfolobocines (AMP associés à la membrane) • Produit à partir de membres de l'ordre des Sulfolobales (<i>Crenarchaeota</i>) qui sont hyper thermophiles. • Exemple : SulAB (environ 40 kDa) constitués d'au moins deux sous unités (SulA et SulB) avec des interactions très fortes.
	Microhalocines < 10 kda	Halocines > 10 k Da	
	• Nature plus hydrophobe et robuste.	Nature thermolabile et	

	<ul style="list-style-type: none"> • Insensibles aux solvants, à la chaleur. Ils peuvent être stockés à 4° sans perte • Ressemblent aux microcines comme aux colicines des entérobactéries. Exemple : halocines S8, C8, R1, A4 	plus sensibles au dessalage. Exemple : Halocines H1, H4 et H6/H7.	
--	---	---	--

2.2. Production d'Halocines

Les gènes d'halocines sont exprimés au cours de la transition entre phases de croissance exponentielle et stationnaire, à l'exception de halocine H1, qui est produite au cours de la phase de croissance exponentielle. Actuellement, seules neuf halocines sont identifiées, et partiellement caractérisées à partir de différentes archées halophiles, bien que des études aient suggéré que la production d'halocines est une caractéristique universelle de tous les membres des archées halophiles (**Ghanmi et al. 2020**).

La production d'halocines commence généralement au début de la phase de croissance exponentielle et atteint le niveau optimal lors de la transition de la phase exponentielle à la phase stationnaire. Pendant l'arrêt de la phase de croissance, le niveau d'activité d'halocines varie selon les membres d'Haloarchaea et il peut rester constant (H1, S8 et C8) ou décliner (H4, H6, KPS1, HA1, HA3 et H17). La diminution de l'activité de l'halocines peut provenir de la libération d'enzymes protéolytiques des cellules lysées à la fin de la phase stationnaire (**Kumar et al., 2021**).

2.3. Mécanisme d'action des halocines

Les halocines inhibent généralement (cytostatique) ou tuent (cytocide) les souches apparentées, mais peu sont signalés comme étant actives sur des espèces de différents embranchements ou domaines.

Les cellules traitées à l'halocines peuvent subir des changements dans le pH interne, le flux Na⁺/H⁺, le potentiel membranaire, la force proton motrice (FPM), due à la déformation de la membrane cellulaire ou à l'inhibition de l'antiport Na⁺/H⁺. Ces modifications sont responsables de la perturbation de la membrane entraînant la mort cellulaire (**Kumar et al., 2021**).

Certaines halocines sont dites dépendantes du sel puisque la protéine perd son activité lorsque la concentration en sels diminue au-delà d'un niveau minimum (**Karthikeyan et al., 2013**).

2.4. Différentes halocines et leurs caractéristiques

Les microhalocines (< 10kDa) décrites à ce jour sont généralement plus hydrophobe et peuvent tolérer de faibles concentrations de sel, le chauffage et stockage à long terme, tandis que les halocines (> 10 kDa) sont généralement plus sensibles et perdent leur activité sous le stress environnemental (**Kumar et Kumar Tiwari, 2019**).

Tableau .III. Propriétés biochimiques des halocines produites par différentes souches d'Haloarchaea (**Kumar et kumar Tiwari, 2019**).

Halocines	Source	Propriétés
		(thermostabilité, masse moléculaire, dépendance au sel : gamme d'hôtes : sensibilité aux protéases mode d'action)
A4	Saline Solaire Tunisie	7435 Da : >100°C : non, large, ND, ND
C8	Grand lac salé Chaidan, chine	6,3kDa : >100°C : non ; large proteinase K : ND
RI	Saline solaire Mexique	3,8 kDa : <93°C. Bo large : protéinase K : ND
S8	Grand Lac Salé, Utah, Etats-Unis	: 3,58 kDa > 100c non
		Protéinase K large : ND
SH10	<i>Natrinema sp.</i> BTSH10	20kDa ; <50°C ; ND ; ND ; ND ; ND
HAI	<i>Haloferax larsenii</i> HAI	14 kDa, >100°C ; oui ; étroit ; protéinase k : perméable des membranes
HA3	<i>Haloferax larsenii</i> NCIM5678(HA3)	13 KDa,>100°C ; oui ; étroit ; perméable de la membrane a la protéinase K

ND : non déterminant

Chapitre 3
Matériel et méthode

Chapitre 3 : Matériel et méthode

Le présent travail a été réalisé au niveau du laboratoire IDRES, c'est un laboratoire d'analyses et contrôle de la qualité des produits alimentaires et cosmétiques à Bejaïa.

Ce travail vise essentiellement la mise en évidence la production d'halocines par des microorganismes souches bactériennes extrêmement halophiles isolées à partir des milieux hypersalins pour faire une étude approfondie pour obtenir des nouveaux résultats ; qui donne une valeur pour la recherche.

Pour réaliser ce travail-là, nous avons ce plan de travail scientifique.

3.1 Matériel

3.1.1. Matériel biologique

Les souches utilisées dans cette étude sont des souches halophiles extrêmes dont certaines sont des « *Halorchaea* », isolées de différents environnements hypersalins (**Idres-Imadalou, 2018**) (**Tableau IV**).

Ces souches sont caractérisées par leurs activités antimicrobiennes intéressantes.

Tableau .IV. Origine et caractéristiques des souches utilisées.

