

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche Scientifique

**Université Abderrahmane MIRA de Béjaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie**

Mémoire de Fin de Cycle

*En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master en
Biotechnologie Microbienne*

Thème

*Essai de détermination de la nature de
l'activité antiarchéenne des souches Halophiles
extrêmes isolées a partir du chott el BEIDA au
sud d'el Eulma (Sétif)*

Réalisé par :

M. DJABALI Salim

Membre du jury :

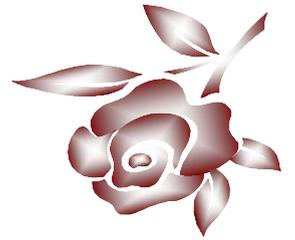
Président: M. NABTI Ab Ah. (MCA, Université A / MIRA de Béjaia)

Examinatrice 1: M. TOUATI Ab Al.(MAA, Université A / MIRA de Béjaia)

Examinatrice 2: M. MESSIS (Dr, Université A / MIRA de Béjaia)

Promotrice : Mme YAHIAOUI H. (MAA, Université A / MIRA de Béjaia)

Promotion : 2012 / 2013



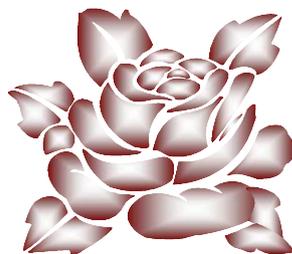
Remerciements

je remercie en premier lieu, le BON DIEU pour le courage, la patience et la santé qui m'a donné pour suivre mes études.

le président monsieur NABTI. ainsi que les membres de jury M.TOUATI Ab.A, M. MESSIS , d'avoir bien voulu juger et évaluer mon travail.

Ma profonde gratitude, et mes vifs remerciements vont également s'adresser à ma promotrice Mme YAHIAOUI H pour son temps, sa franchise, son aspect sérieux dans le travail et son bagage de connaissance qu'elle m'a fait partager.

A toute personne ayant contribué à l'élaboration de mon travail.



DEDICACES

Je dédie ce travail à mes chers parents qui ont permis de me former et encouragé pendant toute ma formation, que dieu les protège et les garde en bonne santé.

À mes très chères sœurs que j'aime énormément ainsi que ma femme et mon frère adoré Massi

À mes grands parents et toutes mes tantes, mes oncles, mes cousins, mes cousines et les membres de leurs familles

À tous mes amis sans exceptions surtout

Ceux qui me sont chers à mon cœur dont je me souviendrai toujours.

À ma jolie perle H.



Salim

Sommaire

| | |
|---|----|
| Introduction | 1 |
| <i>Synthèse Bibliographique</i> | |
| <i>Chapitre I : Environnements hypersalins</i> | 2 |
| I.1. Généralités | 2 |
| I.2. Les thalassohalines | 2 |
| I.3. Les athalassohalines | 3 |
| | |
| <i>Chapitre II : Microorganismes halophiles</i> | 4 |
| Historique | 4 |
| | |
| II.1. Définition des halophiles. | 4 |
| II.2. Archées halophiles | 5 |
| II.2.1. Caractéristiques générales des archées halophiles Extrêmes | 6 |
| II.2.2. Caractères cultureux | 6 |
| II.2.3. Caractères morphologiques | 6 |
| | |
| II.3. Conditions de culture des halophiles | 9 |
| II.3.1. Concentration de sel | 9 |
| II.3.2. La température de croissance | 9 |
| II.3.3. Le pH optimal de croissance | 10 |
| II.3.4. Aération | 10 |
| | |
| <i>Chapitre III : Biotechnologies des halophiles</i> | 10 |
| III.1. Production d'enzymes | 10 |
| III.1.1. Les amylases | 10 |
| III.1.2. Protéases | 11 |
| III.1.3. Les lipases | 11 |
| III.1.4. Les bêta-galactosidases | 11 |
| III.2. Production de polymères | 11 |
| III.3. Production de biosurfactants | 11 |
| III.4. Production de la bactériorhodopsine | 12 |

| | |
|--|-----------|
| III.4. Production de substances antibactériennes..... | 12 |
| III.4.1.Généralités | 12 |
| III.4.2. Classification des archaeocine..... | 13 |
| III.4. 3. Application des Halocines..... | 13 |

