

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

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Spécialité Biotechnologie microbienne



Réf :

Mémoire de fin de cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Méthodes d'extraction, de caractérisation et de
purification des bactériocines marines**

Présenté par :

AOUF Chaima et ALLAOUI Messaouda

Soutenu le : 15/09/2022

Devant le jury composé de :

M. RAMDANE Z.

Professeur

Président

Mme DIAF A.

MAB

Examinatrice

Mme BOUKTIT N.

MAA

Encadrante

Année universitaire : 2021/2022

Remerciements

Nous tenons à remercier tout d'abord notre encadrante Mme BOUKTIT pour ses conseils, ses remarques, ses orientations et surtout pour sa disponibilité.

Nos remerciements les plus sincères s'adressent à Monsieur RAMDANE et Mme DIAF pour l'honneur qu'ils nous font en acceptant d'évaluer ce travail.

Nous remercions toutes les personnes qui nous ont aidées à réaliser ce travail.

Dédicaces

Je tiens à dédier ce modeste travail à :

*À la mémoire de mon très cher père, que DIEU
garde son âme dans son vaste paradis.*

*À ma très chère mère qui n'a jamais cessé de prier
pour moi, que DIEU la garde pour moi.*

À mes chers frères et sœurs.

À toutes les personnes de ma grande famille.

À mes chers amis.

À ma binôme Messaouda.

À celui qui m'a aidée, encouragée et arrosée d'espoirs.



Chaima

Dédicaces

Je tiens à dédier ce modeste travail à :

À mon très cher père :

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien-être, ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

Que Dieu te garde pour moi.

À ma très chère mère :

Celle qui toujours m'a protégée, celle qui a su aimer, su patienter et su comment donner le meilleur sans limites malgré tout obstacle, la plus merveilleuse amie et la plus chère pour moi dans ce monde. Que Dieu te garde pour moi et soit avec toi à tout moment.

Aux cœurs sains et aux âmes innocentes, ceux avec qui j'ai acquis la force et l'amour mes « frères et mes sœurs » :

Youcef, Cherif, Souad, Basma et Ayatte.

À ceux avec qui j'ai vécu des moments de joie et qui m'ont accompagnée dans les ténèbres de la vie « mes amies »

Célia et Thiziri.

À tous ceux qui appartiennent à ma famille de près ou de loin.

*À ma binôme et amie : **Chaima.***

À tous mes collègues de la promotion.



Messaouda

Table des matières

Introduction générale	1
Chapitre 1 : Généralités sur les bactériocines et les bactériocines marines	3
I. Les antibiotiques	3
II. Les bactériocines	3
III. Les bactériocines marines	5
IV. Source des bactériocines	5
Chapitre 2 : Méthodes de caractérisation des bactériocines marines	7
I. Effet de la température et du pH	9
II. Effet des enzymes	9
III. Effet des agents tensioactifs	10
IV. Test d'activité antibactérienne	10
V. Détermination de la masse moléculaire par SDS-PAGE	10
Chapitre 3 : Méthodes d'extraction et de purification des bactériocines marines	11
I. L'extraction	11
1. Précipitation au sulfate d'ammonium	11
2. Extraction aux solvants organiques	11
II. La purification	12
1. Chromatographie échangeuse d'ions	12
1.1. Chromatographie échangeuse d'anions	13
1.2. Chromatographie échangeuse de cations	13
2. Chromatographie d'exclusion sur Séphadex G-25 et Séphadex G-75	13

3. Chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC).....	15
Conclusion générale.....	16
Références bibliographiques	17

Liste des tableaux

Tableau 1 : Quelques bactériocines marines caractérisées et leurs sources.....	8
---	---

Liste des figures

Figure 1 : Chromatographie échangeuse d'ions.....	12
Figure 2 : Chromatographie d'exclusion. Schéma du "trajet " emprunté par des substances de masses moléculaires différentes.....	14
Figure 3 : Schéma général de l'appareillage utilisé en HPLC en phase inverse.....	15

Introduction Générale

Introduction générale

Les bactériocines sont des composés protéiques synthétisés par voie ribosomique, létaux pour les bactéries apparentées à l'espèce productrice, cette dernière étant protégée par un phénomène d'immunité. Le rôle des bactériocines dans les communautés microbiennes n'a pas encore été bien établi. Les bactériocines peuvent servir de composés anti-compétiteurs permettant l'invasion d'une souche ou d'une espèce dans une communauté microbienne établie ou agir comme molécules de communication dans les consortiums bactériens tels que les biofilms. Une façon de remplacer les antibiotiques de manière intelligente et durable sera la sélection de souches bactériocinogènes et anti-pathogènes à partir de micro-organismes bactériens associés à des animaux pour les utiliser comme probiotiques [1].

Contrairement au milieu terrestre, les organismes marins ont une très large distribution géographique. Ils ont dû s'adapter aux différentes conditions écologiques rencontrées. Schématiquement, ils se répartissent entre le pelagos organismes vivant dans la colonne d'eau (plancton, poissons, méduses...) et le benthos - organismes vivant sur le fond - fixés comme les algues ou les coraux, ou libres, comme les crustacés, mollusques ou autres échinodermes^(a).

Il y a beaucoup de bactéries dans l'environnement marin, mais par rapport à celles qui se trouvent sur terre, seule une petite partie a été utilisée. Le secteur de l'aquaculture est l'un de ceux qui ont envisagé le potentiel de ces micro-organismes marins comme solution à long terme aux problèmes de maladie [2].

