

République algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université Abderrahmane Mira de Bejaia

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

Département biologie physico-chimique

Pour l'obtention de Diplôme de Master en Biologie

Option : Biochimie appliquée

Thème

***Caractérisation physico-chimique
d'une substance antibiotique produite
par une souche d'Haloarchaea locale***

Membre de Jury:

Promoteur : M^{me} Idres. N

Président : M^{me} Khettal. B

Examineurs : - Mr Belkacem. N

-M^{elle} Bouchffa. S

Présenté par:

M^{me}. Bouiche née SLIMANI Naziha

M^{elle}. SLIMANI Khadidja

Promotion 2013/2014

Remerciements

Nos remerciements vont à **ALLAH** le tout puissant, le majestueux, qui nous a donné le courage et la force pour mener à terme ce modeste travail.

Nous tenons à remercier tout particulièrement notre promotrice **M^{me} IDRES N.** Qu'elle trouve ici l'expression de notre plus vive gratitude, pour sa gentillesse, sa patience, sa disponibilité et tous ses conseils prodigués tout au long de ce parcours. Jamais nous n'oublierons vos qualités humaines et professionnelles qui nous ont profondément touchées.

Un grand merci aux membres du jury, **M^{me} khettal** qui nous a fait l'honneur de présider le jury de cette soutenance. **Mr Belkacem** et **M^{elle} Bouchffa** qui ont accepté de porter une évaluation à notre modeste travail.

Finalement il nous est agréable d'adresser nos remerciements à la doctorante **M^{elle} MAZGUENE S.** et l'attaché de laboratoire **M^{elle} Mennas.B** pour leur aide, leur optimisme, leurs encouragements et leurs nombreux conseils.

Enfin, nous remercions à travers ce travail tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

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

Mes très chers parents à qui je dois toute ma vie car ils m'ont tout donné pour faire de moi ce que je suis, mes parents qui sont mes piliers et sans eux rien n'a de la valeur ;

Mon unique frère : Brahim

Mes sœurs : Farida, Hayette, Nouria, Nabila et Lynda

Mes chers ami(e)s : Nawel, Siham, Samra, Narima, Kanza, Mouna, Djamel, Samira, Sonia, Meriem et Fatima

A toute la famille SLIMANI

A la promotion Biochimie Appliquée 2014

Et à tous ceux qui me sont chers

Et Enfin, à celle avec qui j'ai partagé ce travail Naziha et toute sa famille.

Khadidja

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

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

Mes très chers parents à qui je dois toute ma vie car ils m'ont toute donné pour faire de moi ce que je suis, mes parents qui sont mes piliers et sans eux rien n'a de la valeur (Qu'Allah les accueille dans son vaste paradis) ;

A mon mari : MOUKHTAR qui a fait beaucoup de sacrifices pour moi à qui je dois beaucoup de choses

Mon unique frère : Samir et sa petite famille : Lynda, Chérine et Aroune Larbi

Mes sœurs : Smira, Zina et Hizia

A mes beaux-parents : qui m'ont toujours soutenu dans les moments difficiles

A mes deux beaux-frères : Omar et Salim

A mes belles-sœurs : Khadidja, Djazia, Soraya, Lila et Sabrina

Mes chers amis : Nawel, Samra, Narima, Kanza, Mouna, Meriem et Fatima

A toute la famille SLIMANI et BOUCHE

A la promotion Biochimie Appliquée 2014

Et à tous ceux qui me sont chers

Et Enfin, à celui avec qui j'ai partagé ce travail Khadidja et toute sa famille.

Naziha

La liste des abréviations

g : gramme

l : litre

Na⁺ : Hydroxyle de sodium

% : Pourcentage

M : Molaire

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

K⁺ : Potassium

KCl : Chlorure de potassium

Cl⁻ : Chlorure

KDa : Kilo daltons

°C : Degré Celsius

min : minute

ABC : ATP-Binding cassette

Na⁺ : Sodium

H⁺ : Hydrogène

Kb : Kilo bases

Pb : Paires de bases

UA : Unités arbitraires

TCA : Acide trichloro-acétique

pH : Potentiel d'hydrogène

rpm : Tours par minute

h : heures

DO : Densité optique

nm : nanomètre

mg : milligramme

ml : millilitre

μ l : microlitre

μ g : microgramme

Hcl : Acide chlorhydrique

Na OH :Hydroxyde de sodium

BSA : L'albumine sérum bovin

ACN : Acétonitrile

mM : milli molaire

pM : Poids moléculaire

mm : millimètre

ZI : Zone d'inhibition

sec : seconde

Liste des figures

Numéro	Description	Page
1	Protocole d'extraction des protéines	17
2	protocole d'ajustement du surnageant actif à différents pH	20
3	Cuve et accessoires du dispositif d'électrophorèse (Mini Protean II, Bio Rad)	21
4	Corrélation entre la concentration de BSA et DO ₅₉₅	24
5	Activité antibiotique des extraits protéiques	25
6	Corrélation entre l'inverse du facteur de dilution et les zones d'inhibitions	26
7	Effet des solvants organiques sur l'activité des extraits protéiques	27
8	Activité des extraits protéiques après traitement à la chaleur	28
9	Effet du pH sur l'activité antibiotique	29
10	Activité des surnageants à différents pH sur la souche cible (DSM)	29
11	Activité des extraits protéiques à différentes concentrations de sels	30
12	SDS-PAGE (Profil électrophorétique de l'halocine)	31

Liste des tableaux

Numéro	Description	Page
I	Classification des bactériocines produits par les bactéries a Gram positif	8
II	Caractéristiques des bactériocines de bactéries à Gram positif	9
III	Caractéristiques des différents types d'halocines	13
IV	Gamme de concentration de BSA utilisée	19
V	Activité inhibitrice et spectre UV des extraits à l'acide phosphorique et au TCA	23
VI	Activités et quantités de protéines dans différents extraits à l'acide phosphorique	24
VII	Activité antibiotique dans les différentes dilutions de l'extrait protéique	25
VIII	Effet de quelques solvants organiques sur l'activité antibiotique des extraits protéiques	26
IX	Effet de la température sur l'activité des extraits protéiques.	27
X	Effet de sel sur l'extrait protéique	30
XI	Les activités des échantillons utilisés dans le profil électrophorétique	31

Sommaire

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	1
Chapitre I : les archées halophiles extrêmes	2
I. Les archaea halophiles.....	2
1. caractéristiques.....	2
2. Classification.....	3
3. Protéines halophiles.....	3
4. Le mode d'adaptation.....	4
II. L'intérêt des Haloarchaea.....	4
Chapitre II : les bactériocines	6
I. Définition.....	6
II. Caractéristiques et classification des bactériocines	6
1. Bactériocines des bactéries à Gram négatif.....	6
1.1. Colicines.....	6
1.2. Microcines.....	7
2. Bactériocines des bactéries à Gram positif.....	7
III. Biosynthèse des bactériocines.....	10
IV. Mode d'action des bactériocines.....	10
V. Intérêt et applications des bactériocines.....	11
Chapitre III : les halocines	12
I. Définition.....	12
II. Caractéristiques générales.....	12
III. caractéristiques des Différents types d'halocines.....	12
IV. Biosynthèse des halocines.....	14
V. Mode d'action.....	15
Chapitre IV : Matériel et méthodes	16

I. Matériel.....	16
1. Matériel biologique.....	16
1.1. La souche productrice d'halocine.....	16
1.2. Le germe cible.....	16
2. Les tampons.....	16
3. Appareillage.....	16
II. Méthodes.....	17
II.1. Extraction des protéines globales.....	17
1. Technique d'extraction à l'acide trichloro-acétique (TCA).....	17
2. Technique d'extraction à l'acide phosphorique.....	18
II.2. Détermination de l'activité antibiotique dans les extraits protéiques.....	18
1. Détermination du titre de la solution.....	18
II.3. Dosage des protéines dans les extraits actifs.....	19
1. Dosage spectrophotométrique.....	19
2. Dosage colorimétrique.....	19
II.4. Caractéristiques physico-chimiques de l'extrait protéique actif.....	19
1. Effet des solvants organiques.....	19
2. Effet de la Température.....	20
3. Effet du pH.....	20
4. Effet de la salinité.....	21
II.5. SDS-PAGE.....	21
1. Préparation des gels.....	21
2. Préparation et dépôt des échantillons.....	22
Chapitre V : Résultat et discussion.....	23
I. Extraction des protéines globales.....	23
1. Détermination du titre d'un extrait actif.....	25
II. Caractéristiques physico-chimique de l'extrait actif.....	26
1. Effet des solvants organiques.....	26
2. Effet de la Température.....	27

3. Effet du pH.....	28
4. Effet de la salinité sur l'activité antibiotique.....	29
III. Profil électrophorèse des extraits protéiques.....	30
Conclusion.....	32
Références bibliographiques.....	33
Annexes	

Introduction

Introduction

Les environnements hypersalins d'origine naturelle ou anthropique sont nombreux sur notre planète. Ces environnements hostiles à la vie sont néanmoins colonisés par des nombreux microorganismes ayant développés des mécanismes d'adaptation spécifiques (**Grenier et al., 2004**). Ils sont principalement habités par les archées halophiles extrêmes ou *Haloarchaea* (**Oren, 2002**). Ces dernières présentent un intérêt considérable dans la production de macromolécules, des enzymes etc... (**Litchfield, 2011**).

Les premières bactériocines ont été découvertes pour la première fois, par *Gracia* en 1925 chez des espèces d'*Escherichia coli*, elles ont été appelées Colicine, par la suite d'autres substances analogues au colicines ont été isolées chez d'autres membres du domaine *Bactéria* d'où l'appellation bactériocine (**Carine et al., 2008**).

Les halocines sont des substances semblables aux bactériocines, elles sont produites par quelques archées halophiles extrêmes (**O'connor et Shand., 2002**). Elles varient considérablement dans la taille et les propriétés physico-chimiques, Actuellement, très peu d'halocines sont connues, elles constituent donc une source pour la recherche de nouvelles molécules. En effet, ces substances semblent avoir d'éventuelles applications dans divers domaines comme agents conservateurs des produits alimentaires en industrie agro-alimentaire, ou comme agents thérapeutique, en industrie pharmaceutique.

Ce travail a pour objectif principal la caractérisation d'une substance antibiotique, de type halocine produite par une archée halophile locale (S1).