Partie pratique

Chapitre I : Matériel et méthodes

| | |
|---|-----------|
| I.1. Les échantillons..... | 14 |
| I.2. Milieux de culture..... | 14 |
| I.2.1. Composition..... | 14 |
| I.2.2. Préparation | 15 |
| I.3. Isolement | 15 |
| I.3.1 Isolement direct | 15 |
| I.3.2 Isolement par enrichissement..... | 15 |
| I.4. Purification des souches..... | 16 |
| I.5. Souches indicatrices | 16 |
| I.6. Etude morphologique des souches..... | 17 |
| I.6.1. Aspect des colonies | 17 |
| I.6.1. Observation au microscope..... | 17 |
| I.7. Recherche de l'activité anti archéenne par la méthode de diffusion en double couche | 17 |
| I.7.1. Recherche de l'activité anti archéenne dans les cultures liquides | 17 |
| I.7.2. Recherche de l'activité anti archéenne dans le culot et le surnageant..... | 19 |
| I.7.3.Essai de détermination de la nature de l'activité anti archéenne..... | 19 |
| I.7.3.1. Traitement par les protéases | 19 |
| I.7.3.2. Effet de la température et du pH sur l'activité | 20 |
| I.8. Essai d'identification des souches | 20 |
| I.8.1 .Tests biochimiques | 20 |

I.8.2. Sensibilité aux antibiotiques21

I.8.3. Détermination de l'optimum de salinité21

Chapitre I : Résultats et discussion

II .1. Isolements22

II .1.1. Isolement direct.....22

II.1.2. Isolements par enrichissement.....24

II.2. Revivification des souches.....24

II.3. Les souches de référence et les souches locales identifiées antérieurement ..26

II.4. Identification morphologique des souches purifiées.....26

II.4.1. Aspect des colonies26

II.4.2. Observation microscopique des souches26

II.5. Recherche de l'activité anti archéenne des souches isolées27

II.5.1. Recherche de l'activité anti archéenne dans les cultures liquides des souches isolées.....27

II.5.1. recherche de l'activité anti archéenne dans le culot et le surnageant29

II.6. Essai de détermination de la nature de l'activité anti archéenne30

II.6.1.Action des protéases30

II.6.2. Effet de la température et du pH sur l'activité.....31

II.7.Essai d'identification des souches actives.....33

II.7.1. Tests biochimiques33

II.7.2. Sensibilité aux antibiotiques.....33

II.7.3. Détermination de l'optimum de salinité34

Conclusion36

Références bibliographiques

Annexe

Liste des figures

| Figure N° | Titre | Page N° |
|----------------------|---|--------------------|
| 01 | Photographie Satellite de Sebkha Halk El Menzel, Sousse, Tunisia, prise par NASA World Wind, OnEarth WMS global mosaic visual colour layer. | 02 |
| 02 | Photographie satellite de sebkha d'Oran. (Google Earth). | 03 |
| 03 | Photographie Satellite du chott el Beida (Algérie) (Google Earth). | 03 |
| 04 | deux types morphologiques d'haloarchées : a gauche <i>Haloferax volcanii</i> , a droite <i>Halobacterium salinarum</i> . | 07 |
| 05 | Schémas représentatifs d'un lipide archaebactérien et d'un lipide eubactérien | 08 |
| 06 | Test d'activité anti archéenne sur milieu solide | 18 |
| 07 | Isolements à partir des échantillons de sel : BSIII sur milieu Br7 solide(A) et sur milieu complexe (B), et isolements à partir d'échantillons d'eau : BWII sur Br7(C). | 24 |
| 08 | photo des douze (12) souches sélectionnées pour les tests d'activité anti archéenne sur milieu Br7 liquide | 25 |
| 09 | Photos microscopiques de quelques souches halophiles extrêmes étudiées (BWII, BSIII) (Forme et Gram) (Grossissement 10x100) | 27 |
| 10 | Quelques photos illustrant l'activité anti archéenne des quelques souches vis-à-vis de DSM3754 . | 28 |
| 11 | photos des tests d'activité de la culture, culot ainsi que surnageant des souches BGIII (gauche) et BSIII (droite). | 30 |
| 12 | photos illustrant les activités des surnageants des souches BSIII (gauche) et BGIII (droite). | 31 |
| 13 | Résultat du test de traitement par la chaleur à 100°C pendant 10 min. | 32 |
| 14 | Croissance de la souche BSIII à différentes concentration de NaCl | 35 |
| 15 | Croissance de la souche BGIII à différentes concentration de NaCl | 35 |
| 16 | Croissance de la souche BWIII à différentes concentration de NaCl | 35 |

Liste des tableaux

| Tableau n° | Titre | Page n° |
|-------------------|---|----------------|
| I. | Classification des microorganismes en fonction de leur tolérance au sel | 5 |
| II. | représentant la classification des archaeocine selon Shand et Leyva, 2007. | 13 |
| III. | Dénombrement des colonies des échantillons d'eau sur milieu Br7 après 3 semaines. | 23 |
| IV. | dénombrement des colonies des échantillons de sel sur milieu Br7 et milieu complexe après 3 semaines. | 23 |
| V. | résultats des tests d'activité anti archéenne. | 27 |
| VI. | Résultats des traitements par la chaleur et le pH | 32 |
| VII. | représentant les résultats des tests biochimiques effectués | 33 |
| VIII. | les résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques | 34 |