Souches	Source	Conditions D'isolement	Année d'isolement	Genre affilié « gène ARNr 16 S »
A3	Saline de Batna	T 40° C pH 7 NaCl : 25%	2018	-
B1	Saline de Batna	T 40° C pH 7 NaCl : 25%	2018	-
D1	Saline de Batna	T 40° C pH 7 NaCl : 25%	2018	-
F14	Sol Sebkhia D'Ouargla	T : 40 °C pH 7 NaCl : 25%	2010	<i>Haloarcula</i>
F2	Saline d'Ichekaben	T 30 °C pH 7 NaCl : 25%	2003	-
F4	Saline de Batna	T 40° C pH 7 NaCl : 25%	2010	-

F5	Saline d'oran	T 40°C pH 7 NaCl : 25%	2010	<i>Haloarcula</i>
F6	Saline d'Oran	T 40° C pH 7 NaCl : 25%	2010	<i>Haloarcula.</i>
F7	Saline de Batna	T 40° C pH 7 NaCl : 25%	2010	-
F8	Sebkha D'Ouargla	T 43° C pH 7 NaCl : 25%	1999	<i>Halorubrum</i>
F9	Sebkha D'Ouargla	T 40° C pH 7 NaCl : 25%	1999	<i>Haloarcula</i>

- : non indiqué

3.1.2. Germes cibles

Pour mettre en évidence les activités antimicrobiennes, les souches productrices des substances bioactives sont testées sur «*Hobacterium salinarum* DSMZ3754 » (MNHN, France), comme souche cible. Cette souche est utilisée pour sa grande sensibilité à la plupart des halocines et d'autre part pour déterminer des activités intra-spécifique (entre *Haloarchaea*).

Pour étudier le spectre d'activité, nous avons utilisé des bactéries à Gram positif «*Staphylococcus aureus*» (N°ATCC/6538) et à Gram négatif «*Escherichia coli*» (N°ATCC : 8739) et «*Pseudomonas aeruginosa*» (N°ATCC : 9027). Elles nous ont été fournies par le laboratoire « LABO-IDRES », laboratoire d'analyses et contrôle de la qualité des produits alimentaires et cosmétiques à Bejaia.

3.1.3. Surnageants et Cultures

Pour l'étude des bactériocines de microorganismes halophiles extrêmes, nous avons utilisé des surnageants et des cultures sur milieux synthétique à base de glucose ou complexe tel que DMSZ 372 (spécifiques pour la culture des souches Haloarchaea) (Atlas, 2010) réalisés en avril 2023.

3.1.4. Appareillage et réactifs

Les réactifs et l'appareillage utilisés sont mentionnés en **annexe II**.

3.1.5. Milieux de culture

Les archées halophiles sont des microorganismes qui doivent être cultivées dans des milieux respectant les concentrations molaires en sels.

Nous avons utilisé les différents milieux de culture soit liquide, solide ou semi solide pour la croissance des souches productrices des substances bioactives, les souches cibles et pour la mise en évidence de l'activité enzymatique.

La composition de ces milieux est donnée dans **l'annexe I**.

Pour les souches non halophiles, nous avons utilisé l'eau peptonée et le milieu Muller Hinton pour tester l'activité des halocines.

3.2. Méthodes

3.2.1. Centrifugation des cultures halophiles extrêmes

Nous avons centrifugé les cultures à 6000 rpm pendant 25 minutes et les surnageants sont conservés à une température de 4°C jusqu'à l'analyse

3.2.2. Préparation du germe cible

3.2.2.1. Préparation de l'inoculum

La souche d'haloarché de référence est d'abord repiquée sur de milieu solide milieu complexe (MC) puis incubée à 44°C jusqu'à apparition de colonies roses.

Une colonie a été transférée dans un tube contenant 3ml de milieu complexe (DMS372) et incubée à 44 °C pendant 24 à 48 h. Deux à trois repiquages successifs ont été réalisés.

Pour les souches bactériennes de références «*Hobacterium salinarum* DSMZ3754 », à partir de boîtes fraîchement repiquées sur milieu solide approprié, une colonie est inoculée dans l'eau peptonée 4.5 ml puis incubées à 37°C pendant 17h.

3.2.2.2. Culture en Erlenmeyer

Des Erlenmeyer de 100 ml contenant 20 ml de milieu MC ou eau peptonée ont été inoculés à 100 µl (v/v) de la préculture (inoculum). Ils sont Incubés à 44°C pendant cinq jours, et 17h à 37°C pour les souches bactériennes.

3.2.3. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne

100 µl de l'inoculum est mélangé à 100 ml d'une gélose Muller Hinton (MH) ou de gélose pour «*Hobacterium salinarum* DSMZ3754 », semi solide en surfusion, de sorte à avoir une DO de 0,001. Après homogénéisation, la gélose est répartie dans des boîtes de Pétri contenant une couche fine d'un milieu solide. 5 µl de surnageant, sont déposés à la surface des boîtes.

Après incubation jusqu'au développement du germe cible, l'activité antimicrobienne se manifeste par l'apparition d'une zone claire autour du dépôt.

Tableau .V. Paramètres physiques des différentes souches halophytes extrêmes.

Cultures	DO ₆₀₀	pH	T°	N° de spot
B1	2,6	6,45	40	3
F10	2,9	7,23	40	3
F14 M syth	3,7	7,62	40	3
F14 MC	2,5	7,43	40	3
F2	4,33	4,89	40	3
F4	2,6	7,4	40	3
F5	3.5	4,07	40	3
F6	2.8	4,17	40	3
F7	2,7	7,11	40	3
F8	2,7	6,65	40	3
F9	4,8	6,43	40	3

3.3. Extraction par solvants organiques

Nous avons utilisé un mélange éthanol et acétone pour chaque surnageant (V/V) selon les proportions données dans le **tableau VI**.

Tableau. VI. Volumes d'extraction des surnageants

Surnageant	Ph	Volume (ml)	Volume de solvant Acétone / Ethanol (ml)
F9	7.64	3.5	10.0
A3	7.82	4.0	10.0
B1	7.62	2.0	10.0

L'extraction est réalisée dans une ampoule à décanter ou en tube pour des petits volumes de surnageant à 37°C, suivant les étapes suivantes :

- > Mise en contact du solvant avec le surnageant ;
- > Agitation énergique pendant 15 min puis décantation ;
- > Répéter l'opération précédente 2 ou 3 fois ;
- > Observer les réactions obtenues ;
- > Récupération en séparant les éventuelles phases obtenues ;
- > Séchage.