Le milieu marin diffère sensiblement des habitats terrestres et d'eau douce en raison de sa nature exigeante, compétitive et agressive. La densité estimée des bactéries dans l'eau de mer et les sédiments varie de 10^5 à 10^7 /mL et 10^8 - 10^{10} /g respectivement [3]. Peu de choses sont connues sur la diversité des micro-organismes marins. Le nombre d'espèces de microorganismes est estimé entre 10^4 - 10^5 et 10^6 - 10^7 [4]. Les bactériocines produites par les bactéries marines intéressent principalement les chercheurs en raison de leur potentiel en tant que probiotiques et antibiotiques dans l'industrie des fruits de mer et l'aquaculture marine [5-6].

Le but de ce travail est de faire une synthèse bibliographique sur les bactériocines marines et ce en mettant l'accent sur les différentes méthodes de caractérisation, d'extraction et de purification qui ont servi à les identifier.

Pour mener à bien notre recherche bibliographique, nous l'avons structurée en trois chapitres :

Un premier chapitre où nous introduisons les bactériocines en général et les bactériocines marines en particulier.

Dans le deuxième chapitre nous nous sommes focalisées sur les différentes méthodes de caractérisation des bactériocines marines.

Nous avons consacré le dernier chapitre aux différentes méthodes d'extraction et de purification des bactériocines marines.

Chapitre 1

Généralités sur les bactériocines et les bactériocines marines

Chapitre 1

Généralités sur les bactériocines et les bactériocines marines

Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), l'un des plus grands risques pour le développement moderne, la sécurité alimentaire et la santé mondiale est la résistance aux antibiotiques. De nombreux chercheurs sont à la recherche de nouvelles solutions à ce problème. Ils envisagent d'utiliser les bactériocines comme une nouvelle approche antibactérienne pour résoudre les problèmes de multi résistance qui affligent actuellement la population mondiale [7].

I. Les antibiotiques

Ce sont des substances chimiques considérées comme des métabolites secondaires [8], produites par les micro-organismes, et qui ont la capacité de détruire (action bactéricide) ou d'inhiber (action bactériostatique) la croissance d'autres microorganismes [9] ; mais actuellement, comme se développent des germes résistants aux antibiotiques, ces antibiotiques ne sont que partiellement efficaces [2].

II. Les bactériocines

Il est connu et étudié depuis longtemps que les bactéries peuvent interagir de manière antagoniste, et l'un des mécanismes utilisés par ces dernières comme stratégies de compétition est la synthèse de bactériocines.

La définition la plus fréquemment reconnue des bactériocines parmi toutes celles proposées au fil des années est celle de Klaenhammer (1988), qui définit les bactériocines comme « des protéines, ou complexes de protéines, avec une activité bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice. » [10].

Ce sont des substances de nature protéique à action antibactérienne caractérisées par une toxicité spécifique, provoquant un antagonisme spécifique entre les souches ; elles ont une capacité inhibitrice contre la croissance des espèces proches de la souche productrice afin de favoriser à cette dernière sa propre croissance au détriment des autres bactéries présentes

dans le milieu [11], L'effet peut être soit bactériostatique empêchant la croissance cellulaire, soit bactéricide avec ou sans lyse cellulaire [8]. Pour se protéger des effets néfastes de la bactériocine qu'elle produit, la souche productrice synthétise parallèlement une protéine d'immunité [12].

Les bactériocines sont synthétisées par voie ribosomique [13] pendant la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire de la croissance bactérienne, sachant que diverses souches ou espèces ayant des capacités de production variable peuvent toutes produire la même bactériocine [10].

Elles agissent de manière défensive, en empêchant l'invasion d'autres souches ou espèces dans une niche occupée [14].

Souvent, les bactériocines ne sont toxiques qu'à l'égard des bactéries étroitement apparentées à la souche productrice [2], donc elles peuvent être utilisées comme composés antibactériens hautement spécifiques qui ciblent des pathogènes bactériens spécifiques, c'est ce qui explique leur spectre d'action qui est relativement étroit [15].

En fonction de leur taille, de leur cible microbienne, de leur mode d'action, de leur libération et de leurs mécanismes immunitaires, les bactériocines sont généralement étudiées sur la base de la désignation Gram de leurs espèces productrices, elles peuvent être divisées en deux types y compris les bactériocines des bactéries à Gram négatif et Gram positif [14, 8]. Il existe quatre principaux types de bactériocines produites par des bactéries à Gram négatif, à savoir : les colicines, les bacteriocines colicin-like, les microcines, et les bacteriocines phage tail-like; tandis que quatre grandes classes constituent les bactériocines produites par les bactéries à Gram positif: Class I, Class II, Class III et Class IV [14]. De plus, quelques bactériocines d'Archaea, appelées archéocines, ont également été caractérisées, à ce jour seul les halocines des halobactéries et les sulfolobiocines du genre *Sulfolobus* ont été identifiées [16].

Certaines bactéries produisent des toxines non entièrement caractérisées qui ont des propriétés semblables à celles des bactériocines ; ces toxines sont connues sous le nom de substances inhibitrices de type bactériocine ou BLIS [17].

Plusieurs études ont révélé que les bactériocines présentent des avantages supplémentaires par rapport aux antibiotiques, on pense que ces peptides antimicrobiens offrent une meilleure protection grâce à l'absence d'effets secondaires indésirables [8].

III. Les bactériocines marines

À partir de micro-organismes marins, une variété de peptides antimicrobiens dont les bactériocines et les BLIS ont été isolées, elles partagent cependant certaines similitudes avec les bactériocines des bactéries et des archées. Il peut s'agir de petits peptides (5-10 kDa) ou ils peuvent également être de plus grande taille (10-90 kDa) [17].

Les chercheurs s'intéressent principalement aux bactériocines produites par les bactéries marines car elles ont le potentiel d'être utilisées comme probiotiques et antibiotiques dans l'industrie des produits de la mer et l'aquaculture marine [14].

Les bactériocines marines sont produites par les principaux genres de bactéries marines suivants : *Aeromonas*, *Burkholderia*, *Photobacterium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Carnobacterium*, *Lactococcus*, *Streptomyces*, *Pseudoalteromonas*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, ainsi que certaines archées [15].