Liste des abréviations

Br7 : brown pH 7

DSM : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen

DSMZ : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen

DO: Densité Optique EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique GPS : Global Positioning System

KCl : chlorure de potassium

kDa : Kilos Dalton

KOH : hydroxyde de potassium

M : molaire

MCAM : Molécules de Communication et Adaptation des Microorganismes

MC7 : Milieu Complexe

MgSO4 : sulfate de magnésium

MLSA : Multi Locus Sequence Analysis

MNHN : Muséum National d'Histoire Naturelle

NaCl : Chlorure de sodium

pH : potentiel hydrogène

Rpm: rotation par minute

UFC: unité formant colonies

L'aptitude de certains organismes à se développer dans des conditions physiques et chimiques défavorables pour la plupart des organismes vivants est dite l'extrémophilie. Les environnements Hypersaline sont parmi les environnements le plus extrême (Baati et al., 2008), ils sont trouvés dans une large variété d'écosystèmes aquatiques et terrestres. Ils sont colonisé par des micro-organismes halotolerant mais aussi par micro-organismes halophile allant des halophiles modéré qui se développent dans des milieux qui contiennent entre 0.5M et 2.5M NaCl aux halophiles extrême qui se développent dans des milieux qui contiennent plus de 2.5M NaCl (Hedi et al.,2009).

Les habitats hypersalés formés depuis une longue période de l'histoire de la Terre sont caractérisés par une faible diversité microbienne (Rodriguez-Valera, 1993).Les halophiles extrême forment le troisième grand groupe des archaebactéries après les méthanogènes et les thermophiles. Des études antérieures sur la biodiversité d'environnements hypersaline ont montré que les membres halophile du domaine Archaea soit dominant, alors que ceux des du domaine Bactéries ont représenté comme les minorités (Litchfield et al. 2002). L'un des facteurs conférant un avantage sélectif pouvant expliquer leur abondance dans les environnements hypersalins serait la production de substances antimicrobiennes.

La production de substances similaires aux bactériocines par les halophiles extrêmes «les halocines» est une caractéristique universelle de ces microorganismes (Torreblanca et al., 1994). La stabilité aux sels des halocines représentent donc une source potentielle de nouvelles molécules actives qui pourraient être utilisées dans plusieurs domaines (pharmaceutique, alimentaire, agronomique et clinique). L'objectif de ce présent travail est la détermination de la nature de l'activité anti archéennes de souches halophiles aérobies hétérotrophes isolées d'un environnement hypersalin algérien (Chott El Beida).

Pour répondre à cet objectif différentes étapes doivent être réalisées:

- Dans un 1er temps, Isolement et caractérisation phénotypique, biochimique et physiologique des isolats.
- La deuxième étape Mise en évidence de l'activité anti archéenne des isolats vis-à-vis à des souches indicatrices.
- La dernière étape est consacrée à la caractérisation des substances actives.

I. Environnements hypersalins

I.1. Généralités

Les habitats Hypersalins sont très répandus partout dans le monde, Les eaux marines constituent le plus grand biome sur notre planète avec une concentration en sel autour de 35g/l, et les environnements hypersalins ont été définis comme ceux ayant des concentrations salines au-dessus de celle-ci (Oren, 1999). La diversité des propriétés des habitats salins et hypersalins sur terre est reflétée par la grande diversité au sein des communautés microbiennes adaptées à la vie sous les conditions dominantes (Oren, 2002; 2006). Ces propriétés sont principalement définies selon la concentration totale en sel et la composition ionique (Rodriguez-Valera, 1993; McGenity *et al.*, 2000).

I.2. Les thalassohalines

Beaucoup d'environnements hypersalins dérivent de l'évaporation d'eau de mer, favorisée par un écoulement restreint, une température élevée, de basses précipitations, etc. De tels environnements sont appelés thalassohalines. Leurs sels minéraux sont dans les mêmes proportions que celles contenues dans l'eau de mer. Une grande diversité de vie microbienne est observée dans les thalassohalines, seulement quelques halophiles extrêmes peuvent grandir, par exemple *Halobacterium*, *Dunaliella*, et un peu d'espèce bactérienne. Des exemples d'environnements thalassohalins sont représentés par Sebkhahalk El Menzel(Tunisia), Sebkhahalk El Melah etc.



Figure 1 : Photographie Satellite de Sebkhahalk El Menzel, Sousse, Tunisia, prise par NASA World Wind, OnEarth WMS global mosaic visual colour layer.