3.4. Extraction acide à froid des protéines totales à partir des surnageants de culture

Afin d'extraire les protéines totales, des petits volumes (100 µl) d'acide phosphorique à 5 % sont ajoutés progressivement au surnageant jusqu'à obtenir un pH de 1,5 à 2.

Le mélange est ensuite mis à 4°C pendant une nuit ou plus, jusqu'à observer une précipitation intense (figure 2).

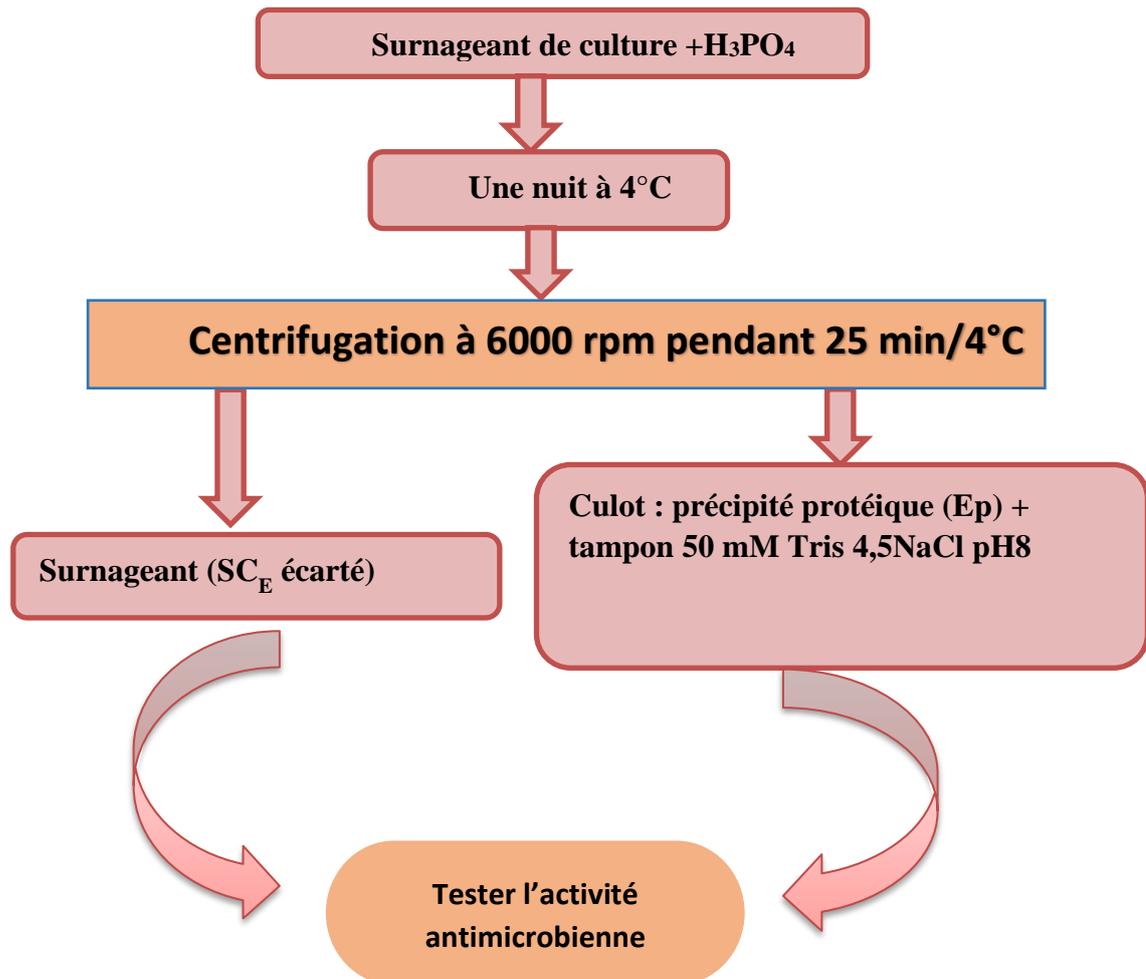


Figure 2. Protocole de l'extraction acide et à froid des protéines totales

3.5. Mise en évidence des activités enzymatiques

5 µl de surnageant, des extraits de solvants organiques ou extraits protéiques sont déposés à la surface de milieux gélosés contenant différents substrats comme seule source de carbone : amidon, carboxyméthylcellulose, gélatine, tween 20 et tween 80.

➤ **Activité cellulolytique**

Les souches haloarchées à tester sont prélevées de leur suspension puisensemencées en spot (5 ml) sur des boites de Petri contenant le milieu de croissance gélosé additionné de 1% de carboxyméthylcellulose (CMC) est utilisé pour sélectionner les souches *Haloarchaea* ayant une activité cellulolytique. Ces boites sont incubées pendant une semaine à plus à 40°C. La révélation de la dégradation se fait par ajout du réactif iodo-ioduré (Lugol). La production de cellulase est appréciée par l'apparition de zones claires autour de la colonie

➤ **Activité estirasique.**

Les souches haloarchées à tester sont prélevées de leur suspension puisensemencées en spot (5 µl) sur des boites de Petri contenant le milieu de croissance gélosé additionné de 1% de tween 20. Ces boites sont incubées pendant une semaine à plus à 40°C.

Le résultat positif se manifestera par l'apparition d'une zone de précipitation autour des colonies

➤ **Activité lipasique**

Les souches haloarchées à tester sont prélevées de leur suspension puisensemencées en spot (5 ml) sur des boites de Petri contenant le milieu de croissance gélosé additionné de 1% de tween 80. Ces boites sont incubées pendant une semaine à plus à 40°C.

Le résultat positif manifestera par l'apparition d'une zone claire autour des colonies.

➤ **Ativité protéolytique**

On prépare un milieu minimum semi solide (lait écrémé de 5% et à des concentrations des sels très petites et avec de l'agar-agar 15g/l). Après la stérilisation on coule ce milieu dans des boites de Pétri (On laisse 1 jour pour une bonne solidification des géloses). Les souches haloarchées à tester sont prélevées de leur suspension puisensemencées en spot (5 ml) sur des boites de Petri contenant le milieu de croissance gélosé . Ces boites sont incubées pendant une semaine à plus à 40°C.