IV. Sources des bactériocines

L'isolement de bactéries productrices de bactériocines pourrait se faire à partir de diverses sources, y compris les environnements marins. Les bactéries marines et les souches qui composent les communautés microbiennes des sédiments sont parmi les producteurs les plus importants de bactériocines marines [15].

La première bactériocine marine « harveycine » a été isolée de *Vibrio harveyi* (anciennement *Beneckea harveyi*) après criblage de 795 souches isolées près de l'île de Galveston au Texas [14].

De nombreuses recherches visant à caractériser biochimiquement de nouvelles bactériocines et substances de type bactériocines (BLIS) ont été lancées à la suite de la découverte de l'harveycine [14, 15].

Le genre *Bacillus* contient plus de 300 espèces dont de nombreuses espèces sont des producteurs intéressants de substances antimicrobiennes telles que les bactériocines ou les substances de type bactériocine (BLIS) [18]. Il a été rapporté récemment qu'un isolat producteur de bactériocine, *Bacillus* sp. Sh10, obtenu à partir de la palourde (*Paphia textile*) présente un large spectre d'activité contre divers agents pathogènes [19]. Une autre espèce, *Bacillus velezensis* BS2 isolée d'un fruit de mer coréen (Meongge Jeotgal), productrice de

bactériocine marine inhibe fortement *Listeria monocytogenes* et *Bacillus cereus* [18]. Les souches *Bacillus subtilis* font aussi partie des souches productrices de nombreuses bactériocines telles que la subtilomycine, elles sont isolées de plusieurs éponges marines peu profondes et profondes [2].

Certaines bactéries des genres *Aeromonas*, *Alteromonas* et *Vibrio*, résidant dans la mer ou l'océan, ont un effet bactéricide sur les bactéries résistantes en produisant des bactériocines [8].

Environ 46 souches bactériennes des genres *Aeromonas*, *Burkholderia*, *Photobacterium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia* et *Stenotrophomonas*, ayant une activité antimicrobienne ont été trouvées lors du dépistage antimicrobien de 258 souches bactériennes provenant de l'eau et des sédiments de la péninsule du Yucatan. Environ 50% de cette activité antimicrobienne a été attribuée aux bactériocines ou aux BLIS [14].

Chapitre 2

**Méthodes de caractérisation des
bactériocines marines**

Chapitre 2

Méthodes de caractérisation des bactériocines marine

Selon une étude sur des bactéries isolées du port de Sydney en Australie, environ 10 % des bactéries marines fixées à la surface ont une activité antibactérienne [21]. Des substances protéiques comme les bactériocines ou les BLIS ont été mises en cause pour cette activité inhibitrice, selon le traitement à la protéinase k. Une bactériocine thermostable nommée BL8 extraite de *Bacillus licheniformis* dans un sédiment marin en est un exemple [22].

Certaines bactéries, notamment celles du tube digestif ichtyen comme celui du saumon de l'Atlantique (*Salmo salar* L.), produisent des substances inhibitrices qui empêchent des pathogènes potentiels de coloniser les poissons [23,24]. *Vibrio sp* souche NM10 isolée de l'intestin d'un poisson pony tacheté produit une substance antibactérienne thermolabile et de nature protéique, d'une masse moléculaire inférieure à 5 kDa, probablement une bactériocine ou une BLIS [25]. Dans une autre étude, 28 isolats soit 2,7 % des 1 055 bactéries intestinales isolées de sept poissons côtiers au Japon pourraient inhiber la croissance de l'espèce pathogène des poissons *V. vulnificus* [26].

15 isolats, dont 11 membres de *Vibrionaceae*, 3 *corynéformes* et 1 souche de *Bacillus* NM 12 (cette dernière présentant l'activité antimicrobienne la plus prononcée), ont montré une inhibition marquée. La croissance de 227 des 363 (62,5 % du total) isolats bactériens intestinaux de 7 poissons a été inhibée par un sidérophore thermolabile dont le poids moléculaire est inférieur à 5 kDa [27]. Une souche BTSS3 de *Bacillus amyloliquefaciens* qui produit une bactériocine thermostable et tolérante au pH a également été découverte dans l'intestin d'un requin des grands fonds [14].

Le tableau suivant illustre quelques bactériocines marines caractérisées ainsi que leurs sources :

Bactériocine	Souche productrice	Masse moléculaire	Souches cibles	Sources
Carnocin U149	<i>Carnobacterium sp</i>	4.5-5kDa	<i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Carnobacterium</i>	Poisson
Divergicin M35	<i>Carnobacterium divergens M35</i>	~4.5kDa	<i>Carnobacterium</i> , <i>Listeria</i>	Moules fumées dans la glace.
Enterocin B like BLIS	<i>Enterococcus faecium ALP7</i>	<6.5kDa	<i>Listeria</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Leukonostoc</i>	Non fermenté Fruits de mer
BLIS	<i>Lactobacillus lactis</i>	94kDa	<i>Bacillus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>E.coli</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Shigella</i>	Échantillon de sédiment
BLIS	<i>Vibrio sp</i>	<5kDa	<i>Bacillus sp.</i> , <i>Vibrio sp.</i> <i>Pseudomonas sp.</i>	Poisson poney à nuque tachetée
Bactériocin	<i>Bacillus sp. NM12</i>	Sidérophore <5kDa	Pathogènes des poissons	Poissons côtiers
Piscicocin V1a	<i>Carnobacterium pisciocola VI</i>	4.4kDa	<i>Lactobacillus</i> , <i>Listeria</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Carnobacterium</i>	Poisson

Tableau [1]: Quelques bactériocines marines caractérisées et leurs sources [14].