I.3. Les athalassohalines

Les eaux athalassohalines proviennent de la dissolution d'évaporites par l'eau, cas de la plupart des sebkhas situées en zones semi-arides et arides. La concentration en sel des eaux athalassohalines arrive jusqu'à la saturation et au delà. La précipitation de NaCl provoque une haute concentration de potassium de magnésium. La composition ionique est un facteur clé qui détermine les propriétés de l'environnement comme un biotope (Oren, 2012). Quelques micro-organismes peuvent supporter même simultanément de hautes concentrations du sel (200g/l) et hautes températures haute jusqu'à 68°C (Cayol *et al.*, 1994).

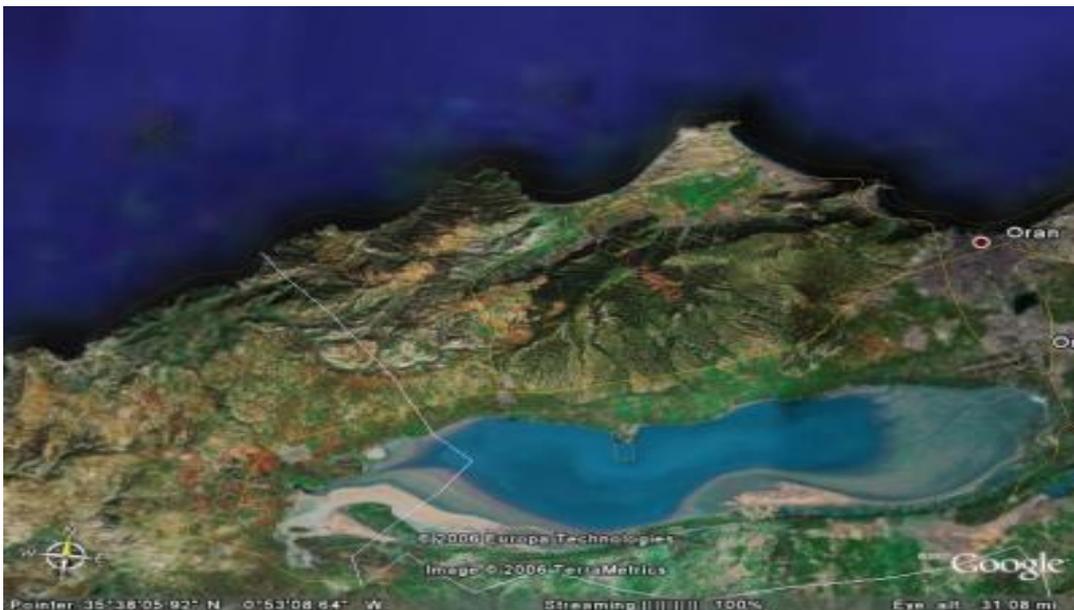


Figure 2 : Photographie satellite de sebkha d'Oran. (Google Earth).



Figure 3 : Photographie Satellite du chott el Beida (Algérie) (Google Earth).

D'autres types de lacs hypersalins sont présents dans des sites exceptionnels au fond de certaines mers comme la Mer Noire, la Mer Rouge, la Méditerranée ou le golfe du Mexique. Les compositions en sels de certains de ces lacs peuvent être exceptionnelles, comme celles de Discovery ou de Kryos au fond de la Méditerranée (sud de la Grèce) où les concentrations en magnésium atteignent 4 M (Roussel et *al.*, 2008).

II. Microorganismes halophiles

Historique

Les premières bactéries rouges ont été décrites pour la première fois en 1879 par Poulsen et fortement étudiées jusqu'à 1915 en raison de leur importance économique (Vreeland, 1992). En 1922, Harrison et Kennedy isolèrent une souche pratiquement identique qu'ils nommèrent *Pseudomonas salinaria*. Jusqu'en 1957, il n'y avait que 4 espèces reconnues par la septième édition du Bergey's manuel (*Halobacterium salinarum*, *Halobacterium cutirubrum*, *Halobacterium marismortui* et *Halobacterium trapanicum*) (Grant et *al.*, 2001). Aujourd'hui les études sur les halophiles extrêmes se sont diversifiées et plusieurs genres et espèces ont été décrits en combinant les études phylogénétiques avec les études physiologiques et chimiotaxonomiques, particulièrement l'analyse des lipides membranaires (Kamekura et Dyll-Smith, 1995 ; Oren et *al.*, 1997 ; Hezayen et *al.*, 2002).

II.1. Définition des halophiles.

Le terme « halophile » désigne les microorganismes nécessitant la présence de sel (NaCl) dans le milieu pour leur croissance. Les micro-organismes halophiles sont définis comme étant des organismes « qui aiment le sel » (Salt-Loving). Ils peuvent être trouvés dans chacun des trois domaines de vie: Archaea, Eubacteria et Eukarya. Cependant, les halophiles sont distingués par leur exigence des concentrations de sel pour se développer (Ventosa et *al.*, 1999). La distinction entre les différents groupes de microorganismes halophiles est basée sur leur niveau d'exigence ou de tolérance aux sels (Kushner, 1992). (Voir tableau I).