Le résultat positif manifestera par l'apparition d'une zone claire autour des colonies.

➤ **Activité amylolytique**

Même protocole de la protéase a été effectué pour l'amylase, sauf ici le substrat utilisé est l'amidon. Il est additionné au milieu de culture à raison de 1%. La lecture se fait après addition du Lugol qui réagit avec l'amidon (donner une couleur bleue violet).

Par conséquent, le résultat positif se manifestera par l'apparition d'une zone claire autour des colonies.

Effet de la température sur les extraits protéiques

Les extraits protéiques des surnageants suivants F10, F14, F8, F9, D1, F2, F5, A3, B1 et F8.

F9, D1, F5, A3, B1, et F8 ont été chauffés à 100°C pendant 5 min pour éliminer les actions enzymatiques et avoir seulement les activités antimicrobiennes puis les mettre en spot sur les différents milieux de culture contiennent les substrats suivants (amidon, carboxyméthylcellulose, gélatine, tween 20 et tween 80).

Chapitre 4
Résultats et
discussion

Chapitre 4 : Résultats et discussion

4.1. Activité antimicrobienne des différents surnageants de culture

D'après le tableau on constate que la plupart des souches halophiles présentent une activité sur *Halobacterium salinarum* DSMZ3754, ceci montre que la substance active est libérée dans le milieu. Il s'agit probablement d'une archeocine puisque elle a une activité sur une autre archée, de plus elle a un large spectre d'activité puisqu'elle agit sur *E.coli*.

Tableau .VII. Activité antimicrobienne des surnageants de cultures

Cultures	DO 600	PH	Activité antibiotique (ZI : mm)	
			<i>H. salinarium</i>	<i>E. coli</i>
F7	2.7	7.11	14	0
F14 M syth	3.7	7.62	13	9
F4	2.6	7.40	14	0
B1	2.6	6.45	14	8
F14 MC	2.5	7.43	15	9
F8	2.7	6.65	16	10
F2	4.33	4.89	15	9
F9	4.8	6.43	-	0
F10	2.9	7.23	18	-

ZI : Zones d'inhibition ; - : non testé

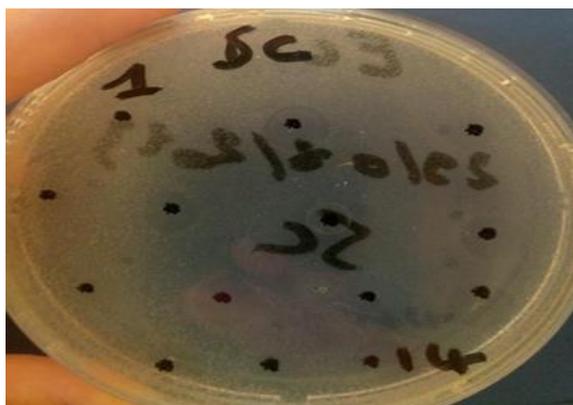


Figure 3. Activité des surnageants de culture sur *E.coli*

4.2. Activité enzymatique des surnageants de culture

Les différents surnageants de culture testés sur l'amidon, CMC ; gélatine, tween 20 et tween 80 comme seule source de carbone, révèlent la présence d'au moins une activité enzymatique (**tableau VIII, figures 4**). C'est le cas des souches F5 et F6 qui ne produisent que la cellulase, par contre la moitié des autres surnageants testés F7, F14 MC, F14 M syth, F8 et F2 présentent les 5 activités enzymatiques recherchées, les plus importantes correspondent à celles de l'amylase et la cellulase. En effet des zones de lyse de 56 et 43 mm de diamètre sont obtenues respectivement avec la cellulose et l'amidon.

Ces souches présentent un grand intérêt industriel puisqu'elles sont productrices de plusieurs substances à la fois.

Tableau .VIII. Activité enzymatique des différents surnageants de culture

Activité enzymatique sur différents substrats (ZL : mm)					
	Amidon	gélatine	Tween 20	Tween 80	CM-Cellulose
F7	26	11	16	23	56
F14 MC	43	12	18	27	50
F4	12	8	10	0	56
B1	25	0	12	16	22
F14 M syth	32	11	12	18	12
F8	30	11	15	14	15
F2	30	12	15	24	20
F9	0	12	20	0	0
F6	0	NT	0	0	40
F5	0	NT	0	0	48

NT : Non testé

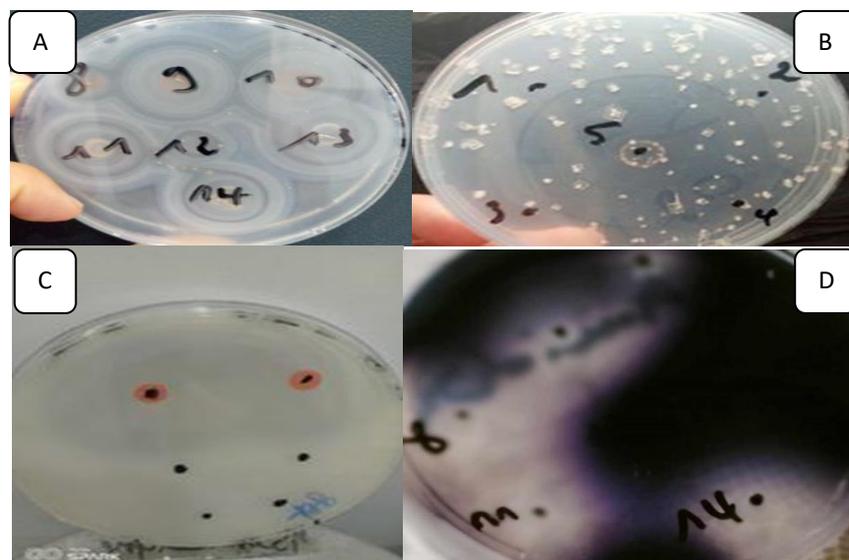


Figure 4. Activités hydrolytiques des différents surnageants, **A** : estérase ; **B** : lipase ; **C** : gélatinase et **D** : amylase.