Les bactériocines sont généralement classées en combinant divers critères. Les principaux étant la famille bactérienne productrice, la masse moléculaire et enfin les homologies de séquences en acides aminés et/ou l'organisation des groupes de gènes [1].

I. Effet de la température et du pH :

Les plages de pH et de température testées sont choisies en fonction des niveaux habituels que l'on retrouve dans les aliments et lors de leurs procédés de transformation. Les surnageants stériles ont été ajustés à différentes valeurs de pH (2, 4, 6, 7, 8, 9, 10 et 12) avec du NaOH ou du HCl 2N stérile, puis incubés à 37 °C pendant deux heures pour déterminer l'activité des bactériocines à chaque niveau de pH. Avant de mesurer l'activité antibactérienne, les échantillons traités ont été neutralisés à pH 6. Des solutions tampons à 100 mM ont été utilisées comme témoins [29].

Pour évaluer la thermostabilité, des aliquotes de surnageants stériles ont été chauffés à 60 °C, 80 °C, 100 °C pendant 15 min /30 min, et 121 °C/15 min, puis immédiatement refroidis afin de tester leur activité antibactérienne. L'effet des températures de réfrigération (4 °C) et de congélation (-20 °C) sur la stabilité de la bactériocine a également été évalué.

Les surnageants stériles des 38 souches de *Lactococcus lactis ssp. lactis* isolées de tractus gastro-intestinal des poisson côtiers : sardine (*Sardina pilchardus*) et bogue (*Boops boops*) ont subi ces différents traitements afin de déterminer leur stabilité vis-à-vis des différents pH et températures [29].

II. Effet des enzymes

Pour confirmer la nature protéique des substances antibactériennes, leur sensibilité aux enzymes protéolytiques est testée. Des aliquotes de bactériocine purifiée sont traitées avec les enzymes suivantes : protéinase K, chymotrypsine, trypsine, pepsine, α -amylase et catalase à 1 mg/mL et incubées à 30 °C pendant 2 heures [30].

La bactériocine produite par *L. murinus* AU06, isolée des sédiments marins de la côte de Parangipettai, est devenue complètement inactive après son traitement à la protéinase K, chymotrypsine, trypsine et pepsine confirmant ainsi sa nature protéique [30].

III. L'effet des agents de tensioactifs :

Pour tester l'effet des tensioactifs sur l'activité des bactériocines, le sodium dodécyl sulfate 1% (SDS), Tween 20, Tween 80, urée, Triton X-114 et Triton X-100 ont été ajoutés séparément à la bactériocine purifiée. Une bactériocine non traitée est utilisée comme témoin et son activité correspond à 100 %. Toutes les bactériocines traitées et non traitées (témoins) sont incubées à 37 ° C puis testée pour leur activité antimicrobienne [30].

IV. Test d'activité antibactérienne

La méthode des puits est utilisée pour détecter l'activité antimicrobienne de la bactériocine purifiée contre différentes souches indicatrices [31]. Pour ce faire, un volume de 100 µL de bactériocine purifiée est déposé dans des puits de 5 mm de diamètre creusés dans des plaques gélose préalablementensemencées avec 100 µL de souche indicatrice contenant $2 \cdot 10^8$ UFC/ML. Le tout est mis à 4 ° C pour une meilleure diffusion de l'agent antibactérienne puis incubé pendant 24h à 37 ° C [32].

V. Détermination De la masse moléculaire en SDS-PAGE :

Par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate à différents pourcentages, la masse moléculaire des bactériocines peut être déterminée en utilisant différent marqueurs de taille. La masse moléculaire de la bactériocine produite par *lactobacillus lactis* isolée d'un environnement marin a pu ainsi être estimée à 94 kDa par SDS-PAGE à 15% et en se servant de marqueurs de taille comprise entre 29 et 200 kDa [33].

Chapitre 3

Méthodes d'extraction et de purification des bactériocines marines

Chapitre 3

Méthodes d'extraction et de purification des bactériocines marine

La production des bactériocines marines commence par une culture des bactéries productrices dans les conditions de croissance optimales, des tests d'activité sont ensuite réalisés contre des bactéries pathogènes afin de préparer les prochaines étapes qui sont assez importantes à savoir l'extraction et la purification [37].

I. L'extraction

C'est une technique qui sert à extraire un ou plusieurs composés à partir d'un mélange initial d'une manière sélective et le/les transférer d'une phase liquide ou solide à une autre phase liquide [35].

L'extraction des bactériocines consiste à réaliser une séparation des cellules du milieu de culture, par centrifugation entre 8 000 et 15 000 rpm pendant 15 à 20 min à 4 °C ; le surnageant ainsi obtenu est ajusté à un pH compris entre 6 et 7 en utilisant du NaOH à 1 mol/L. Le surnageant ajusté est considéré comme bactériocine brute [30, 33, 34].

1. Précipitation au sulfate d'ammonium

La suite de l'extraction se fait soit par solvants organiques soit par précipitation au sulfate d'ammonium, ce dernier précipite la bactériocine brute avec une saturation pouvant aller jusqu'à 80%, une dialyse contre du tampon phosphate 20 mM à pH 7 pendant 12 heures à 4 °C est nécessaire afin d'éliminer le sel ayant servi à la précipitation pour qu'il n'interfère pas lors des prochaines étapes [33].

Une activité antibactérienne importante contre certains agents pathogènes a été enregistrée chez *Lactobacillus lactis* isolée à partir des sédiments marins (port de Chennai dans le golfe du Bengale). Les échantillons de sédiments ont été conservés à faible température (4 °C) jusqu'à utilisation. Le surnageant de culture considéré comme bactériocine brute a été saturé au sulfate d'ammonium à 80 % puis précipité et dialysé contre du tampon phosphate 20 mM pH 7 pendant 12 h à 4 °C [33].

2. Extraction aux solvants organiques

L'extraction par solvants organiques repose sur le passage de la substance à extraire dans un solvant par solubilisation [35].