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

| Groupes | Concentration en NaCl Groupes (M et %) | Exemples de micro-organisme colonisateurs |
|----------------------|---|---|
| Non halophile | Pas de développement en présence de sel ou, du moins, dès que la concentration atteint 0,2M (1,16%) de sel. | la plupart des Eubactéries |
| Faiblement halophile | croissance sur des milieux contenant 0,2M à 0,5M de sel (1,16% - 2,9%) | microorganismes marins |
| Modérément halophile | développement dans des milieux contenant entre 3% et 15% de sel | <i>Vibriocosticola</i> , <i>Paracoccus</i> , <i>Halodenitrificans</i> et <i>Pseudomonas</i> . |
| Halotolérant | pas besoin de sel pour la croissance, mais peuvent pousser en sa présence et supportent jusqu'à 1,8M (10,4%) de sel | <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Halomonas elongata</i> , <i>Fungi</i> et algues |
| Extrême halophile | souches hyper halophiles c'est-à-dire les souches qui exigent pour leur croissance des concentrations entre 2,5 à 5,2 M (14,5-30%) de sel | <i>Halococcus</i> , <i>Halobacterium</i> . (archaebactéries halophiles extrême) |

II.2 Archées halophiles

En 1977, Woese et ses collaborateurs venaient de caractériser un groupe d'organismes aussi éloigné des Eucaryote et des Bactéries que ne peuvent l'être ces deux derniers groupes entre eux. D'abord prénommé Archéobactéries, car ces organismes semblaient archaïques, ce groupe fut ensuite appelé archée (Woese *et al.*, 1990).

Les archées halophiles extrêmes, c'est-à-dire pouvant croître exclusivement en présence de concentrations salines très élevées (entre 1,5 et 5 M NaCl) (Oren A, 2006) et dont leur optimum de croissance varie de 3,4 à 4,2M (20-25% NaCl) (Yachai, 2009). Les archaebactéries halophiles extrêmes occupent les écosystèmes à haute salinité, qualifiés d'extrêmes. Certaines espèces ne font que tolérer la salinité, tandis que d'autres ont besoin, pour croître, d'un environnement dix fois plus salé que l'eau de mer (Noll, 1992). Ils exigent la présence de sel pour leur croissance. Leur

paroi cellulaire, ribosomes et enzymes sont stabilisés par l'accumulation de KCl (Yachai, 2009).

Les archaea sont considérées comme non pathogènes et peuvent s'étendre d'un site à un autre sur des grains de sel cristallisés sec, par les vents ou par le biais des pattes et des plumes d'oiseaux (Perry et al., 2004).

II.2.1. Caractéristiques générales des archées halophiles Extrêmes

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

Les archaea halophiles appartenant à l'ordre *Halobacteriales*, famille des *Halobacteriaceae* sont considérés comme étant des halophiles par excellence (Oren, 2002). Les nombres augmentés de genres et espèce reflètent la diversité récemment découverte dans la famille *Halobacteriaceae* (Oren, 2006).

II.2.2. Caractères cultureux

Les colonies formées sont de couleur rouge, rose, pourpre (membres de la famille *Halobacteriaceae*) et, très rarement, incolores (quelques souches du genre *Natrialba*). La pigmentation est dû à la présence des pigments caroténoïdes C50 (pigment qui joue le rôle de protecteur contre les rayons solaires) (Hezayen et al., 2002). *Halobacterium salinarum* peuvent produire la bacteriorhodopsine, un photopigment, c'est semblable à la rhodopsine de notre yeux, utiliser la lumière du soleil comme une source d'énergie. (Prescott et al., 2003).

II.2.3. Caractères morphologiques

Les cellules peuvent avoir diverses formes (cocci, bacille, disque, triangle, sphère, etc.). La forme non cocci des halobactéries peut changer selon la concentration de sel de l'environnement, la dilution entraîne le changement des formes bacilles (*Halobacterium*) en forme sphériques, la surface des halobacilles (haloarchaea de forme bacillaire) est caractérisée par un assemblage de sous unités hexagonales de glycoprotéines de 17,5 nm d'épaisseur organisées en une unique couche régulière à la surface de la cellule et liées à des groupes sulfates. Cette structure est appelée « couche de surface » (ou S layer) (Fendrihan et al., 2006),

tandis que les formes cocci (*Halococcus*) grâce à leurs parois épaisses peuvent garder leur morphologie en cocci en présence de faible concentration de NaCl (Grant et al., 2001). La paroi des *Halococcus* est constituée par des polysaccharides. Elle est complexe, formée d'une seule couche rigide et qui n'est pas désintégrée en solutions salines diluées. (Fendrihanb et al., 2006). La figure montre des exemples d'archées halophiles illustrant les différentes formes observées sous microscopie électronique.