4.3. Extraction des substances actives à partir des surnageants de cultures

4.3.1. Extraction par solvants organiques

Après avoir mélangé rigoureusement les solvants et les surnageant, on obtient avec l'éthanol un précipité blanc au fond du tube ou de l'ampoule à décanter (phase II) et une phase liquide (phase I). La précipitation est plus ou moins lente selon le surnageant. Avec l'acétone, nous avons observé l'apparition de deux phases, la phase supérieure (phase I) correspond à l'acétone et la phase inférieure (phase II) est le surnageant. Après séparation des différentes phases, elles sont mises soit sous une hotte afin de permettre l'évaporation de toute trace des solvants, ou bien séchées à 50°C dans une étuve. Les différentes phases sont reprises dans un minimum de tampon Tris/ HCl –NaCl pH 8 (**Figures 5 et 6**).



Figure 5. Extraction liquide - liquide des substances bioactives à partir des surnageants de Culture B1, A3 et F9 par l'acétone.



Figure 6. Extraction des substances bioactives à partir des surnageants de culture B1, A3 et F9 par l'éthanol.

Nous remarquons qu'en testant 5 μ l de surnageant, nous avons décelé l'activité antibiotique dans la phase I dans le cas de l'acétone et dans la phase II (le précipité) avec l'éthanol (**Tableau IX**), à ce niveau on conclut que l'acétone et l'éthanol permettent l'extraction de la substance active. En testant 50 μ l de surnageant, on se rend compte que l'acétone extrait en partie seulement la substance active, puisque on retrouve la substance antimicrobienne aussi bien dans le solvant que dans le surnageant contrairement à l'éthanol qui extrait apparemment la totalité de la substance. L'acétone est couramment utilisé dans l'extraction des halocines (**Shand, 2009 ; Mezegene et al., 2017**).

Tableau .IX. Activités antimicrobienne dans les extraits aux solvants organiques

		Activité antibiotique (ZI : mm)			
Cultures	Souche Cible	Acétone		Ethanol	
		Phase I	Phase II	Phase I	Phase II
A3	<i>S. aureus</i> 5µl	14	0	0	13
B1		12	0	0	12
F9		15	0	0	11
A3	<i>S. aureus</i> 50µl	15	22	0	20
B1		25	16	0	23
F9		25	20	0	20

Z.I. : Zones d'inhibition ; **Z.L.** : zones de lyse

Nous avons également recherché l'activité enzymatique dans ces extraits (**tableau x**), seule une partie de l'activité cellulosique est extraite avec de l'éthanol dans le cas de la souche B1. Pour les autres enzymes, soit elles ne sont pas extraites ou bien elles sont dénaturées par les solvants.

Tableau X. Activités enzymatique dans les extraits aux solvants organiques.

		Activité enzymatique (ZL : mm)			
Cultures	Substrat	Acétone		Ethanol	
		Phase I	Phase II	Phase I	Phase II
A3	CMC	0	0	0	0
B1	CMC	14	0	0	13
F9	CMC	0	0	0	0
A3	Tween20	0	0	0	0
B1	Tween80	0	0	0	0
F9	Amidon	0	0	0	0



Figure 7.Activité sur *S. aureus* (A) et hydrolyse de la CMC (B) dans le précipité à l'éthanol

4.3.2. Extraction acide à froid

Suite au protocole suivi pour l'extraction des protéines totales par l'acide phosphorique 5% à froid à partir des différents surnageants, nous avons obtenu une précipitation des protéines totales, ce sont des extraits protéiques « Ep ». Ces précipités sont récupérés par centrifugation puis dissous dans le tampon Tris/HCl-NaCl à pH8. Les résultats de leurs activités sur *H.salinarum* DSMZ3754 et sur des bactéries sont illustrés dans le tableau 8. La plupart des extraits renferment une activité sur *H.salinarum* DSMZ3754, quelques extraits présentent en plus une activité sur les bactéries tels que ceux des souches F8 et F10 (**Tableau XI ; figure 8**).

Aucune activité enzymatique n'a été obtenue avec l'amidon, le tween 20 et tween 80. Cependant, de faibles zones de lyse sont remarquées avec la carbométhyl-cellulose dans les extraits protéiques des souches F2 (8 à 9 mm) et F8 (7 mm). Ces activités enzymatiques extraites avec la substance antimicrobienne vont constituer un problème lors de leur purification.

Tableau .XI. Activités antimicrobienne des extraits protéiques (Ep)

Extraits protéiques des souches	pH	Volume (ml)		Activité antibiotique (ZI : mm)		
				<i>H. salinarum</i> ^a	<i>S.a</i> ^b	<i>E.coli</i> ^b
F10 M Syth	7,23	4	9	10	0	13
F10 MC	6,19	3,5	8	13	0	17
F14 M Syth	7,67	2,5	10	0	0	17
F14 MC	7,77	3,8	10	0	0	14
F8 M Syth	7,87	2	8	17	11	0
F8 MC	7,85	2	10	0	0	0
F9	7,64	3,5	6	0	0	17
D1	7,91	2,5	7	0	0	14
F2 M Syth	7,66	2,5	8	0	0	0
F2 MC	7,67	2	10	20	0	0
F6	7,85	2	8	0	0	0
F5	7,91	2	8	0	0	0
A3	7,82	2,5	8	0	0	0
B1	7,62	2	8	0	0	13

a. 5µl d'extrait testé ; **b.** 50µL d'extrait testé



Figure 8. Activité antimicrobienne des Ep sur *H.salinarum* DSMZ3754

4.4. Traitement des extraits protéiques à la chaleur

Lors du traitement à la chaleur (5 min à 100°C) afin de d'éliminer certaines protéines contaminâtes telles que les cellulase, nous avons remarqué que ces dernières n'ont pas résisté au traitement, nous avons constaté de plus que l'extrait protéique de la souche D1 contient non seulement une teneur élevée en gélatinase (32 mm de diamètre de lyse) mais le traitement à 100°C pendant 5 min n'a pas pu l'éliminer (**figure 9**).