Dans la partie synthèse bibliographique, nous avons fait un rappel sur les *archaea* halophiles, les bactériocines en général et les halocines en particulier. Dans la partie pratique les effets de certains facteurs physico- chimiques tels que le pH, la température et les solvants organiques sur la stabilité de la substance active a été abordé.

Partie
bibliographique

Chapitre I :
Les archées halophiles
extrêmes

I. Les archaea halophiles

Archaea halophiles ou « salt-loving » sont des organismes vivants dans les milieux hypersalins. Ce sont des procaryotes résistants à la pression osmotique ainsi qu'à l'effet dénaturant du sel.

Les archaea halophiles se développent à des concentrations élevées en sel, allant jusqu'à 5,2M (300g/l) de NaCl qui est le seuil de saturation. Ils se retrouvent dans des environnements naturels tels le grand lac d'Utah (Californie), la mer morte (Jordanie), les étangs et les bassins de cristallisation et même dans les aliments comme les poissons et les viandes et salés séchés (**DasSarma et al., 2010 ; Oren, 2006**).

1. Caractéristiques

Les archaea halophiles ou *Haloarchaea* sont généralement à Gram négatifs, de forme cocci, bâtonnet ou le plus souvent pléomorphes (**Litchfield, 2011**). Ils présentent au niveau de leur membrane des pigments caroténoïdes qui les protègent contre l'intense irradiation solaire (**Werber, 1980**). Les ribosomes sont sel dépendants, se détériorent à faible salinité par contre l'ADN reste stable dans ces conditions. La sous-unité 70S requiert en plus du magnésium (0,1 M) du potassium à 3 ou 4M pour sa stabilité (**Werber, 1980**).

Les composants principaux des *Haloarchaea* lipides, protéines, enveloppe cellulaire, ribosomes ont des caractéristiques spécifiques :

- Les protéines ont une structure tridimensionnelle, elles se caractérisent par l'abondance de résidus acides distribués sur leur surface et contribuent essentiellement à la stabilité et à l'adaptation de ces protéines aux concentrations élevées de sel (**Enache et Kamekura, 2010**) ;
- La majorité des lipides sont polaires (90%). Ils sont des dérivés de di-O-alkyl-glycérol et en plus des phospholipides ils contiennent des glycolipides sulfatés (25%). Les lipides neutres (1% des lipides) sont presque entièrement des dérivés isoprénoides (C20, C30, C40 et C50) (**Werber, 1980**) ;

- L'enveloppe cellulaire est dépourvue de la couche peptidoglycane rigide mais possède une couche cellulaire externe de nature glycoprotéique dite S-layer. Cette enveloppe forme une matrice structurale à la surface et maintient la forme des cellules (**Werber, 1980**).

2. Classification

Les haloarchées sont classées dans le domaine *Archaea*, le règne *Euryarcheotae* et dans l'ordre *Halobacteriale*. Ils forment une seule famille appelée *Halobacteriaceae* et est répartie en 27 genres et 96 espèces (**Oren et al., 2009**).

3. Protéines halophiles

Les protéines halophiles nécessitent des concentrations élevées en sel pour leur intégrité structurale et leur viabilité. Certaines de ces protéines sont beaucoup plus actives en présence du KCl que de NaCl (**Oren, 2002**). La plupart des protéines halophiles se dénaturent lorsque la concentration en sel diminue, alors que des concentrations de sel élevées modifient normalement la stabilité et la solubilité des protéines non- halophiles. Par conséquent, pour rester stable et soluble dans des conditions salines saturées, les protéines halophiles doivent avoir développé des mécanismes adaptatifs. La principale caractéristique des enzymes solubles halophiles est leur teneur élevée en résidus acides. L'étude Structurale de trois protéines halophiles montre que les résidus acides (jusqu'à 20% de tous les résidus) sont répartis à la surface de la protéine (**Franzetti et al., 2001**), comme le glutamate et l'aspartate (**Oren, 2002**) et possèdent un nombre élevé de chaînes latérales polaires (**Nayek et al., 2014**).

Les enzymes halophiles se dénaturent rapidement et se dissocient à des concentrations de NaCl /KCl au-dessous de 1M et cette dénaturation peut être irréversible. Les enzymes des archaea halophiles constituent d'importants biocatalyseurs dans des milieux aqueux/organiques et non aqueux (**Marhuenda-Egea et al., 2002**).

L'excès des charges négatives sur la surface de protéine rend la structure instable en raison de la répulsion mutuelle des groupes latéraux. Mais les concentrations élevées de cations les protègent (**Oren, 2002**).

Les molécules d'eau liée à la surface des protéines halophiles ont 40% de liaisons hydrogène supplémentaires que dans une structure cristalline des protéines non-halophiles. Ces molécules d'eau sont étroitement liées à la coquille d'hydratation par la présence de liaisons protéine-eau et liaisons hydrogène eau-eau. Ces liaisons fournissent les groupes hydratés de carboxylate qui maintiennent la solubilité de la protéine en présence des concentrations élevées en sel (**Oren,2002**).

La synthèse des protéines chez les Archaea halophiles dépend strictement des concentrations élevées en sel (**Oren, 2002**).

La surface des protéines halophiles est caractérisée par une diminution des résidus non polaires et une augmentation des résidus chargés (**Graziano et Merlino, 2014**).

4. Le mode d'adaptation

Les Archaea halophiles accumulent K^+ à l'intérieur de leurs cellules pour l'osmorégulation, nécessitant une adaptation des protéines extracellulaires et intracellulaires pour le maintien de leur activité et leur stabilité à 4M de KCl et 5M de NaCl, respectivement (**Oren, 2006**). La stabilisation électrostatique a été suggérée comme cause principale pour l'adaptation des protéines halophiles au sel (**Nayek et al., 2014**).

II. L'intérêt des *Haloarchaea*

- L'une des propriétés qui a attiré l'attention sur les microorganismes halophiles est la présence de bactériorhodopsines. Ce pigment, responsable de l'apparence pourpre de la membrane est à la base du système de photophosphorylation de ces bactéries. L'énergie chimio-osmotique qui est produite quand ce pigment absorbe la lumière peut être employée pour activer plusieurs processus biochimiques (**Werber, 1980**) ;
- Les utilisations possibles dans des divers secteurs tels que le traitement des eaux résiduaires, l'agriculture, les bioplastics (poly- β -hydroxyalcanoate) (**Litchfield, 2011**) ;
- Sont souvent considérés comme source fiable pour produire de nouvelles enzymes, de nouveaux gènes, composés bioactifs et d'autres molécules importantes pour l'industrie alimentaire, du cuir et de contrôle des bactéries infectieuses (**Karthikeyan et al., 2013**) ;

- Applications potentielles dans des processus biotechnologiques nécessitant la dégradation de macromolécules en présence de concentrations élevées de sel (**Oren, 2006**) ;
- Endonucléases d'archées halophiles spécifiques au *Archaea* peuvent être utilisées dans la recherche en biologie moléculaire (**Oren, 2006**) ;
- La production de certains produits alimentaires salés, fermentés ou conservés (la sauce soja et la sauce de poisson), sont souvent faits à l'échelle artisanale (**DasSarma et al., 2010 ; Oren, 2011 ; Birbir et al., 2005**).

Chapitre II :

Les bactériocines

I. Définition

Les bactériocines sont des peptides ou des protéines naturellement synthétisées par voie ribosomale, produites par un grand nombre de bactéries. Elles sont actives généralement contre des espèces phylogénétiquement proches. La première bactériocine identifiée est produite par *Escherichia coli*, elle est appelée colicine (**Zacharof et al., 2012 ; Balciunas et al., 2013 ; Ghanbari et al., 2013**).

II. Caractéristiques et Classification des bactériocines

Les bactériocines sont des substances extracellulaires produites par différents types de bactéries. Elles sont nommées en fonction de l'espèce qui les produit. Beaucoup ont été étudiés en détails chez des espèces à Gram positif et à Gram négatif (**Daw et Falkiner, 1996 ; Birbir et al., 2005**).

1. Bactériocines des bactéries à Gram négatif

Les bactériocines des bactéries à Gram négatif sont principalement produites par la famille des *Enterobacteriaceae*. Elles s'assemblent en deux grandes familles: colicines et microcines. Elles sont classées selon leurs masses moléculaires, leurs fonctionnalités et leurs propriétés chimiques et biologiques.

1.1. Colicines

Ce sont les bactériocines les plus étudiées, produites par beaucoup de souches d'*Escherichia coli* dans les périodes de stress. Ce sont des protéines bactéricides. Elles ont une masse moléculaire élevée (30-80 kDa). Leur production est contrôlée par un opéron qui contient trois gènes ; un gène codant pour la colicine, un gène de structure codant pour la protéine d'immunité qui se situe en amont du gène de la colicine et un gène codant pour la protéine de lyse qui permet la libération de la colicine dans le milieu extérieur (**Rebuffat, 2011**).

1.2. Microcines

Ce sont des peptides antibiotiques de petite taille (<20 kDa). Dans la majorité des cas ces peptides subissent des modifications post-traductionnelles (**O'connor et Shand, 2002 ; Hal, 2003**).

Les microcines possèdent quelques caractéristiques :

- peptides hydrophobes stables, de faible masse moléculaire ;
- Résistantes à quelques protéases ;
- Sont codées par des familles de gènes portés par des plasmides ou dans certaines cas par le chromosome ;
- Agissent sur la synthèse des protéines en bloquant la phase de traduction.

Les microcines se divisent en trois catégories en fonction de leur mode d'action :

- **Microcines classe A** : inhibent les enzymes métaboliques ;
- **Microcines classe B** : inhibent la réplication de l'ADN ;
- **Microcines classe D** : interfèrent avec la production d'énergie.

2- Bactériocines des bactéries à Gram positif

Les bactériocines de bactéries à Gram positif sont généralement classées selon leurs tailles, leurs structures et les modifications qu'elles subissent. Ce sont des protéines de faible poids moléculaire, résistantes à la chaleur et les gènes codant sont généralement portés par des plasmides (**El-Shouny et al., 2013**). Selon Klaenhammer (1993), elles sont divisées en quatre classes (**Tableau I**).

Tableau I : Classification des bactériocines produits par les bactéries à Gram positif (Balciunas et al., 2013 ;Zacharof et al., 2012).