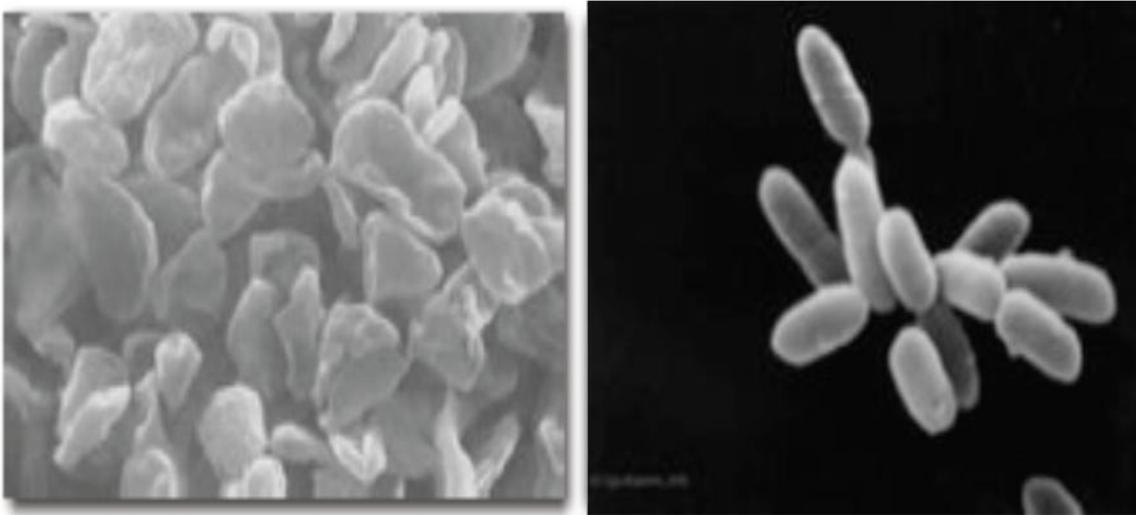


Figure 4 : deux types morphologiques d'haloarchées : a gauche *Haloferax volcanii*, a droite *Halobacterium salinarum*. (Dyall-Smith et al., 2006)

Les haloarchées sont Gram négatif (Grant et al., 2001) et elles peuvent être immobiles ou mobiles grâce à des flagelles (Prescott et al., 2003).

Certain souches possède des vésicules à gaz apparaissent comme des inclusions claires à l'intérieure de la cellule et permettent à celles-ci de flotter à des profondeurs favorables (Oren et al., 1997)

Les haloarchaea ne sont pas sensibles à la plus part des antibiotiques qui inhibent la synthèse de la paroi cellulaire. Elles ne sont pas affectées par des concentrations très élevées de pénicilline, de cyclosérine, de vancomycine et de céphalosporine, tous inhibiteurs de la synthèse de la muréine (Perry et al., 2004). Les antibiotiques usuels n'affectée pas la synthèse protéique des archée, La tétracycline est aussi un inhibiteur peu efficace bien qu'elle inhibe la synthèse protéique des Bactéries et des eucaryotes. Ces résultats suggèrent que la structure des ribosomes des Archées est très différente de celle des bactéries et des eucaryotes (Tortora et al., 2003).

Les membranes des archées en général sont différentes de celles des eucaryotes et des bactéries par la nature de leurs lipides. Les haloarchées se caractérisent par leur lipides uniques qui contiennent des groupes phytanyl liés au glycérol par une liaison éther plutôt que par des acides gras connectés par des liaisons esters. Les liaisons éthers sont plus résistantes que les liaisons esters à l'effet de la température, à l'oxydation et à la dégradation enzymatique. De plus, les acides gras sont substitués, chez la plupart des archaebactéries, par des chaînes latérales d'isoprénoïdes (figures 4) (Perry *et al.*, 2004).

Les lipides apolaires sont généralement des dérivés du squalène (Prescott, 2003). Il existe une multitude de structures des lipides polaires chez les halobactéries (phospholipide et glycolipide) qui servent de marqueurs taxonomiques pour distinguer les genres tels que *Halobacterium*, *Haloferax*, *Haloarcula*, *Halococcus*, *Natronobacterium* et *Natronococcus*.