Figure 9. Effet de chauffage à 100°C/ 5 min sur l'activité de la gélatinase dans le Ep de D1

Conclusion

Conclusion

L'objectif de notre travail était de confirmer la production de substances antimicrobienne de type efficacité est obtenue avec l'éthanol et la précipitation acide et à froid, tout en éliminant les protéines contaminâtes telles que les enzymes, moyen, qui pourrait faciliter leur exploitation en milieu industriel.

Les halophiles extrêmes sont des microorganismes ont un intérêt en bio-industrie et permis l'ouverture biotechnologie future. Ces microorganismes deviendront des hôtes très utiles pour inhumanités révéleront des applications potentielles dans les années à venir.

Références
Bibliographiques

Références Bibliographiques

Amoozegar M.A, Siroosi M, Atashgahi S, Smidt H, Ventosa A. (2017). Systematics of *Haloarchaea* and biotechnological potential of their hydrolytic enzymes. *Microbiology* 163: 523–645

DOI: 10.1099/mic.0.000463

Atanasova N, Stoitsova S, Paunova-Krasteva T, Kambourova M. (2021). Plastic Degradation by Extremophilic Bacteria. *International Journal of Molecular Sciences* 22 (11): 5610

Aljohani A.B, Al-Hejin A.M, Shori A.B. (2023). Bacteriocins as promising antimicrobial peptides, definition, classification, and their potential applications in cheeses. *Food Science and Technology* 43, e11808021

Parici-Carratala D, Esclapez J, Bautista V, Bonete M.J, Camacho M. (2023). *Archaea*: Occurrent and potential biotechnological applications. *Research in Microbiology* 174(7): 104080.A

DOI: 1016/j.resmic.2023.10408

Dortu C, Thonart P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et Intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 13(1), 143-154.

Darbandi A, Asadi A, Ari M.M, Ohadi E, Talebi M, Zadeh M.H, Emamie A.D, Ghanavati R, Kakanj M. (2021). Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 36: e 24093.

parici-Carratala D, Esclapez J, Bautista V, BoneteM.J, Camacho M. (2023). *Archaea*: Occurrent and potential biotechnological applications. *Research in Microbiology* 174(7): 104080.

DOI: 1016/j.resmic.2023.10408

Etayash H, AzmiS, Dangeti R, Kaur K. (2015). Peptide Bacteriocins – Structure Activity Relationships. *Curr Top Med Chem* 16 (2) : 220-41

DOI : 10.2174/1568026615666150812121103.

Élie F. (2022).Archéobactéries ou Archées, et les trois grands domaines du vivant.

Giani M, Garbayo I, Vilchez I, Martinez-Espinosa. (2019).*Haloarchaeal* Carotenoids: Healthy Novel Compound from Extreme Environments.Mar.Drugs 17(9): 524

Doi: 10.3390/md17090524

Gomez-Vilegas P, Vigara J,Romero L, Gotor C , Raposo S,Gonçalves , Leon R .(2021). Biochemical Characterization of the Amylase Activity from the New *Haloarchaeal* Strain *Haloarcula* sp. Hs isolated in the Odiel Marshlands. Biology (Based) 10(4): 337.

Gunjal A.B, Badodekar N.P. (2021).Halophiles. IGI Global. Copying or distributing in print or electronic forms without written permission of IGI global is prohibited

Doi : 10.4018/978-1-7998-9144-4.ch002

Guillermo Martínez Martínez, Carmen Pire, Rosa Maria Martínez-Espinosa. (2022). Hypersaline environments as natural sources of microbes with potential applications in biotechnology: The case of solar evaporation systems to produce salt in Alicante County (Spain).Current Research in Microbial Sciences 3. 2022. 100136.Journal homepage.

Heilbronner, Krismer, Brotz-Oesterhelt, Peschel. (2021).The microbiome-shaping roles of bacteriocins. Nature Reviews Microbiology: 19 (11)726-739.

Doi: 10.1038/s41579-021-00569-w

Idres-Imadalou N. (2018) .Theses de doctorat en Microbiologie. Université de Bejaia.

Javier Torregrosa-Crespo, Carmen Pire Galiana, Martínez-Espinosa R.M. (2017). Biocompounds from *Haloarchaea* and Their Uses in Biotechnology.LicenseeInTech.

Moopantakath J, Imchen M, Anju V.T, Busi S, Dyavaiah M, Martínez-Espinosa R.M, Kumavath R .(2023). Bioactive molecules from *Haloarchaea* : Scope and prospects for industrial and therapeutic applications. Frontiers in Microbiology.

DOI 10.3389/fmicb.2023.1113540

KarthikeyanP, Bhat S.G, Chandrasekaran M. (2013). Halocin SH10 production by an extreme haloarchaeon

Natrinema sp. BTSH10 isolated from salt pans of South India. Saudi Journal of Biological Sciences. 2013. 20, 205–212.

Kumar V, Tiwari S .K. (2019). Halocin Diversity Among Halophilic Archaea and Their Applications. Chapitre d'un livre pp 497-532

bioproduction . Journal of Microbiological Methods 166,105704.

Lizama C , Romero-Parra J , Andrade D , Riveros F , Bórquez J , M.J Ahmed , Venegas-Salas L , Cabalín C .(2021). Analysis of Carotenoids in Haloarchaea Species from Atacama Saline Lakes by High Resolution UHPLC-Q-Orbitrap-Mass Spectrometry : Antioxidant Potential and Biological Effect on Cell Viability. Antioxidants (Bsed), 10(8),1230.

Martinez,Pire, Martinez-espinoza. (2022). Hypersaline environments as natural sources of microbes with potential application in biotechnology: The case of solar evaporation systems to produce salt in Alicante County (Spain). Current Research in Microbial in Microbial Science 3 (2022) 100136.