Classe	Sous-classe	Bactériocines
Classe I : Lantibiotiques	Type A : masse moléculaire de 2 à 4 kDa ; Type B : globulaires, masse moléculaire de 2 et 3 kDa.	Nisine(nisine A et nisine Z)
Classe II : non-lantibiotiques	Classe IIa : bactériocines des espèces du genre <i>Listeria</i> ; Classe IIb : hétérodimères ; Classe IIc : bactériocines activées par des thiols.	Pédiocine PA-1 Lactocine G Lactocine B Entérocin AS-48 Circularine A
Classe III : bactériocines poids moléculaire (>30 kDa)	-----	Helveticine J
Classe IV : gros peptides complexes, avec parties glucidiques ou lipidiques	-----	-----

Le tableau II montre quelques caractéristiques des bactériocines produites par les bactéries à Gram positif.

Tableau II : Caractéristiques des bactériocines des bactéries à Gram positif.

Classe	Caractéristiques	Références
Classe I	-Peptides de très faible poids moléculaire (<5 kDa), contiennent entre 19 et 38 acides aminés ; - Thermostables, présence de lanthionine et dérivés.	Balciunas et al., 2013
Type I	- Chargées positivement, et sont des molécules flexibles ; - masse moléculaire de 2 à 4 kDa ; - Agissent sur la membrane cytoplasmique et provoquent sa dépolarisation.	Zacharof et al.,2012
Type II	- Chargées négativement ; - masse moléculaire de 2 à 3 kDa.	
Classe II	- Petits peptides (<10 kDa), thermostables ; - Structure hélicoïdale amphiphile qui permet leur insertion dans la membrane cytoplasmique de la cellule cible.	Balciunas et al., 2013
Classe IIa	- Composés de 44 résidus d'acides aminés - Thermostables (121° C/15 min) ; - Résistants à la lyophilisation et la conservation à 20° C pendant de longues périodes ; - Spécificité élevée contre <i>Listeria monocytogenes</i> .	
Classe IIb	- Hétérodimères - Leur activité exige la combinaison de deux peptides ; - Contiennent de 25 à 62 acides aminés.	O'connor et Shand,2002
Classe IIc	- structurellement et fonctionnellement hétérogène.	
Classe III	- Poids moléculaire élevé (> 30 kDa) ; - Thermolabiles ; - Activité et structure protéique complexe.	Balciunas et al., 2013 Zacharof et al.,2012

III. Biosynthèse des bactériocines

Les bactériocines sont principalement synthétisées sous forme de pré-peptides inactifs, contenant un N-terminal leader. Les pré-peptides sont ensuite modifiés par d'autres protéines ou d'acides aminés codés par le gène de la bactériocine elle-même. Les gènes codants pour la production de bactériocine et l'immunité sont généralement organisés en opérons et se localisent le plus souvent sur des éléments mobiles (transposons), le chromosome ou les plasmides.

Les bactéries se protègent contre l'effet toxique de leur propre bactériocine par la production de protéines d'immunité spécifiques. Souvent, les gènes structuraux des bactériocines et le gène de l'immunité sont situés sur le même opéron. Le système immunitaire fait appel à l'intervention des ABC (ATP-Binding Cassette) qui sont des transporteurs protéiques localisés au niveau de la membrane cytoplasmique des cellules productrices et qui agissent en excréant vers l'extérieur les bactériocines (**Zacharof et al., 2012**).

IV. Mode d'action des bactériocines

Les bactériocines de bactéries à Gram positif agissent en se liant spécifiquement à des récepteurs sur la surface des cellules cibles et causent des altérations et des perturbations comme dans le cas de la membrane cytoplasmique, ou en jouant le rôle des enzymes et digérant des molécules cellulaires comme l'ARN et l'ADN (RNase et DNase respectivement) (**El-Shouny et al., 2013**).

Les bactériocines agissent sur la membrane cellulaire par interférence avec la synthèse de la paroi cellulaire et par l'induction de la formation des pores dans la membrane cellulaire. Les changements résultant est le dérèglement de la perméabilité cellulaire et donc une sortie des éléments cellulaires, suivie par une lyse et mort cellulaire (**Balciunas et al., 2013 ; Liu et al., 2013**).

Chez les bactéries Gram négatives, le contact des bactériocines se fait en premier avec la membrane externe par leur moitié N-terminale cationique et forme une structure en forme de feuille à la surface, l'extrémité C-terminale de forme hélicoïdale et hydrophobe pénètre dans le cœur hydrophobe de la membrane des cellules cibles (**Yusuf, 2013**).

V. Intérêt et applications des bactériocines

Les bactériocines sont souvent utilisées dans le domaine agroalimentaire (**Daw et Falkiner, 1996**). La nisine est l'une des bactériocines les plus utilisées dans l'industrie alimentaire comme agent antibotulinique dans les fromages, les sauces et les conserves (**Balciunas et al., 2013 ; Ghanbari et al., 2013**). L'application de bactériocines comme bio-conservateurs a commencé il y a environ 25 ans. C'est une bonne alternative aux composés chimiques et antibiotiques (**Zacharof et al., 2013**).

Les bactériocines ont aussi des applications intéressantes dans le domaine médical comme l'amélioration de l'absorption des médicaments et des vitamines et vétérinaire comme probiotiques administrés dans l'alimentation (**Yusuf, 2013**).

Chapitre III :

Les halocines

I. Définition

Les halocines sont des antibiotiques de nature protéiques, synthétisés par voie ribosomale par les Haloarchaea, elles sont libérées dans l'environnement pour tuer ou inhiber d'autres haloarchées de même ou différente niche écologique (**Montville et al., 1994 ; Birbir et al., 2005**). Elles ont été découvertes pour la première fois en 1982 (**Shuang et al., 2008**).

II. Caractéristiques générales

Les halocines présentent des différences structurales et biochimiques mais incluent un certain nombre de caractéristiques communes :

- Elles sont libérées dans le milieu extérieur (**Hal, 2003**) ;
- L'activité des halocine est détectée dans la plupart des cas à la fin de la phase exponentielle et le début de la phase stationnaire (**O'connor et Shand, 2002**) ;
- Les gènes codant les halocines sont localisés sur des mégaplasmides (**O'connor et Shand, 2002**).

III. Caractéristiques des différents types d'halocines

La production d'halocines est une caractéristique universelle des *Haloarchaea* (**Birbir et al., 2005 ; Hal, 2003**). Actuellement, il y a 11 différents halocines étudiées dont 07 caractérisées. Les halocines sont subdivisées en deux classes selon leurs spectres d'activité et leur poids moléculaire : les microhalocines (<10KDa) et les halocines (>10KDa) (tableau III) (**O'connor et Shand., 2002**).

Tableau III : Caractéristiques des différents types d'halocines

Classe	Halocine	Caractères	Références
Halocine	H4	<ul style="list-style-type: none"> - Produite par <i>Haloferax mediterranei</i> R4 (ATCC 33500) ; - La première protéine halophile antimicrobienne découverte ; - thermosensible ; - Le gène situé sur le mégaplasme ; - Inhibe la croissance de <i>Halobacterium salinarum</i> ; - Elle se conserve entre 115 à 159 jour à 4°C ; - Masse moléculaire : 34,9 kDa (mature), 39,6 kDa (pré-protéine) ; - Sensible aux protéases ; - Sel dépendante (elle perd son activité à une concentration < 5% d'Na Cl). 	<p>Naor et al., 2013</p> <p>O'connor et Shand, 2002</p>
	H1	<ul style="list-style-type: none"> - Produite par <i>Haloferax mediterranei</i> Xia3 - Protéine de 31 kDa ; - Thermostable ; - Sel dépendante ; - large spectre d'activité ; - Activité détecté au milieu la phase exponentielle ; 	O'connor et Shand, 2002
Microhalocine	S8	<ul style="list-style-type: none"> - Première microhalocine ; - Produite par la souche d'haloarchaea S8a, isolée du Great Salt Lake Utha ; - Poids moléculaire : 3,58 kDa ; - Spectre d'activité étroit ; - Résistante au dessalage ; - Thermorésistante ; - résistante aux solvants organiques et reste inchangé après stockage à 4°C pendant plusieurs mois ; - Résistante à la trypsine, mais sensible à la protéinase K ; - Hydrophobe à 47 % ; 	<p>Karthikeyan et al., 2013</p> <p>O'connor et Shand, 2002</p>
		<ul style="list-style-type: none"> - Produite par <i>Halobacterium salinarum</i> GN101 ; - Résistante au dessalage, aux acides, aux bases et aux solvants organiques - Résistante aux enzymes :DNase, RNase, 	O'connor et Shand, 2002

	R1	<ul style="list-style-type: none"> aux protéases ; - Sensible protéinase K ; - 38 acides aminés ; - Résistance à la chaleur ; - Non cationique. 	
	C8	<ul style="list-style-type: none"> - Un peptide de 207 acides aminés dérivé de la N -terminale de la pré-pro-protéine ; - Extrêmement stable avec un large spectre d'inhibition ; - elle est limitée du cote C-terminal par un peptide de 283 acides aminés appelé proC8et du coté N-terminal par un autre peptide conférant la séquence Tat suivie par 76 acides aminés conférant à la molécule un pouvoir immunitaire. 	Shuang et al., 2008
	H6/H7	<ul style="list-style-type: none"> -Produite par <i>Haloferax gibbonsii</i> Ma2.39 ; - inhibiteur de l'antiport Na⁺/H⁺ des Haloarchaea et des cellules cardiaques des mammifères ; - Produite au début de la phase stationnaire ; - Résistante à la trypsine et sensible à la pronase ; -Résistante à la chaleur et au dessalage ; - Protéine de 32 kDa ; 	Birbir et al., 2005 Karthikeyan et al., 2013 O'connor et Shand, 2002 Lequerica et al.,2006
	A4	<ul style="list-style-type: none"> -Isolée d'une souche TuA4 -Poids moléculaire<5 KDa -sel indépendante 	O'connor et Shand, 2002

IV. Biosynthèse des halocines

Les halocines sont synthétisées à l'intérieure de la cellule mais le mécanisme exact de synthèse n'est pas encore décrit. Elles sont exportées à l'extérieur par la voie de Tat arginine translocation (**Shuang et al., 2008**).

Plusieurs halocines ont été purifiées et caractérisées. Néanmoins, les gènes codant ne sont déterminés et clonés que pour trois d'entre elles : halH4, halS8 et HalC8 pour les halocines H4, S8 et C8 respectivement.