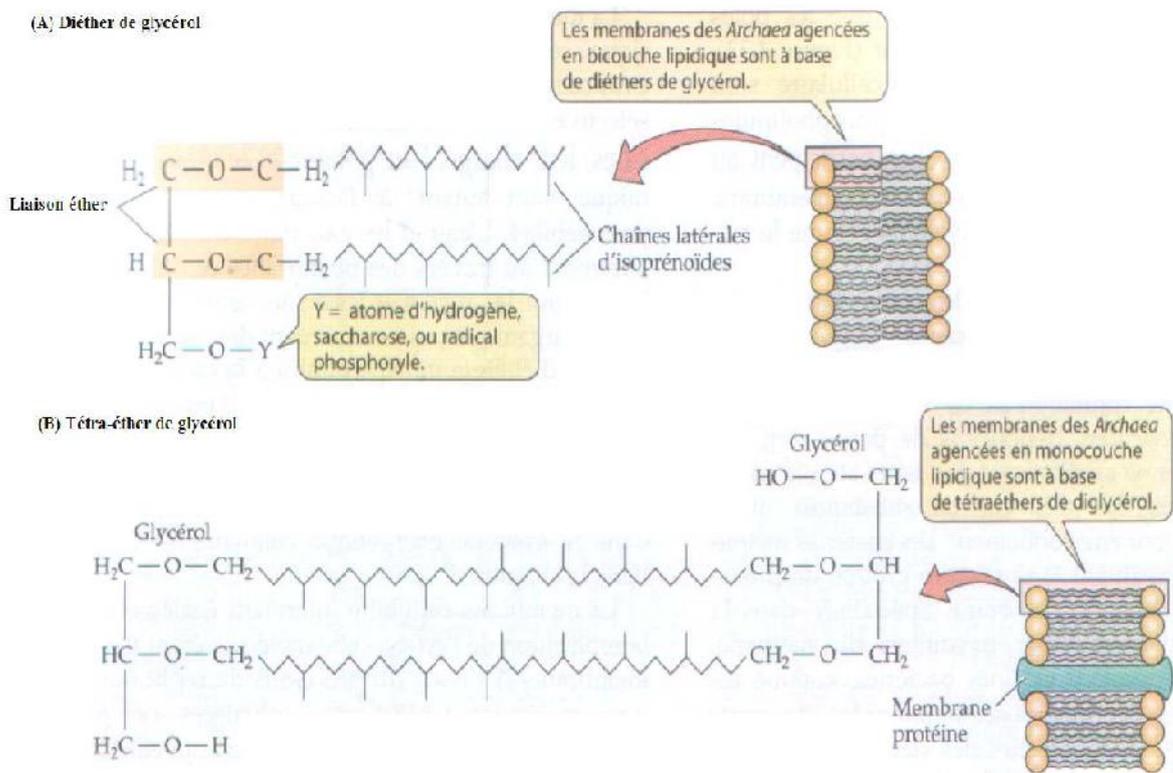


Figure 5 : Schémas représentatifs d'un lipide archaebactérien et d'un lipide eubactérien

II.3 Conditions de culture des halophiles

II.3.1. Concentration de sel

les haloarchaea extrême comprennent des types différents ; pour exemple, *Halorhabdus utahensis* a la concentration optimum de Na^+ la plus élevé qui est à 4.6 M, (Waino et al., 2000); alors que, *Haloferax mediterranei* est capable de poussé sur une large gamme des concentration de $[Na^+]$ allant de 1.0–5.2 M (Torreblanca et al., 1986). En outre, il y a huit espèces, y compris *Natrialba aegyptia* and *Halobiforma nitratireducens* qui tolèrent la saturation en $[Na^+]$ (Hezayen et al., 2001, 2002) et *Natronolimnobius Aegyptiacus* qui tolère $[Na^+]$ saturation à la plus haute température et pH alcalin . Chez les halophiles, la concentration optimale de sel varie entre 15% et 25% en fonction des espèces, mais la plupart se développent à 23% sel .Les souches ayant une concentration optimale de sel faible, se développent bien à des concentrations de sel plus élevées, mais les souches ayant une concentration optimale de sel élevée se développent faiblement aux concentrations plus basses. Par exemple, *Haloferax volcanii* se développe bien à 15% (optimum autour de 18%), tandis que *Haloarcula hispanica* a besoin au moins de 23% pour une bonne croissance et se développe très mal à 18% sel. (Dyall-Smith, 2006).

II.3.2. La température de croissance

63% des espèces archée halophiles extrême exposent des températures optimales entre 38- 40°C (Bowers et Wiegel, 2011). Généralement les haloarchaea grandissent le mieux au-dessus de température de pièce. La plupart des laboratoires utilisent 37°C (Kamekura et Dyall-Smith, 1995), pendant qu'autres travaillent à des température un peu inférieur (35°C) ou plus haut (40°C) (Torreblanca et al., 1986), et des températures de croissance optimales de 50°C ont été rapportés . Cependant, lors de l'incubation de ces souches, la seule précaution à prendre est d'éviter le dessèchement de la gélose lorsque le temps d'incubation est trop long, ainsi elles doivent être maintenues enveloppées dans des sachets en plastique, ou maintenues dans des récipients en plastique (Dyall-Smith, 2006).