Elle consiste à mélanger le surnageant de culture avec une résine Diaion HP-20 à 1 % (m/v), le mélange ainsi obtenu est mis sous agitation à 30 °C et 200 tr/min pendant 2 h. Pour éliminer les protéines non spécifiques et celles faiblement liées la résine est lavée avec du méthanol à 10 %. L'éluion de la bactériocine se fait avec du méthanol à 100 % qui sera par la suite évaporé à l'aide d'un Rotavapor R-200, le contenu peptidique séché obtenu est dissous dans de l'eau Milli-Q [34].

II. La purification

C'est l'étape qui peut suivre directement l'extraction, elle comprend différents types de chromatographies :

1. Chromatographie échangeuse d'ions

Elle permet de séparer différents constituants en fonction de leur charge électrique, quelles que soient leurs tailles : acides aminés, peptides, protéines, etc. (5). La phase stationnaire de cette chromatographie est constituée d'une résine chargée soit positivement (chromatographie échangeuse d'anions) soit chargée négativement (chromatographie échangeuse de cations) [35, 36] selon la figure suivante :

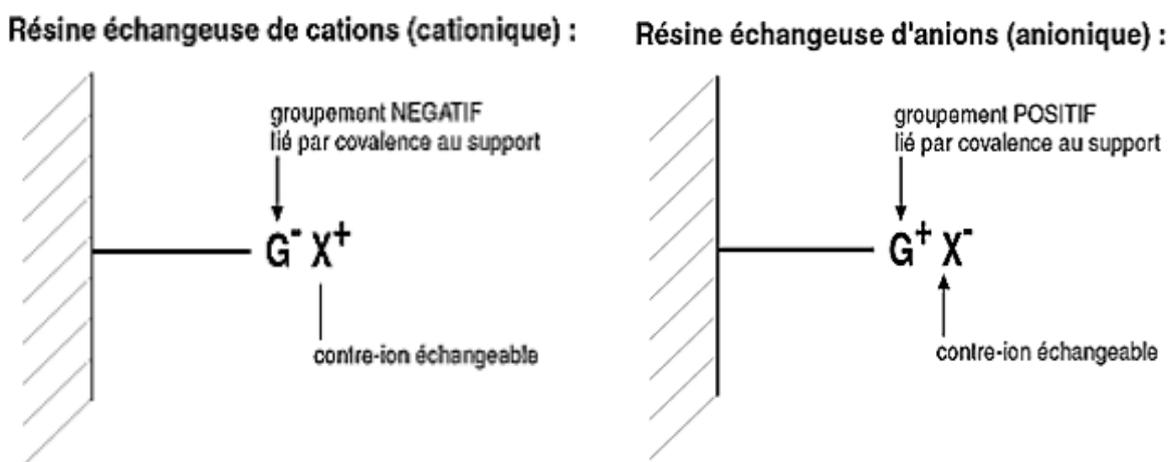


Figure 1 : Chromatographie échangeuse d'ions

1.1. Chromatographie échangeuse d'anions DEAE

Elle est effectuée sur une résine échangeuse d'anions de type diéthylaminoéthyl-cellulose (DEAE-Cellulose), les extraits protéiques obtenus sont appliqués sur une colonne DEAE-Cellulose [30, 33], préalablement équilibrée avec du tampon Tris/HCl 0,1 mol/L à pH 9 ou du tampon phosphate 20 mM à pH 7. L'élution des protéines liées se fait soit par gradient croissant de NaCl de 0 à 1 mol/L soit par gradient de molarité croissante en tampon phosphate associé à un gradient décroissant de pH à température ambiante (environ 25 °C). Le débit d'élution est ajusté à 24 mL/h, les fractions recueillies et présentant une forte activité bactériocine sont regroupées et concentrées dans un lyophilisateur [30,33].

La bactériocine produite par *Lactobacillus lactis*, isolée à partir d'un environnement marin, a été séparée par une chromatographie échangeuse d'anions sur une colonne DEAE-Cellulose A-50 de 20 mm de diamètre et 60 mm de longueur. Après lavage de la colonne avec 3 fois son volume en tampon phosphate 20 mM à pH 7, les protéines liées ont été éluées par gradient de molarité croissante en tampon phosphate et par gradient de pH décroissant [33].

1.2. Chromatographie échangeuse de cations

Le surnageant extrait de la culture de *Bacillus sonorensis* MT93 a été chargé sur une colonne échangeuse de cations de type SP Sepharose pré-équilibrée avec du tampon phosphate 10 mM à pH 7,2 ; cette colonne a été connectée à un système de chromatographie ÄKTA Explorer. L'élution a été réalisée par gradient de NaCl (0- 1 M) et les fractions actives obtenues sont concentrées par lyophilisation [33].

2. Chromatographie d'exclusion sur Séphadex G-25 et Séphadex G-75

C'est en fonction de la taille, la forme et de la masse moléculaire du composé à séparer que la chromatographie d'exclusion permet la séparation des constituants et cela à travers une phase stationnaire sous forme de gel qui pourrait être de type Séphadex, Séphacryl, etc. [36]. Un exemple de séparation par chromatographie d'exclusion sur séphadex G-25 et G-75 est illustré ci-dessous :