- **H4** : Le gène halH4 est situé sur un mégaplasmide de 320 kb, il est de 1077 pb et code pour 359 acides aminés. Au cours du processus de maturation, 46 acides aminés sont absents dans la protéine finale secrétée (**Naor et al., 2013 ; O'connor et Shand,2002**). La région N-terminale de la protéine est neutre, elle est constituée de 18 résidus d'acides aminés, la région C-terminale de 14 résidus d'acide aminée est polaire. Le taux de transcription du gène halH4 au début de la phase stationnaire est sept fois plus élevé que dans la phase exponentielle (**Cheung et al., 1997**).
- **S8** : Le gène halS8 est constitué de 933pb et code une pré-protéine de 311 acides aminés. La partie N-terminale de la protéine est de 230 acides aminés, alors que la partie C-terminale est de 45 acides aminés. Le promoteur du halS8 (5'-ATTTAT-3') se trouve à partir de -24 à -29 pb en amont du site d'initiation de la transcription et contient un facteur de transcription B, élément de reconnaissance en amont du promoteur à -34 et -35 (**O'connor et Shand, 2002**).
- **C8** : L'halocine C8 est synthétisée sous une forme immature non fonctionnelle dite pré-pro-protéine. Le gène de la pré-pro-halC8 code pour une protéine de 283 acides aminés, qui est transformé en deux peptides fonctionnels, un peptide antibiotique HalC8 de 76 acide aminés C-terminal et la protéine d'immunité N-terminal Hali qui est un peptide de 207 acides aminés localisé au niveau de la membrane cellulaire et permet à la cellule productrice de l'halocine de résister à son effet (auto-immunité) (**Shuang et al., 2008 ; Sun et al.,2005**).

V- Mode d'action

La cible des halocines est l'enveloppe cellulaire mais le mécanisme d'action exact n'est connu que pour l'halocine H6 qui inhibe les cellules d'haloarchaea et des mammifères en agissant sur la pompe Na⁺/K⁺. L'exposition des cellules sensibles à l'halocine H6 provoque une augmentions du volume cellulaire suivi d'une lyse (**O'connor et Shand,2002**).

Matériel et Méthodes

I. Matériel

1- Matériel biologique

1.1. La souche productrice d'halocine

La souche utilisée fait partie de la collection du laboratoire de Génie biologique. Il s'agit d'une souche d'archée halophile extrême (S1) isolée de la Sebkhia Ouargla, elle est caractérisée par son activité antagoniste de nature protéique.

1.2. Le germe cible

Halobacterium salinarum connue pour sa sensibilité à la plupart des halocines a été utilisée pour déterminer l'activité antibiotique produite par la souche S1. Des boîtes de Petri contenant la de référence DSM3754 ont été préparées par nos camarades microbiologistes du laboratoire de Génie Microbiologique.

2. Les tampons

La solution saline, tris-Hcl, tris 3M, réactif Bradford, tampon pour SDS-PAGE et les autres réactifs, sont donnée en **annexe I**.

3. Appareillage

Les appareils utilisés sont présentés dans **l'annexe II**.

II. Méthodes

II.1. Extraction des protéines globales

La méthode d'extraction utilisée est basée sur la précipitation des protéines en milieu acide et à froid.

1. Technique d'extraction à l'acide trichloro-acétique (TCA) (Meyrand et al., 2000)

10 ml de la culture de la souche S1 ont été centrifugées et le TCA (3M) a été ajouté au surnageant goutte à goutte pour avoir un pH de 2, malheureusement le pH obtenu s'est fixé à 3,15 après avoir ajouté 5ml de TCA(3M). Le surnageant ainsi préparé a été incubé à 4°C pendant 1h (figure 01).

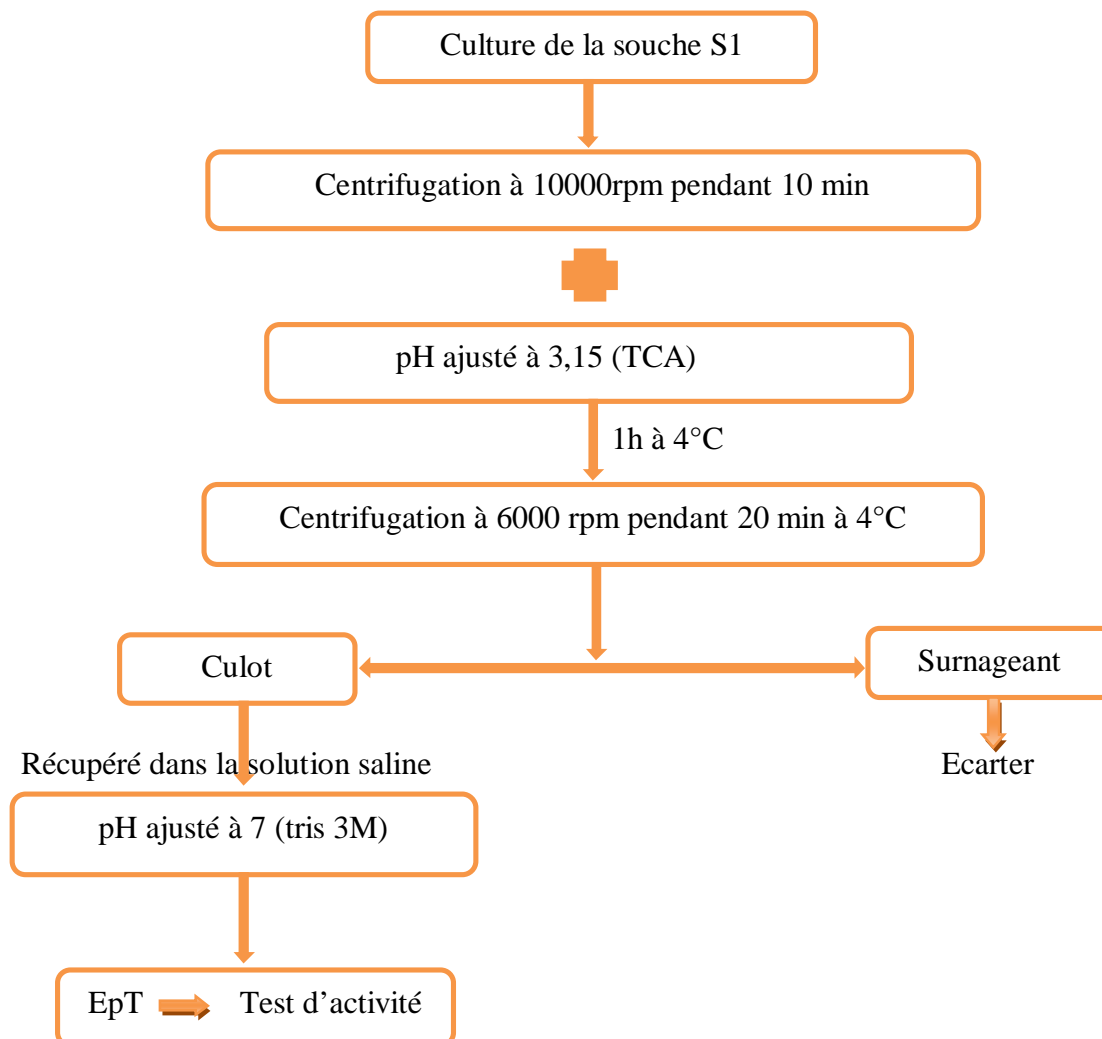


Figure 01 : Protocole d'extraction des protéines (Meyrand et al., 2000).

2. Technique d'extraction à l'acide phosphorique

Les mêmes étapes que précédemment ont été suivies, mais le TCA a été remplacé par l'acide phosphorique. Le surnageant actif (10 ml) a été ajusté à pH 2 en ajoutant 1ml d'acide phosphorique à 5% (Yang et al., 1992). L'extrait protéique (EpA) obtenu est testé pour son activité antibiotique.

II.2. Détermination de l'activité antibiotique dans les extraits protéiques

5µl d'extrait protéique ont été déposés sur des boîtes de Petri contenant le germe cible. Après séchage, les boîtes ont été mises dans des sacs en plastique pour éviter l'évaporation puis incubées à 40°C jusqu'au développement du germe cible. L'activité antibiotique se traduit par une zone d'inhibition autour du dépôt, elle est mesurée en millimètre (mm),

1. Détermination du titre de la solution

Afin de déterminer le titre de l'extrait actif, une série de dilutions (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64) de l'extrait protéique dans la solution saline stérile a été effectuée. L'activité antibiotique a été déterminée dans 5 µl de chaque dilution. La première dilution dans laquelle aucune zone n'apparaît est la dilution d'extinction et le titre de la solution est calculé selon la formule suivante (Shand, 2006) :

$$\text{Titre (UA/ml)} = \frac{\text{Inverse de dilution} \times 1000}{5 \mu\text{l de l'extrait actif}}$$

II.3. Dosage des protéines dans les extraits actifs

1. Dosage spectrophotométrique

La densité optique (DO) des extraits protéiques a été mesurée entre 200 et 300 nm.

2. Dosage colorimétrique

La quantité de protéine dans les extraits actifs a été estimée par la méthode de Bradford (1976). A partir d'une solution mère de BSA à 1mg/ml, différentes dilutions dans la solution saline ont été réalisées selon le tableau IV (Shand, 2003).

Tableau IV : Gamme de concentration de BSA utilisée.

Solution de stock	Quantité de diluant	Concentration BSA finale
1ml	0	1 mg/ml
750µl	250µl	750µg /ml
500µl	500µl	500µg /ml
250µl	750µl	250µg /ml

5ml de réactif de Bradford ont été mélangé à 100µL de solution de BSA, après 5 min l'absorbance est mesurée à 595nm. Une corrélation entre la quantité de BSA et l'absorbance à 595 nm a été réalisée.

Pour déterminer la concentration de protéine dans les échantillons, 5ml du réactif de Bradford ont été ajouté à 100µL d'extrait protéique, après 5 minutes l'absorbance est mesurée à 595 nm. Les concentrations des protéines sont calculées en se référant à la courbe d'étalonnage.

II.4. Effets de quelques paramètres physico-chimiques sur l'extrait actif

1. Effet de solvants organiques et détergents anioniques

L'extrait actif a été traité avec des volumes égaux de solvants organiques et le détergeant non ionique : Méthanol, Ethanol, Acétonitrile (ACN), Isopropanol, Tween 20, Tween 80, Acétone. Après incubation à température ambiante pendant 1heure, l'activité résiduelle a été déterminée dans les mélanges.