Roberts M.F. (2005). Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. System Salin1: 5

DOI: 10.1186/1746-1448-1-5

Paul, Bag, Das, Harvill, Dutta. (2008). Molecular signature of hypersaline adaptation: insights from genome and proteome composition of halophilic prokaryotes. Genome Biology 9 (4): R70.

DOI: 10.1186/gb-2008-9-4-r70

Patricia Gómez-Villegas, Javier Vigara, Luis Romero, Cecilia Gotor, Sara Raposo, Brígida Gonçalves , Rosa León .(2021). Biochemical Characterization of the Amylase Activity from the New Haloarchaeal Strain *Haloarcula sp.* HS Isolated. In the Odiel Marshlands. Biology 2021, 10, 337.

Quadri I, Hassani I.I, Haridon S, Chalopin M, Hacène H. (2016). Characterization and antimicrobial potential of extremely halophilic *Archaea* isolated from hyper saline environments of the Algerian Sahara. Microbiological Research 186–187: 119–131.

DOI: 10.1016/j.micres.2016.04.003.

Saavedra-Bouza, Rodríguez, Escuder Castro, Becerra, González-Siso. (2023). Xylanases from thermophilic *Archaea*: A hidden treasure. *Current Research in Biotechnology* 5: 100116

Heilbronner S, Krismer B, Brötz-Oesterhelt H, Peschel A. (2021). The microbiome-shaping roles of bacteriocins. *Nature Reviews. Microbiology*; London Vol. 19, Iss. 11, (Nov 2021): 726-739.
DOI: 10.1038/s41579-021-00569-w

Thakur N, Singh S.P, Zhang C. (2022). Microorganisms under extreme environments and their applications. *Current Research in Microbial Sciences* 3: 100141.

Torregrosa-Crespo, Galiana, Martínez-espínosa. (2017). Biocompounds from *Haloarchaea* and their uses in Biotechnology.

Kumar V, Singh B, J van Belkum M, Diep D.B, Chikindas M.L, Ermakov A.M, Kumar Tiwari S. (2021). Halocins, natural antimicrobials of *Archaea*: Exotic, special, or both? *Biotechnology Advances* 53 2021 107834.

Yadav D, Singh A, Mathur N. (2015). Halophiles-A Review. *International journal of current Microbiology and Applied Sciences* .4 (12): 616-629.

Annexes

Annexe I

Milieux de culture « milieux hypersalés utilisés pour la culture de souches halophiles extrêmes ».

Milieu liquide salin (g/l)

Agar-agar	20g/l
CaCl ₂	0.36mg/l
Casaminoacide	5g/l
Citrate tri-sodique	3g/l
Citrate tri-sodique	3g/l
Eau distillé	1000ml
Eau distillé.....	1000ml
Extrait de levure	10g/l
Extrait de viande	2.5g/l
FeCL ₂ +4 H ₂ O	0.36mg/l
FeCL ₂ +4 H ₂ O	0.36mg/l
KCl.....	2g/l
KCl.....	3g/l
Le pH ajusté à 7.2	
MgSo ₄	20g/l

Milieu solide M372 (g/l)

MnCl ₂ a remplacé par MnSo ₄	0.36mg/l
MnCl ₂	0.36 mg/l
NaCl	200g/l
NaCl	200g/l

Le pH ajusté à 7.2

Milieu semi solide modifié M372 (g/l)

Agar-agar	10g/l
CaCl ₂	1g/l
Casaminoacide	5g/l
Citrate tri-sodique	3g/l
Eau distillé.....	1000ml
FeCL ₂ +4 H ₂ O	0.36mg/l

Glutamate de sodium	1g/l
KCl.....	2g/l
MgSo4.....	20g/l
MnCl2	0.36 mg/l
NaBr.....	0.5g/l
NaCl.....	200g/l

Le pH ajusté à 7.2

Milieu pour la production modifié (g/l)

Citrate tri-sodique	5g/l
Eau distillé	1000ml
Extrait de levure.....	5g/l
FeCL2 +4 H2O	0.36mg/l
Glycérol.....	5g/l
KCl.....	2g/l
MgCl2	20g/l
MnCl2 a remplacé par MnSo4.....	0.36mg/l
NaBr.....	0.5g/l
NaCl.....	160g/l

Le pH ajusté à 7.2

CaCl2	0,2g/l
Eau distillée.....	1000ml
Extrait de levure.....	5g /l
KCl.....	5g/l
MgSO4.....	10g/l

Milieu Halobacterium (MH) (g/l)

NaCl.....	250g/l
Peptone pancréatique	3g/l

Le pH est ajusté à 7.2

> Stérilisation tous les milieux dans un autoclave à 120°C pendant 20mn.

Eau distillée	100 ml
---------------------	--------

NaCl 26,325g
Tris (50 mM , HCl-NaCl 4,5 M pH8) 6,057 g
pH 8 avec HCl pur

I. Appareillage

- * Agitateur
- * Autoclave (PBI)
- * Bain-marie
- * Balance électrique
- * Centrifugeuse à froid (6000rpm HETTICH, ZENTRIFUGEN EBA20 / 25 min)
- * Etuve à 44 C°
- * Four pasteur
- * pH mètre
- * Plaque chauffante
- * Réfrigérateur à 4 C°
- * Rotavapeur

- * Spectrophotomètre
- * Vortex

II. Verrerie et petit matériel

- * Barreaux magnétiques
- * Bec Bunzen
- * Bêchers
- * Boîtes Petri
- * Coton cardé
- * Embouts : bleu, jaune et blanc
- * Eppendorf
- * Eprouvettes graduées
- * Erlens : 100, 200, 250, 500,1000 ml
- * Fioles Jugées : 50,100, 200,500 ml
- * Flacons
- * Micropipettes 50 ,500 et 1000 µL
- * Papier absorbant