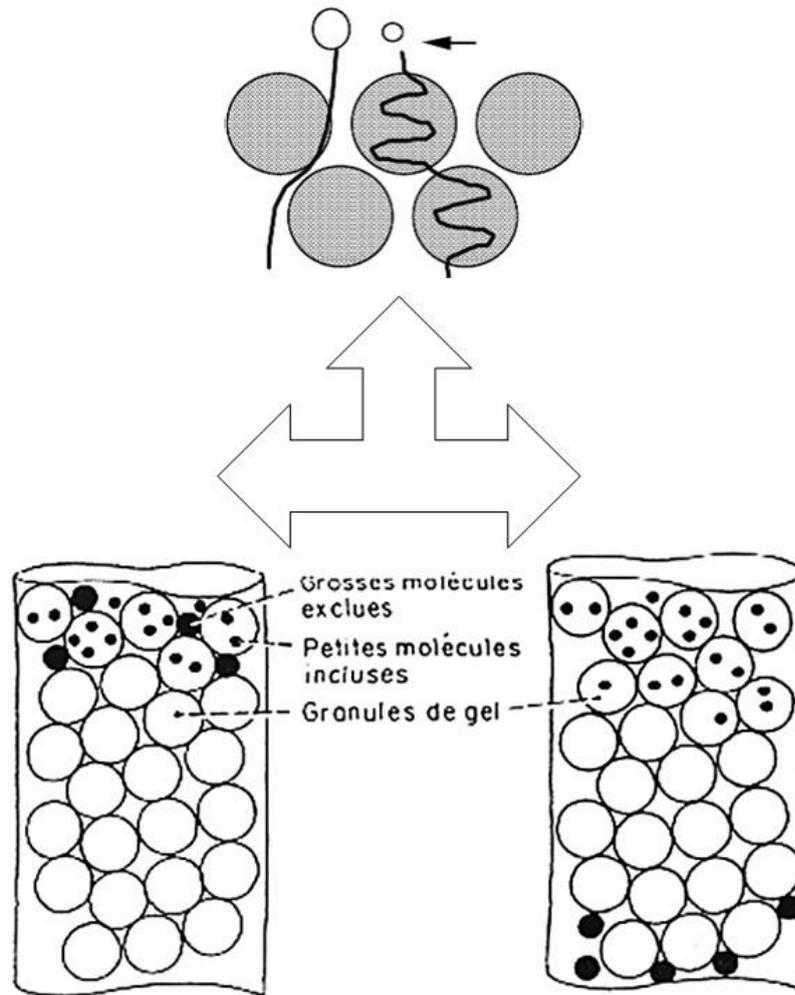


Figure 2 : Chromatographie d'exclusion. Schéma du "trajet " emprunté par des substances de masses moléculaires différentes.

Une chromatographie d'exclusion sur gel de Séphadex G-75 a été utilisée pour séparer les fractions actives, regroupées et concentrées, obtenues après chromatographie échangeuse d'anions du précipité du surnageant de culture de *Lactobacillus murinus* AU06 isolée à partir de sédiments marins. La colonne de Sephadex G-75 est équilibrée avec du tampon Tris-HCl 0,1 mol/L à pH 9 et l'éluion est effectuée avec le même tampon à un débit de 0,5 mL/min. Les fractions éluées sont ensuite testées pour leur activité bactériocine [30].

Un autre exemple de séparation par chromatographie d'exclusion est celui des fractions concentrées et lyophilisées obtenues à partir du surnageant de culture de *Bacillus sonorensis* MT93 (un nouvel isolat marin); ces dernières sont injectées sur une colonne de Sephadex G-25 connectée à un ÄKTA Explorer préalablement équilibrée avec du tampon phosphate à 20 mM (pH 7,2) contenant 20 mM de NaCl. L'éluion est effectuée avec le même tampon d'équilibrage à un débit de 0,3 mL/min et suivie par un détecteur UV à 220 nm [34].

3. Chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC)

L'HPLC en phase inverse est une technique de séparation analytique très générale qui consiste à séparer les molécules d'un échantillon par partage entre une phase mobile et une phase stationnaire [36]. Le schéma ci-dessous illustre son fonctionnement :

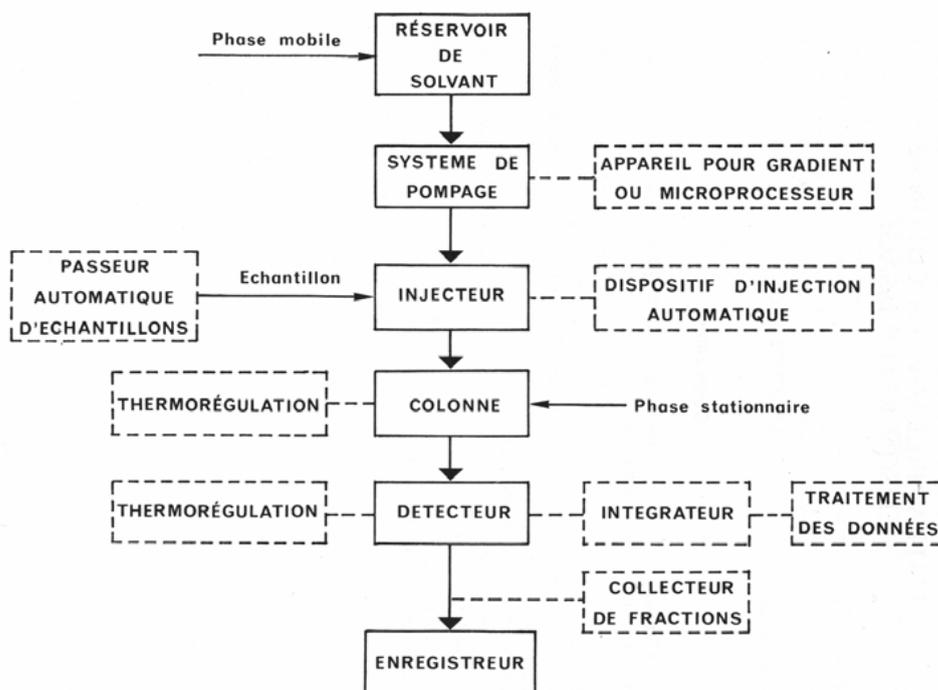


Figure 3 : Schéma général de l'appareillage utilisé en HPLC en phase inverse.