2. Effet de la Température

La thermostabilité de l'extrait actif a été appréciée par traitement à 60°C et 80°C pendant 1 heure, 100°C pendant 10, 30, 60 minutes et à 120°C pendant 20 minutes. Après chaque traitement l'activité résiduelle a été déterminée.

3. Effet du pH

Le surnageant actif de la souche S1 réparti en quantités égales (2 ml par tube), a été ajustées à différents pH. Après incubation à 40°C pendant 1 heure, l'activité antibiotique a été déterminée (**figure 02**).

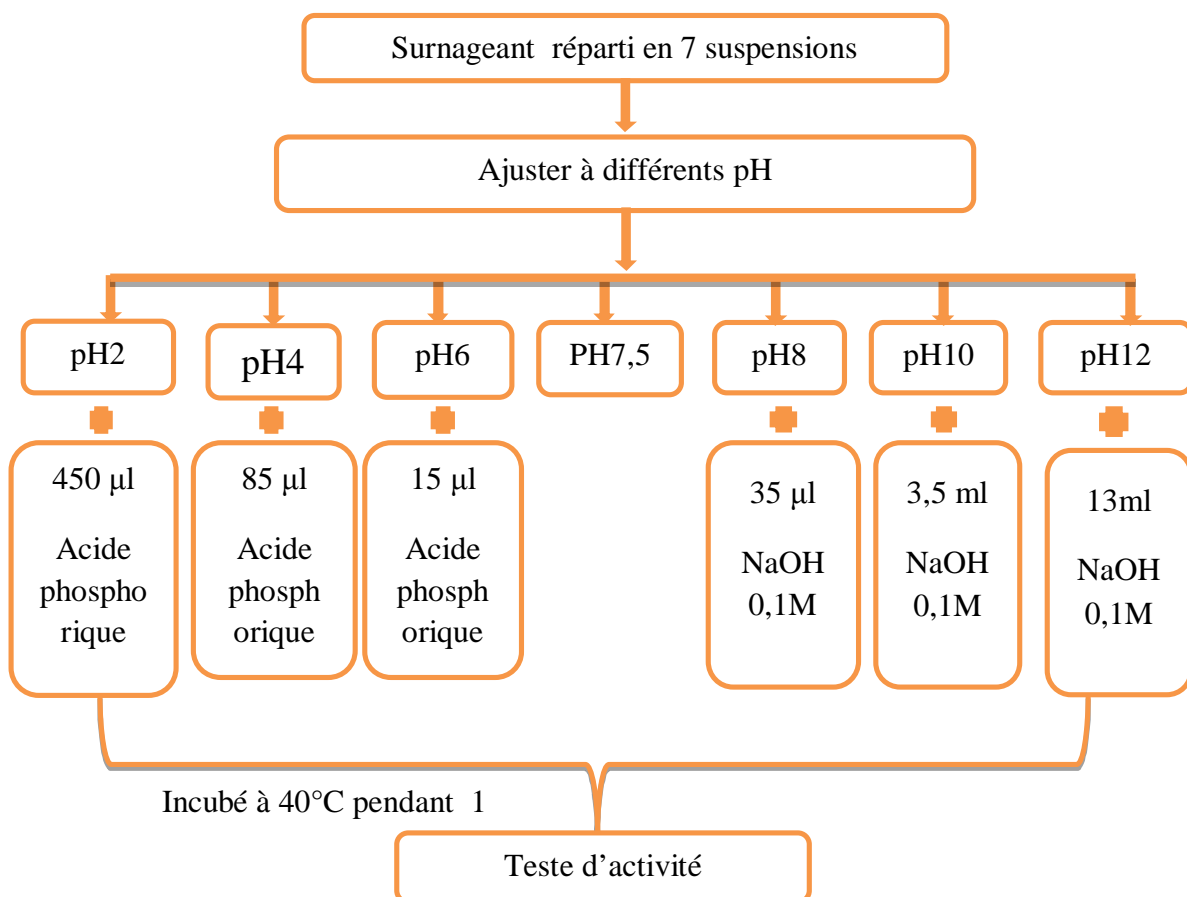


Figure 02 : protocole d'ajustement du surnageant actif à différents pH.

4. Effet de la salinité

Afin de déterminer l'effet du sel sur l'extrait actif, une préparation des solutions salines à 75%, 50%, 25% et 0% de NaCl sont réalisées. 100 μ l de l'extrait actif sont ajoutés à chaque solution dans des eppendorffs. Les mélanges ont été testés pour leur activité résiduelle.

II.5. SDS-PAGE

Dans le but de voir le profil des protéines des extraits actifs, nous avons choisi la technique SDS-PAGE de **Laemmli (1970)**. Le dispositif d'électrophorèse (Mini Protean II BIO RAD) (**figure03**) utilisé est conçu pour les mini gels, il s'agit d'une cuve et d'une panoplie d'accessoires (peigne, spacer et des plaques en verre).

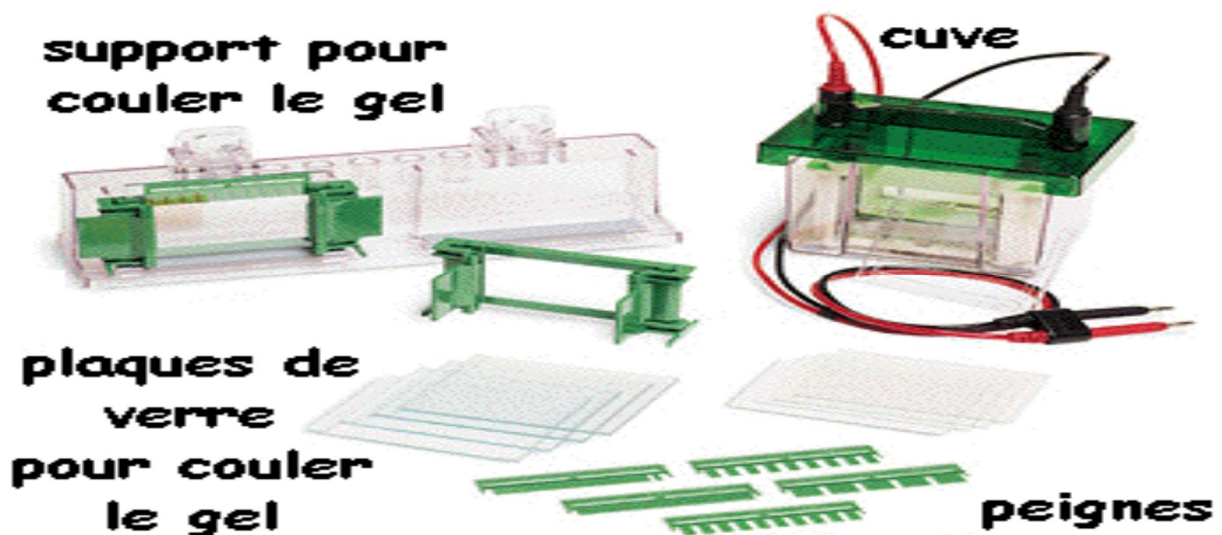


Figure 03: Cuve et accessoires du dispositif d'électrophorèse (Mini Protean II, Bio Rad).

1. Préparation des gels

Le gel de séparation utilisé est à 12% d'acrylamide (**Annexe I**), il contient 0,1% (m/v) de xylane de bouleau. La réaction de polymérisation est initiée par addition de 70 μ l de persulfate d'ammonium à 10% puis accélérée par ajout de 20 μ l de TEMED. Le mélange est versé entre deux plaques en verre séparées avec des spaceurs de 1mm.

Le gel de séparation doit occuper les deux tiers de la plaque. 1ml d'un mélange éthanol-eau 50% (v/v) a été d'abord versé pour vérifier l'étanchéité du dispositif puis le gel de séparation. Après polymérisation le gel a été rincé à l'éthanol-eau et le gel de concentration à 7,5% d'acrylamide a été coulé au-dessus du gel de séparation et un peigne à être immédiatement inséré. Au moment de l'emploi, le peigne a été retiré et les puits sont lavés avec un tampon d'électrophorèse (**Annexe I**).

2. Préparation et dépôt des échantillons

75µl de l'extrait actif ont été mélangés avec 25µL du tampon de charge (**Annexe I**), puis chauffés à 100°C pendant 5 minutes. 20 µl d'échantillon ont été déposés en présence d'un marqueur de taille qui varie entre 20 et 40 KDa (dual color BIORAD).

Le courant électrique est véhiculé par le tampon d'électrophorèse. La migration se fait à 80 V dans le gel de concentration et 150 V dans le gel de séparation, jusqu'à ce que le bleu de bromophénol soit à 3 cm du bord inférieur de la plaque.

Après démoulage, le gel a été rincé avec de l'eau distillée puis coloré dans la solution de bleu de coomassie R250 sous faible agitation pendant une nuit. Le gel a été par la suite trempé dans la solution de décoloration et de fixation jusqu'à l'apparition de bandes protéiques colorées en bleu sur fond transparent.

Résultats et Discussion

I. Extraction des protéines globales

Le surnageant de culture et les extraits protéiques obtenus après traitement au TCA et à l'acide phosphorique ont été testés pour leur activité antibiotique vis-à-vis de la souche de référence *Halobacterium salinarum* DSM 3754.

Nous avons noté la présence d'activité antibiotique dans le surnageant de culture ainsi que dans l'extrait à l'acide phosphorique. Cependant aucune activité n'a été détectée dans l'extrait au TCA. La densité optique mesurée entre 200 et 300, montre des pics à 212 et 228 dans les extraits à l'acide phosphorique et au TCA respectivement (Tableau V), ce qui traduit la présence de protéines dans les deux extraits.

La technique d'extraction avec le TCA s'est révélée une des techniques les plus efficace dans l'extraction des protéines de fromage (**Meyrand et al., 2000**). Cependant dans le cas les cultures des *Haloarchaea* l'extraction de protéines avec le TCA pourrait être entravée par la présence de fortes concentrations de sels.