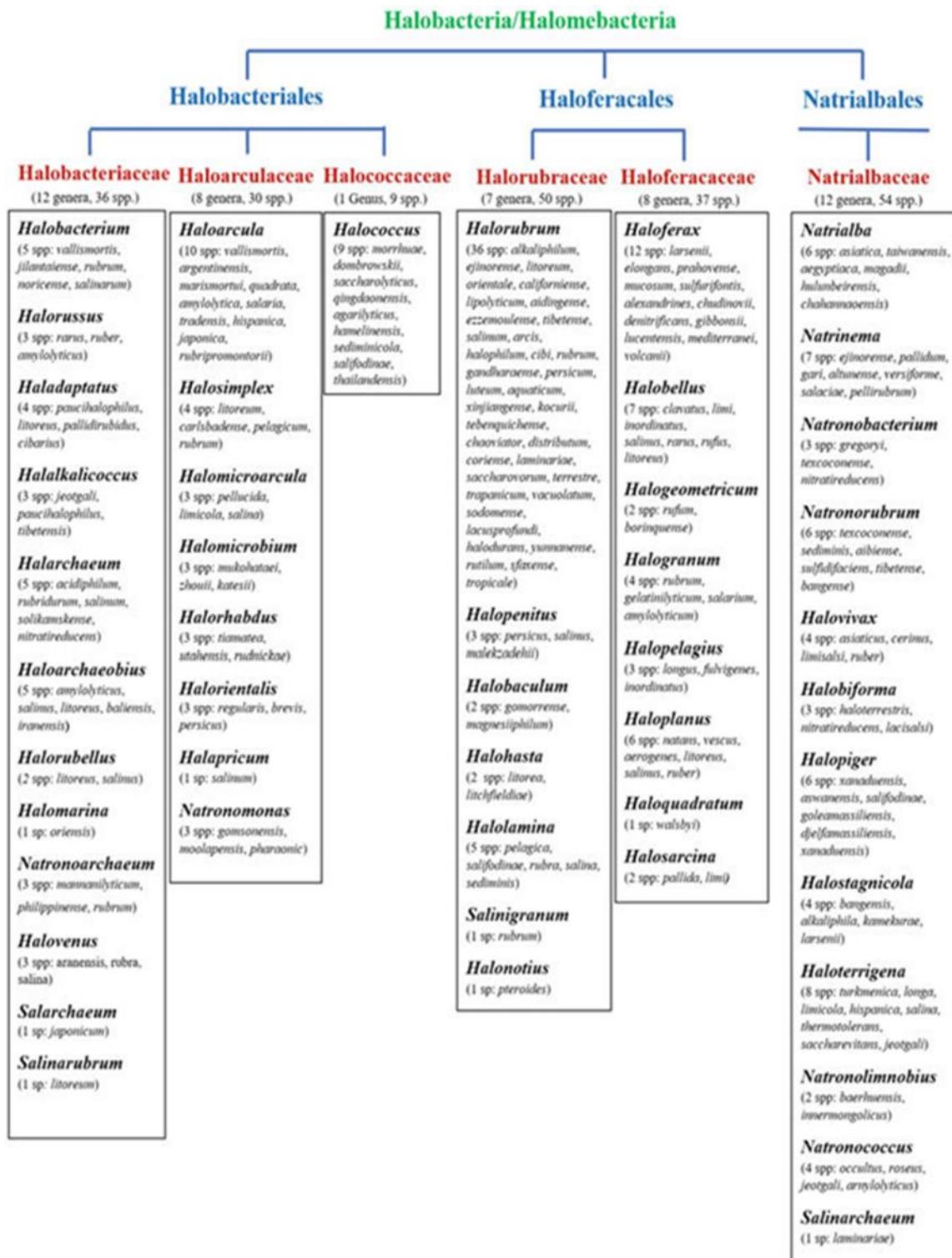
- * Papier aluminium
- * Pipettes graduées 10 ml
- * Pipettes pasteurs
- * Pissettes
- * Paires
- * Spatule
- * Tubes à essai

III. Produits chimiques :

- * (NaOH)/ HCl
- * Acétone
- * Acide acétique
- * Acide phosphorique 5%
- * Acide trichloracétique
- * Ethanol
- * Lugol
- * Tris Hcl-NaCl
- * Tween 20
- * Tween 80
- *Chlorure de sodium (NaCl)
- *Chlorure de magnésium (MgCl₂)
- *Sulfate de magnésium (Mg SO₄)
- *Chlorure de potassium (KCl)
- *Chlorure de calcium (CaCl₂)
- *Bromure de sodium (NaBr)
- *Bicarbonate de sodium (NaHCO₃)
- * Extrait de levure
- *Agar

Annexe II

Classification phylogénétique des haloarchées de la classe au niveau genre/espèce (Kkumar et Tiwiri, 2019)



Résumé

Les haloarchées et leurs métabolites présentent des propriétés inhabituelles telles que la stabilité sous conditions extrêmes et offre un intérêt particulier pour la recherche de nouveaux produits.

Une dizaine de souches d'archées et d'isolats halophiles extrêmes ont fait l'objet de cette étude.

La plupart présentent des activités antibiotique sur la souche de référence *Halobacterium salinarum* DSMZ3754 et sur des bactéries pathogènes ; *E.coli* (N°ATCC : 8739) et *S. aureus* (N°ATCC/6538).

Le moyen le plus efficace pour leur récupération à partir du surnageant de culture est la précipitation acide et à l'éthanol, moyen, qui pourrait faciliter leur exploitation en milieu industriel.

Summary

Haloarchaea and their metabolites exhibit unusual properties such as stability under extreme conditions and are of particular interest for the search for new products.

Ten strains of archaea and extreme halophilic isolates were the subject of this study. Most of them exhibit antibiotic activities on the reference strain *Halobacterium salinarum* DSMZ3754 and on the pathogenic bacteria ; *E. coli* (N°ATCC : 8739) and *S. aureus* (N°ATCC/6538). The most effective means for their recovery from the culture supernatant is acid and ethanol precipitation, which could facilitate their industrial exploitation in environments.