Les fractions actives issues d'une chromatographie échangeuse d'ions ou d'exclusion sont injectées sur une HPLC en phase inverse (RP) (colonne semi-préparative Spherisorb S100DS2 de Waters de 20 par 250 mm) équilibrée avec de l'acétonitrile à 5% (ACN)- acide trifluoroacétique à 0,1% (TFA)-eau. C'est le cas des fractions actives obtenues après chromatographie d'exclusion sur gel de Séphadex G-25 de l'extrait antibactérien du surnageant de culture de la souche *Bacillus sonorensis* MT93. L'élution se fait par un gradient linéaire et croissant en ACN allant de 10% à 60% (vol/vol) pendant 30 min à un débit de 5 mL/min. L'absorbance est mesurée à 220 nm et le pic présentant une activité antibactérienne correspond à la bactériocine pure [34].

Conclusion Générale

Conclusion générale

Cette recherche bibliographique avait pour but d'apporter une contribution à une meilleure compréhension sur les méthodes de caractérisation, d'extraction et de purification des bactériocines marines.

Le but principal de cette étude est de trouver une réponse à la question principale suivante : « Qu'elles sont les différentes méthodes de caractérisation, d'extraction et de purification des bactériocines marines » ?

Afin de mieux répondre à cette question, une synthèse du peu d'articles dont dispose la bibliographie nous a permis de mettre la lumière sur les différentes méthodes utilisées pour caractériser les bactériocines marines en allant de l'étude de l'effet du pH, température et enzymes aux effets des tensioactifs. Les résultats de la caractérisation permettent d'orienter les méthodes d'extraction et de purification selon la taille, la charge, la stabilité et la polarité des bactériocines étudiées.

Toutefois, cette recherche bibliographique pourrait être complétée et poursuivie à long terme en vue de l'importance de ce genre de substances, et les résultats obtenus suggèrent de possibles voies de recherches supplémentaires à améliorer pour une étude plus approfondie sur le problème de mortalité des larves de poissons que le monde rencontre actuellement.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

- [1] Desriac F, Defer D, Bourgougnon N, Brillet B, Le Chevalier P, Fleury Y (2010) Bacteriocin as Weapons in the Marine Animal-Associated Bacteria Warfare: Inventory and Potential Applications as an Aquaculture Probiotic. *Marine Drugs* 8(4): 1153-1177.
- [2] Irfan A. RATHERA, Richelle Galopeb, Vivek K. Bajpaia, Jeongheui Limc, Woon Kee Paekc, and Yong-Ha Parka (2017) Diversity of Marine Bacteria and Their Bacteriocins: Applications in Aquaculture. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* 25(4): 257-269.
- [3] Austin B (1988). *Marine Microbiology*. Melbourne: Cambridge Univ Press. pp 222.
- [4] Glöckner FO (2012) Marine microbial diversity and its role in ecosystem functioning and environmental change. *Marine Board – European Science Foundation Position Paper* 17.
- [5] Galvez A, Lopez RL, Abriouel H, Valdivia E et Ben Omar N (2008). Application of bacteriocins in the control of food borne pathogenic and spoilage bacteria. *Crit Rev Biotechnol* 28(2):125–152.
- [6] Pilet MF et Leroi F (2011) Applications of protective cultures, bacteriocins, and bacteriophages in fresh seafood and seafood products, In: Lacroix C, editor. *Protective cultures antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation*. Switzerland: ETH Zurich. p. 1– 21
- [7] Garitte, L. (2019) Les bactériocines, une alternative aux antibiotiques ? UCLouvain. <https://uclouvain.be/fr/sciencetoday/actualites/les-bacteriocines-une-alternative-aux-antibiotiques.html>, (2019, May 7).
- [8] Darbandi A, Asadi A, Mahdizade Ari M, Ohadi E, Talebi M, Halaj Zadeh M, Darb Emamie A, Ghanavati R et Kakanj M (2021) Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials. *J Clin Lab Anal* 36(1): e24093.
- [9] El Abdani, S (2016) Evolution De La Résistance Bactérienne Aux Antibiotiques Et Conseils En Antibiothérapie. Thèse pour l’obtention du diplôme d’état de docteur en pharmacie, Université Mohammed V-Rabat. pp 192.

- [10] Dortu C et Thonart PH (2009) Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol.Agron. Soc. Environ.* 13(1), 143-154.
- [11] Dillenseger HL (2019) Les bactériocines : en alternative aux traitements antibiotiques. Sciences pharmaceutiques. Thèse pour l'obtention du diplôme d'état de docteur en pharmacie, Université de Bordeaux. Pp 72.
- [12] Jasniewski J (2008) Étude des mécanismes d'action de bactériocines de la sous classe IIa. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Lorraine en Procédés Biotechnologiques et Alimentaires. pp 132.
- [13] Sharma V, Aseri G, Bhagwat P, Jain N et Ranveer RC (2021). Production, Purification and Characterization of a Novel Bacteriocin Produced by *Bacillus subtilis* VS Isolated from Mango (*Mangifera indica* L.). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 64: e21190749
- [14] Bindiya ES et Bhat SG (2016) Marine bacteriocins: a review. *J Bacteriol Mycol* 2(5):140-147.
- [15] Zimina M, Babich O, Prosekov A, Sukhikh S, Ivanova S, Shevchenko M et Noskova S (2020). Overview of Global Trends in Classification, Methods of Preparation and Application of Bacteriocins. *Antibiotics*, 9(9): 553.
- [16] Shand RF et Leyva KJ (2007) Peptide and Protein Antibiotics from the Domain Archaea: Halocins and Sulfolobocins. In: Riley MA, Chavan MA, (eds). *Bacteriocins: Ecology and Evolution*. Springer, Berlin, Heidelberg. p 93–109.
- [17] Suphan Bakkal, Sandra M. Robinson and Margaret A. Riley (2012). Bacteriocins of Aquatic Microorganisms and Their Potential Applications in the Seafood Industry *in Health and Environment in Aquaculture* édité par Edmir Daniel Carvalho, Gianmarco Silva David and Reinaldo J. Silva. pp 303-328.
- [18] Perumal V, Yao Z, Kim JA, Kim HJ et Kim JH (2019) Purification and Characterization of a Bacteriocin, BacBS2, Produced by *Bacillus velezensis* BS2 Isolated from Meongge Jeotgal. *J Microbiol Biotechnol* 29(7):1033-1042.
- [19] Shayesteh F, Ahmad A, Usup G (2012) *In vitro* anti-biofilm activity of bacteriocin from a marine *Bacillus* sp. strain Sh10 against *Proteus mirabilis*. *Iran J Microbiol* 12(1) :52-61.