Tableau V : Activité inhibitrice et spectre UV des extraits à l'acide phosphorique et au TCA.

	pH	Volume (ml)	Pics (nm)	Activité (mm)
Surnageant	7,5	10	---	15
Extrait protéine avec acide phosphorique (EpA)	6,99	1	256 212,8	14
Extrait protéine avec TCA(EpT)	7,04	1	262,2 228	0

L'extraction à l'acide phosphorique a été retenue, nous avons utilisé d'autres surnageants de cultures présentant différents diamètres d'inhibitions. L'activité antibiotique dans les échantillons avant et après extraction a été déterminée. La quantité de protéine présente dans les extraits a été estimée en utilisant la courbe d'étalonnage avec de la BSA (**Figure 4**).

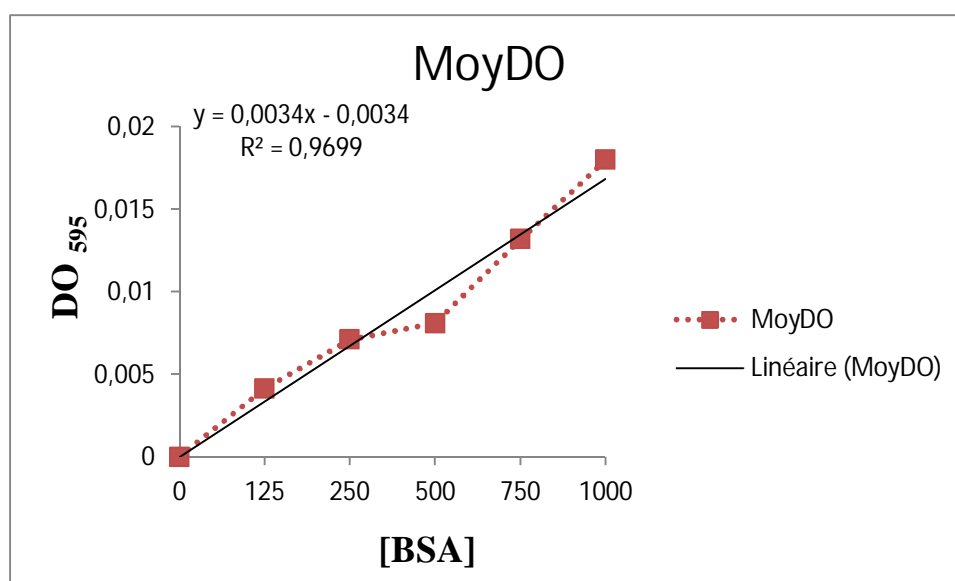


Figure 04 : Courbe d'étalonnage de la concentration de BSA et DO₅₉₅ (**Bradford, 1976**)

Tableau VI : Activités et quantités de protéines dans différents extraits à l'acide phosphorique

Surnageants	pH	Volume (ml)	Activité (mm)	Extrait protéique	Volume (ml)	pH	Quantité des protéines (µg/ml)	Activité (mm)
1	7,83	70	---	Ep1	6	7,83	0,0667	12
2	8,99	13,5	11	Ep2	2	5,72	4,0690	9
3	9,12	11	10	Ep3	2	6,59	0,1363	8
4	8,88	13	14	Ep4	2	6,54	3,4889	19
5	9	13	15	Ep5	2	6,43	4,0690	16

L'activité inhibitrice des surnageants est presque la même que celle détectée dans l'extrait protéique sauf dans le cas des surnageants 4 et 5 où l'activité est un peu plus importante dans les extraits protéiques. Cette faible concentration dans les extraits protéiques pourrait s'expliquer par l'instabilité du pH au cours de l'extraction dans de telles conditions de salinité, ce qui conduirait à une faible récupération des protéines globales.

L'activité pourrait également être influencée par le pH aussi bien dans les surnageant que dans les extraits protéiques.

Nous constatons que l'activité et la quantité de protéine ne sont pas corrélées, car d'autres protéines non actives ou des enzymes peuvent être présentes dans les extraits.

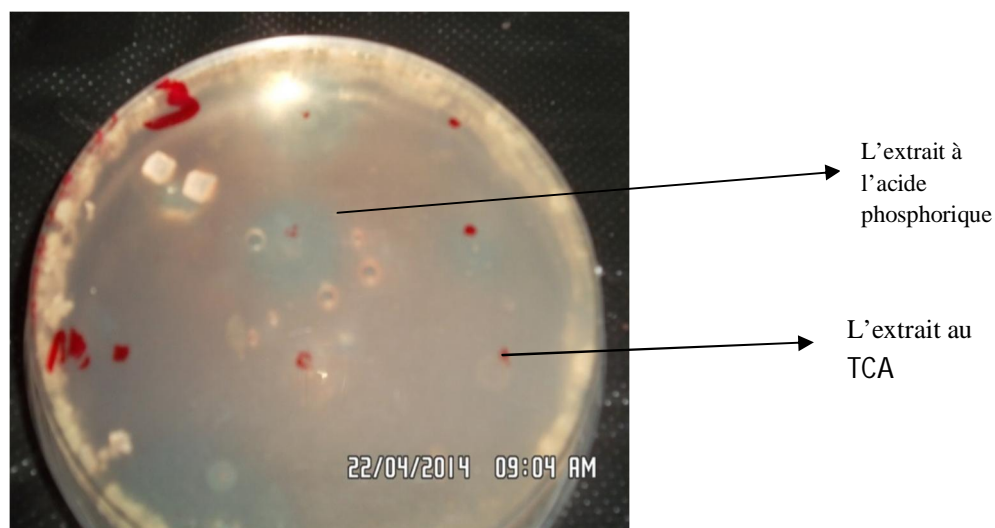


Figure 05: Activité antibiotique des extraits à l'acide phosphorique et au TCA.

1. Détermination du titre d'un extrait actif

La dilution permettant l'extinction de l'activité antibiotique a été déterminée (tableau VII). D'après Shand (2006), le titre d'une solution d'halocine correspond à la dernière dilution dans laquelle l'activité disparaît. Ainsi l'extrait protéique utilisé a pour titre ; 6400 UA/ml.

Tableau VII : Activité antibiotique dans les différentes dilutions de l'extrait protéique

Dilution	Activité (ZI mm)						
	témoin	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
Extrait protéique	17	15	14	10	10	0	0

ZI : Zone d'inhibition

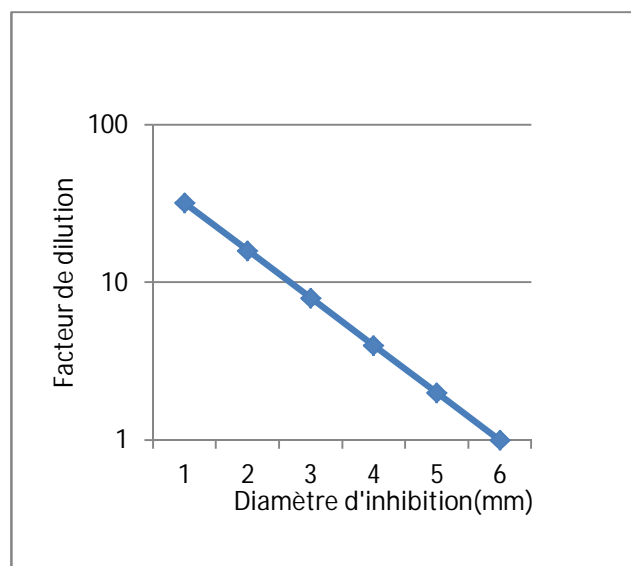


Figure 06 : Corrélation entre l'inverse du facteur de dilution et les zones d'inhibitions.

II. Effets de quelques paramètres physico-chimiques sur l'extrait actif

1. Effet de solvants organiques et détergents anioniques

Après traitement des extraits protéiques (Ep1 et EP4) avec différents solvants organiques (tableau VIII), nous constatons que l'activité antibiotique est réduite d'environ 4 fois après contact avec le tween 20 et disparaît complètement en présence du Tween 80 et de l'isopropanol. En revanche l'activité persiste avec tous les autres solvants (figure 07).

Tableau VIII : Effet de quelques solvants organiques sur l'activité antibiotique des extraits protéiques.

les solvants et détergents non ioniques	Activité (mm)
Témoin	12
Méthanol	12
Ethanol	10
ACN	12
Isopropanol	0
Tween 80	0
Tween 20	5
Acétone	12

La HalS8 est résistante aux solvants organiques et demeure sans changement après stockage à 4°C pendant plusieurs mois (Shand et O'connor, 2002).

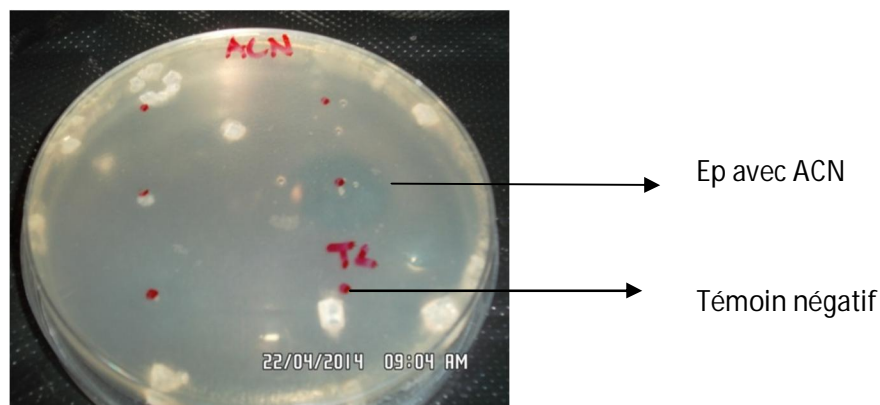


Figure 07 : Effet des solvants organiques sur l'activité des extraits protéiques

2. Effet de la Température

La thermostabilité est évaluée par un traitement des extraits protéiques 1h à 60 et 80°C ; 10, 30 et 60 min à 100°C et à 120°C pendant 20min. Les résultats observés sont donnés dans le tableau IX.

Tableau IX : Effet de la température sur l'activité des extraits protéiques.

Extrait protéine	Témoin non traité	60°C	80°C	100°C			120°C/20min
				10 min	30 min	60 min	
Ep A	14	9 mm	9 mm	9 mm	8 mm	9 mm	/
Ep 1	12	13 mm	12 mm	11 mm	11 mm	11 mm	/
Ep4	19	16 mm	13 mm	16 mm	16 mm	15 mm	0mm
Ep5	16	12 mm	12 mm	12 mm	11 mm	11 mm	0mm

D'après ces résultats, nous constatons que l'activité résiduelle est relativement la même dans les extraits actifs avant et après traitement. La substance antibiotique produite est donc résistante à la chaleur.