- [21] Wilson GS, Raftos DA, Corrigan SL, et Nair SV (2010) Diversity and antimicrobial activities of surface-attached marine bacteria from Sydney Harbour, Australia. *Microbiol Res* 165(4): 300–311.
- [22] Smitha S et Bhat SG (2012) Thermostable bacteriocin BL8 from *Bacillus licheniformis* isolated from marine sediment. *J Appl Microbiol* 114(3) :688–694.
- [23] Ringø E, Bendiksen HR, Wesmajervi MS, Olsen RE, Jansen PA et Mikkelsen H (2000) Lactic acid bacteria associated with the digestive tract of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J Appl Microbiol* 89(2): 317–322.
- [24] Makridis P, Martins S, Tsalavouta M, Dionsio LC, Kotoulas G, Magoulas A et Dinis MT (2005) Antimicrobial activity in bacteria isolated from Senegalese sole, *Solea senegalensis*, fed with natural prey. *Aquacult Res* 36(16):1619–1627.
- [25] Sugita H, Matsuo N, Hirose Y, Iwato M et Deguchi Y (1997) *Vibrio* sp. Strain NM 10, isolated from the intestine of a Japanese coastal fish, has an inhibitory effect against *Pasteurella piscicida*. *Appl Environ Microbiol* 63(12): 4986–4989.
- [26] Sugita H, Hirose Y, Matsuo N et Deguchi Y. (1998) Production of the antibacterial substance by *Bacillus* sp. strain NM 12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. *Aquaculture* 165(3–4): 269–280.
- [27] Austin B (2006) *The Bacterial Microflora of Fish, Revised*. *Scientific World Journal* 6: 931–945.
- [29] Sahnouni F, Boutiba-Maatallah A, Bouhadi D et Boutiba Z (2014) Characterization of bacteriocin produced by *Lactococcus lactis ssp. lactis* strains isolated from marine fish caught in the Algerian west coast. *Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences* 1(2):1838 – 1843.
- [30] Ivaramasamy E, Neelamegam A, Packiyam M et Thangavel B (2014) Production, purification and characterization of bacteriocin from *Lactobacillus murinus* AU06 and its broad antibacterial spectrum. *Asian Pac J Trop Biomed* 4(Suppl 1): S305-S311.
- [31] Tagg JR et Mcgiven AR. (1971) Assay system for bacteriocins. *Appl Microbiol*; 21(5): 943.

[32] Iqbal A. (1998) Production, purification and characterization of bacteriocins from indigenous clinical staphylococci. Thèse de Doctorat en Microbiologie. Université de Karachi, Pakistan. pp 216.

[33] Rajaram G, Manivasagan P, Thilagavathi B et Saravanakumar A (2010) Purification and Characterization of a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus lactis* Isolated from Marine Environment. Advance Journal of Food Science and Technology 2(2): 138-144.

[34] Lipsy C, Gurdeep S, Vikas C et Debendra K. S (2014) Sonorensin: An Antimicrobial Peptide, Belonging to the Heterocycloanthracin Subfamily of Bacteriocins, from a New Marine Isolate, *Bacillus sonorensis* MT93. Applied and Environmental Microbiology 80(10) : 2981–2990

[35] BENABDALLAH H, (2015/2016), Polycopié du Cours : Techniques d'extraction, de purification et de conservation, Master I : Analyses biochimiques, Université Ferhat Abbas de Sétif. pp 88.

[36] BASLI A. Procédés de Séparation des Biomolécules, Polycopié, Université Abderrahmane Mira, Bejaia. pp 73.

[37] Feliatra F, Muchlisin ZA, Teruna HY, Utamy WR, Nursyirwani N, Dahliaty A (2018) Potential of bacteriocins produced by probiotic bacteria isolated from tiger shrimp and prawns as antibacterial to *Vibrio*, *Pseudomonas*, and *Aeromonas* species on fish. F1000Res 29(7) :415.

Résumé

Les milieux aquatiques composent la grande partie de la surface terrestre et les microorganismes qu'ils renferment offrent une mine d'or de ressources en substances antimicrobiennes qui font partie intégrante de notre écosystème.

Pour bien exploiter ces composés, les recherches récentes s'intéressent de plus en plus à ces substances bioactives appelées bactériocines marines.

Cette recherche bibliographique avait pour objectif de cerner les méthodes de caractérisation, d'extraction et de purification utilisées pour l'identification des bactériocines marines.

Mots clés

Bactériocines marines ; Extraction ; purification ; caractérisation

Abstract

Aquatic environments make up most of the earth's surface and the microorganisms they contain provide a goldmine of resources for antimicrobial substances that are an integral part to our ecosystem.

In order to make good use of these compounds, recent research is increasingly focusing on these bioactive substances called marine bacteriocins.

The objective of this literature review was to discern the characterisation, extraction and purification methods used for the identification of marine bacteriocins.

Keywords

Marine bacteriocins; Extraction; Purification; Characterisation