Nous signalant que les tests d'activités des extraits non traités ont été réalisés séparément de ceux traités à la chaleur, ce qui expliquerait en partie la différence au niveau des diamètres d'inhibition.

Parmi les halocines connus très peu sont stables à la chaleur, c'est le cas de la A4 et S8 (O'connor et shand, 2002).

Généralement les micro-halocines sont thermorésistantes, c'est le cas de la halS8 qui préserve 100% d'activité à 93°C pendant 1h, (Shand, 2006). Même avec un poids moléculaire élevé, certaines halocines peuvent être thermostables, en effet la halH6 garde 100% de son activité à 90°C (10min) et 50% à 100°C (10min), et ne la perd complètement qu'à 120° (20min).

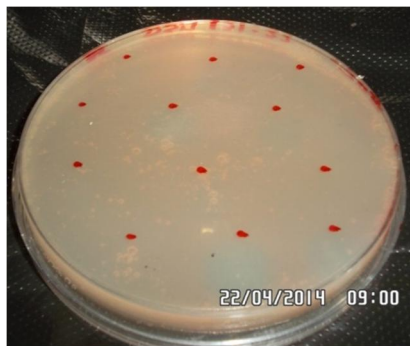


Figure 08 : Activité des extraits protéiques après traitement à la chaleur

3. Effet du pH

Les résultats montrent que l'activité augmente en fonction du pH pour atteindre un maximum à pH 6. Au-delà, l'activité diminue pour s'annuler à pH 12. Ceci pourrait être dû à la précipitation de sels à des pH élevés, qui conduirait à la dénaturation de la protéine active (Figure 09).

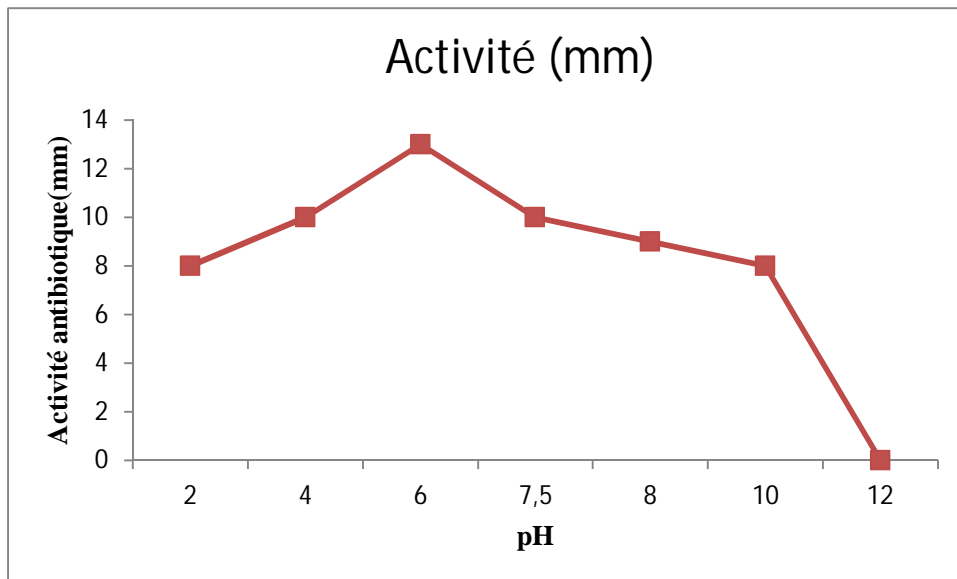


Figure 09 : Effet du pH sur l'activité antibiotique.

La malate déshydrogenase est une protéine halophile qui est un tétramère stable à 4 M de NaCl et à pH de 5 à 10, mais se dissocie en monomères à pH 4.8 (Elcock et Cammon, 1998).



Figure 10 : Activité des surnageants à différents pH sur la souche cible (DSM)

4. Effet de la salinité sur l'activité antibiotique

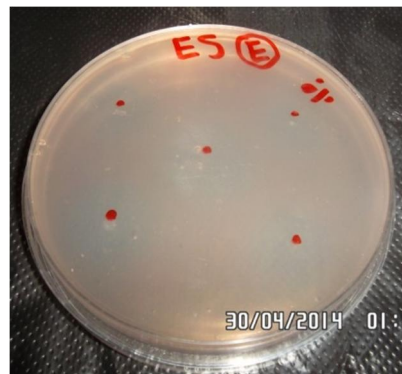
L'extrait protéique est testé pour son activité antibiotique à différentes concentrations en sel (0%, 25%, 50%, 75%) (Tableau X)

Tableau X : Effet de sel sur l'extrait protéique

Dilution	Témoin	75%	50%	25%	0%
Activité (ZI mm)	20	16	16	16	14

ZI : Zone d'inhibition

Les résultats obtenus montrent que l'activité antibiotique diminue à mesure que la salinité du milieu diminue. Ainsi, l'activité décroît de 20 à témoin lorsque la salinité est réduite à 75 et 0 % respectivement dans l'échantillon. L'activité antibiotique est donc dépendante de la salinité du milieu.

**Figure 11** : Activité des extraits protéiques à différentes concentrations de sels

III. Profil électrophorèse des extraits protéiques

Les extraits protéiques (Ep1* et Ep4*) ont été traités 1h à 100°C puis déposés sur gel SDS-page en présence du surnageant actif (Sc) et de l'extrait non traité à la chaleur (Ep1) (**Tableau XI**).

Les résultats montrent plusieurs bandes protéiques au niveau du surnageant, alors que dans les autres dépôts une bande unique est observée (**Figure 12**).

Tableau XI : Les activités des échantillons utilisés
dans le profil électrophorétique

dépôts	Activité (mm)
1 Sc	14
2 Ep1	12
2 Ep1*	11
3 Ep4*	15

* : Traité à la chaleur



Figure12 : SDS-PAGE
(Profil électrophorétique de l'halocine)

Un antibiogramme sur le gel non coloré aurait montré la bande protéique correspondant à l'halocine. Malheureusement ce test n'a pas été réalisé.

Conclusion

Conclusion

L'objectif de notre travail était de déterminer, la nature, les effets du pH, de la température, de la salinité et des certaines solvants organiques sur l'activité antibiotique produite par la souche d'archées halophile S1

D'après les résultats, nous pouvons conclure que :

- La substance antibiotique élaborée par la souche d'*Haloarchaea* S1 présente une forte activité vis-à-vis de *Halobacterium salinarum*.
- Elle est récupérée après extraction acide et à froid.
- La quantité de protéine des extraits protéiques est appréciable.

Ceci indique qu'il s'agit probablement d'une halocine

Par ailleurs, la substance antibiotique possède plusieurs caractéristiques intéressantes :

- Elle résiste à une gamme de pH allant de 2 à 10. L'activité optimale se situe à pH 6 ;
- Résistante à la plupart des solvants organiques ;
- Thermostable à 100°C pendant 1h ;
- Cependant elle est sels dépendante.

D'autres aspects du thème peuvent être envisagés à l'avenir à savoir :

- ❖ l'étude plus profonde sur la nature de cette substance : protéique ou glycoprotéique et la stabilité vis-à-vis d'autre enzyme protéolytique (protéase) et non protéolytiques (lipase, glucose-oxydase).
- ❖ L'étude approfondie du mode d'action et la biosynthèse.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

Balciunas E., Martinez F., Todorov S., Melo Franco B., Converti A., Souza Oliveira R .(2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Contents lists available at SciVerse ScienceDirect, Food Control*, **32**: 134-142

Birbir M and Eryilmaz S.(2005). Prevention of halobacterial damage on hide caused by lipolytic halophilic archaea with halocins. *Department of Biology, Science and Arts Faculty, Marmara University, 34722 Göztepe, İstanbul, Turkey*

Bradford M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical biochemistry*, **72**: 248-254

Carine D., Philippe T., Gembloux. (2008). Les bactériocines des bactéries lactiques caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **13**: 143-154.

Cheung J., Kathleen J., Danna M., O'connor B., Price and Shand F.(1997). Isolation, Sequence, and Expression of the Gene Encoding Halocin H4, a Bacteriocin from the Halophilic Archaeon *Haloferax mediterranei* R4. *Journal of bacteriology*, **179**:548–551

Dassarma P., Coher A., Huse V and Dassarma S.(2010). Halophiles, industrial applications. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*

Daw A and Falkiner R.(1996). Bacteriocins: Nature, Function and Structure. *Department of Clinical Microbiology*, **27**: 467 479.

Enache M, Kamekura M.(2010). Hydrolytic enzymes of Halophilic microorganisms and their economic values. *Rom. J. Biochem*, **47**: 47–59

El-Shouny W., Abo-Kamar A., Ragy S .(2013). Characterization of the partially purified plantaricin SR18 produced by *Lactobacillus plantarum* SR18. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, **2 (5)** 2301-2305

- Elcock H and McCammon J.(1998).** Electrostatic contributions to the stability of halophilic proteins. *J.mol.Biol*, **280**: 731-748.
- Franzetti B., Schoehn G., Garcia D., Ruigrok R., and Zaccari G.(2001).** Characterization of the proteasome from the extremely halophilic archaeon *Haloarcula marismortui*. *Journal list Archaea*, **1(1)**: 53–61
- Ghanbari M., Jami M., Kneifel W., Domig K.(2013).** Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocins produced by lactobacilli isolated from Sturgeon fish. *Contents lists available at SciVerse ScienceDirect ,Food Control*, **32**: 379-385
- Graziano G and Merlino A.(2014).** Molecular bases of protein halotolerance. *Biochim Biophys Acta*, **4**:850-858.
- Grenier D. (2004).** Traitement des infections à Streptococcus suis Des bactériocines pour remplacer les antibiotiques . *Article publié dans Porc Québec*
- Hal V. (2003).** Alternative Sources of Biologically Active Substances. *Process Biochemistry*, **48**: 1252–1261
- Karthikeyan P., Sarita G., Bhat M., Chandrasekaran.(2013).** Halocin SH10 production by an extreme haloarchaeon *Natrinema* sp. BTSH10 isolated from salt pans of South India. *Saudi Journal of Biological Sciences*, **20**: 205–212
- Litchfield D.(2011).** Potential for industrial products from the halophilic Archaea. *J Ind Microbiol Biotechnol*, **38**:1635–1647
- Liu X., Lei W., Liua J., Lei C., Xiang H.(2013).** Genome-Wide Analysis of Gene Expression in Stationary Phase and Genetic Characterization of Stationary-Phase-Dependent Halocin Gene Expression in the Haloarchaeon *Haloferax mediterranei*. *Journal of Genetics and Genomics* **40**: 441-444
- Lequerica L., O'Connor J., Such L., Alberola A., Meseguer I., Dolz M., Torreblanca M., Moya A., Colom F. and Soria B.(2006).** A halocin acting on Na⁺/H⁺ exchanger of Haloarchaea as a new type of inhibitor in NHE of mammals. *J. Physiol. Biochem*, **62 (4)**, 253-262
- Laemmli UK. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227 (5259)**, 680-685.

- Marhuenda-Egea F and Bonete M.(2002).** Extreme halophilic enzymes in organic solvents. *Current Opinion in Biotechnology*, **13**:385–389.
- Meyrand A., Folio P., Giraudon N., Hadj-Amar D., Cavaud M.C., Reynaud A and Vernozy Rozand C.(2000).** Comparaison d'une nouvelle technique d'extraction-concentration des entérotoxines staphylococciques par rapport à la méthode de référence dans les produits laitiers. *Revue Méd. Vét*, **151**: **3**, 205-211
- Montville T.J., Bruno M.E.(1994).** Evidence that dissipation of proton motive force is a common mechanism of action for bacteriocins and other antimicrobial proteins. *International Journal of Food Microbiology*, **24**: 53-74
- Naor A.,Yael Y., Gophna U.(2013).** A halocin-H4 mutant *Haloferax mediterranei* strain retains the ability to inhibit growth of other halophilic archaea. *Extremophiles*, **17**:973–979
- Nayek A., Gupta S., Banerjee S., Mondal B., Bandyopadhyay AK. (2014).** Salt-bridge energetics in halophilic proteins.
- Oren A .(2011).** Ecology of Halophiles. *Koki Horikoshi (ed.), Extremophiles Handbook*.
- Oren A., David R., Arahall and Ventosa A.(2009).** Emended descriptions of genera of the family Halobacteriaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **59**: 637–642
- Oren A.(2006).** The Order Halobacteriales. *Prokaryotes*, **3**:113–164
- Oren A.(2002).** Properties of halophilic proteins.
- Oren A.(2002).** Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **28**: 56–63
- O'Connor EM and Shand RF.(2002).** Halocins and sulfolobocins: The emerging story of archaeal protein and peptide antibiotics. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **28**: 23–31
- Rebuffat S.(2011).** Bacteriocins from Gram-Negative Bacteria: A Classification?. *Laboratory of Communication Molecules and Adaptation of Microorganisms*

Shuang M., Sun C., Liu X., Lu Q., Cai L., Yun L., Xiang H.(2008). The Helix-Loop-Helix Motif at 1 the N-terminal of HalI Is Essential for Its Immunity Function against Halocin C8. *American Society for Microbiology and/or the Listed Authors/Institutions*

Sun C., Li Y., Shuang M., Lu Q., Zhou L and Xiang H.(2005). A single gene directs both production and immunity of halocin C8 in a haloarchaeal strain AS7092. *Molecular Microbiology*, **57 (2)**, 537–549

Shand RF.(2006). 29 Detection, Quantification and Purification of Halocins: Peptide Antibiotics from Haloarchaeal Extremophiles. *Methods in microbiology*, **356**: 703-718

Shand.R.F. (2003). Bradford Protein Assay. protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

Werber M .(1980). Halophilisme. *Biochimif*, **62** : 411-422.

Yusuf A. (2013). Lactic Acid Bacteria:Bacteriocin Producer: A Mini Review. *IOSR Journal Of Pharmacy*, **3**: 44-50

Yang R., Monty C., jhonson and Bibek R.(1992). Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and environmental microbiology*, **58**: 3355-3359

Zacharof M. P and Lovittb R. W. (2012). Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. *APCBEE Procedia* **2**: 50 – 56

Zacharof M., Cossa G.M., Mandalea S.J., Lovitt R.W.(2013). Separation of lactobacilli bacteriocins from fermented broths using membranes.

Annexes

Annexe I

Composition des solutions, des réactifs, des tampons et des gels d'électrophores :

1- Solution de TCA 1M

Acide trichloro-acétique (TCA).....	49,17g
Eau distillée.....	100ml

2- Solution tris-Hcl 1M

Tris.....	60,55g
Eau distillée.....	400ml
Ajuster le pH = 8,02 par Hcl concentré	

3- Solution tris 3M

Tris.....	18,165g
Eau distillée.....	50ml

4- Solution saline

Na cl.....	250g/l
MgSO ₄	20g/l
Kcl.....	2g/l
Eau distillée.....	1L

5- Solution saline 1,5X

Na cl.....	125g
MgSO ₄	10g
Kcl.....	1g
Eau distillée.....	325ml

6- Solution acide phosphorique à 5%

Solution saline.....	100ml
Acide phosphorique concentré.....	5ml

7- Solution à base d'acide dinitrosalicylique (DNS)

Acide dinitrosalicylique.....	10g
Soude.....	16g
Tartrate de potassium sodique.....	300g
Eau distillée.....	1L

La solution est préparée puis filtrée et conservée dans un flacon couvert d'aluminium.

8- Tampon Tris-HCL à 50 mM à pH 8,02

Tris.....	6,057g
Eau distillée.....	1L

Ajuster le pH à 8,5 avec du HCL concentré (37,6%).

9- Gel de séparation à 12%

Solution d'acrylamide/ bisacrylamide.....	2,5ml
Tampon de séparation.....	5,2ml
TEMED.....	20µL
Persulfate d'ammonium (APS)	70µL
Xylane de bouleau.....	0,8ml
Eau distillée.....	12,5ml

10- Gel de concentration à 7,5%

Solution d'acrylamide / bisacrylamide.....	2,5ml
Tampon de concentration.....	2,5ml
TEMED.....	10µL
Persulfate d'ammonium(APS)	100µL
Eau distillée.....	10ml

11- Tampon de séparation à pH 8,8

Tris-HCL (3M).....	72,7g
SDS (0,8%).....	1,6g
Mercaptoéthanol (0,8ml).....	0,8ml

Eau distillée.....200ml

Ajuster le pH à 8,8 avec HCl concentré

12- Tampon de concentration

Tris-HCL (0,5M).....12,114g

SDS (0,4%).....0,8g

Mercaptoéthanol (0,2%).....0,8ml

Eau distillée.....200ml

Ajuster le pH à 6,6

13- Tampon de migration (X10) à pH 8,3

Tris (0,025M)..... 3,028g

Glycine (0,192M).....14,41g

Mercaptoéthanol (0,05%).....500µL

SDS (0,1%).....1g

Eau distillée.....1000ml

Ajuster le pH à 8,3

14- Tampon de charge à pH 6,8

Trizma base.....0,303g

SDS (Sigma).....0,8g

Eau distillée.....4ml

Ajuster le pH à 6,75 avec du HCl concentré

Glycérol.....4ml

β-mercaptoéthanol à 14,3M.....2ml

Bleu de bromophénol.....0,1 mg

15- Solution de fixation et de décoloration

Alcool (éthanol)30%

Acide acétique.....5%

16- Solution de coloration

Bleu de Coomassie R250.....	2,9 mM
Alcool (éthanol)	40%
Acide acétique.....	10%

Annexe II

1. Appareillage

- Autoclave KELER
- Agitateur
- Bain marie (JALADO TW12)
- Bain marie agité (IKA LABORTECHNIK)
- Balance de précision
- Centrifugeuse (HETTICH type 2009)
- Etuves Four pasteur
- pH-mètre
- Plaque chauffante
- Réfrigérateur
- Spectrophotomètre
- Vortex
- Dispositif d'électrophorèse (Mini Protean II, Bio Rad).
- Pompe à vide

2. Verrerie et petit matériel

- Ose de platine
- Ballon
- Barreaux magnétiques
- Bec bunsen
- Boite De Pétri
- Bêchers
- Coton cardé
- Eppendorff
- Eprouvettes graduées
- Erlens : 100, 200, 250, 300, 1000, 2000, 5000 ml
- Embouts
- Fioles : 500, 1000 ml
- Flacons

- Laine de verre
- Lames et lamelles
- Micropipette
- Papier aluminium
- Pince métallique
- Pipettes graduées : 1, 2, 3, 5, 10 ml
- Pipette pasteur
- Poire
- Spatule
- Tubes à hémolyses
- Tubes à essai
- Colonnes

Annexe III

Produit chimiques

- Acide chlorhydrique (HCL)
- Chlorure de potassium (KCL)
- Ethanol
- Méthanol
- Acétone
- Acide acétique
- Acétonitrile (ACN)
- Isopropanol
- Tween 20
- Tween 80
- Soude caustique (NaOH)
- MgSO₄
- Hydroxyle de sodium (Na Cl)
- Acide trichloro-acétique (TCA)
- Tris
- Acide phosphorique
- BSA (bovine sérum albumine) (Fluka)
- Bleu de coomassie G250 (Fluka)
- Bleu de coomassie R250 (Fluka)

Résumé

Les halocines sont des antibiotiques peptidiques ou protéiques produites par plusieurs espèces halophiles du domaine Archaea ou *Haloarchaea*. Elles sont excrétées dans l'environnement pour tuer ou inhiber d'autres haloarchées. Une souche d'haloarchée S1, isolée de la sebkha de Ouargla a montré une activité antibiotique intéressante. L'extraction acide et à froid du surnageant de culture a permis de récupérer la molécule active. L'étude de certains facteurs sur sa stabilité montre qu'elle est thermostable, elle résiste à un pH allant de 2 à 10 et n'est pas dénaturé par des solvants organiques.

Mots clés : *Haloarchaea*, Halophiles, Halocines, Antibiotiques, Caractérisation.

Summary

Halocins are peptide or protein antibiotics produced by several halophilic members of the domain Archaea and are excreted in the environment to kill or inhibit the sensitive haloarchaea. A strain of haloarchaeal (S1), isolated from the sebkha of Ouargla showed an interesting antibiotic activity. The acid and cold extraction of the culture supernatant made it possible to recover the active molecule. The study of certain factors on its stability shows that it is thermostable, it resists to pH from 2 to 10 and is not denatured by organic solvents.

Keywords: Haloarchaea, Halophils, Halocins, Antibiotics, Characterization.