II.3.3. Le pH optimal de croissance

La distribution du la concentration de NaCl et pH optimale des archaea halophile extrême affiche un modèle bifurqué, c.-à-d., beaucoup de souches

présentent un pH optimal près de 7,5 et les autres approchent de pH 9. Les combinaisons de pH optimal de 7,5 avec une concentration optimale $[Na^+]$ de 3.4 M est la plus hautement représentée, suivi par, les combinaisons de pH optimal de 7.3 et 9 avec une concentration optimale $[Na^+]$ de 3.4 M. (browsers et *al.*, 2009) . Un pH neutre semble être le mieux pour la croissance des *halobactéries* non alcalophiles (un pH de 7,2 à 7,5 est vivement recommandé). Pour les haloalcalophiles, leur pH optimal s'étend entre 8,5 et 9,5 (Dyall-Smith, 2006).

II.3.4. Aération

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

III. Biotechnologies des halophiles

Plusieurs enzymes halophiles ont été testées pour des applications biotechnologiques potentielles à savoir des amylases, des nucléases, et des protéases (Oren, 2002). Ces enzymes sont fonctionnelles sous des concentrations de sel élevées où la plupart des protéines sont précipitées ou dénaturées. La plupart des enzymes halophiles sont inactivées et dénaturées à des concentrations de NaCl inférieures à 1M (Joo et Kim, 2005). Cette halotolérance des enzymes peut être exploitée dans toutes les transformations enzymatiques nécessitant une activité de l'eau très basse ou un environnement très salé (Oren, 2002), les domaines les plus importantes sont ;

III.1. Production d'enzymes

III.1.1. Les amylases

Les amylases sont parmi les enzymes les plus importantes en biotechnologie actuelle, Les amylases ont une gamme étendue d'applications dans beaucoup de champs tels que les industries de la saccharification d'amidon, de textile, des aliments, de boulangerie, de brassage et de distillation (Gupta *et al.*, 2003). À cet égard, des amylases halophiles ont été isolées et caractérisées de diverses archées telles que *Haloferax mediterranei* (Pérez-Pomares, 2003), *Haloarcula sp.* (Fukushima *et al.*, 2005).

III.1.2. Protéases

Les protéases microbiennes sont largement étudiées et appliquées dans les processus industriels. Elles sont généralement utilisées comme additifs dans les détergents de blanchisserie, dans la transformation des produits alimentaires, pharmaceutiques et dans les industries de tannage de cuir aussi bien que dans la gestion des déchets (Amoozegar *et al.*, 2007). Des archées halophiles extrêmes productrices de protéases comme *Halogeometricum borinquense* (Vidyasagar *et al.*, 2006).

III.1.3. Les lipases

Les lipases catalysent l'hydrolyse des triglycérides présentant ainsi un intérêt potentiel pour l'industrie des détergents. Boutaiba *et al.*, (2006) ont pu mettre en évidence l'activité lipolytique d'une archaebactérie halophile extrême, *Natronococcus sp.*, qui hydrolyse l'huile d'olive, ayant un intérêt biotechnologique.

III.1.4. Les bêta-galactosidases

Elles dégradent le lactose, utilisé comme excipient (Bonne et Gastenholz, 1989).

III.2. Production de polymères

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

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

III.3. Production de biosurfactants

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

III.4. Production de la bactériorhodopsine

La bactériorhodopsine est une protéine ayant une structure similaire à la rhodopsine de la rétine humaine d'où son utilisation dans la fabrication de rétines artificielles et de modulateurs de lumière spatiale (Oren et al., 1997). Cette protéine joue le rôle d'une pompe qui permet la transformation de l'énergie solaire en énergie chimique (ATP). En effet, elle peut être incorporée dans des membranes synthétiques pour la génération de l'électricité à partir de la lumière solaire. Certains solutés organiques, comme l'éctoïne, sont produits à des concentrations élevées à l'intérieur de beaucoup de micro-organismes halophiles en tant qu'osmorégulateurs. Ces substances sont utilisées comme des stabilisants des biomolécules (enzymes et ADN) (Joo et Kim, 2005).

III.4. Production de substances antibactériennes

III.4.1. Généralités

La production de substances antibactériennes est une caractéristique pratiquement universelle dans les trois domaines de la vie (Shand et Leyva, 2007). Les halocines appartiennent à un groupe de bactériocines produites par des archées halophiles extrême habitants des environnement hyper salin (platas et al., 1996). elles sont produites en grandes variétés et elles ressemblent aux bactériocines des eubactéries (rodriguez-valera et al., 1985)

La première découverte des halocines date de 1982, suite aux travaux de rodriguez-valera qui a mis en évidence l'existence d'un antagonisme parmi les souches d'halophiles isolés des marais salants d'Espagne. Les halocines présentent un large mode d'action (inhibition de la transcription et de la réplication de l'ADN, lyse et déstabilisation de la membrane cellulaire) (Oren, 1999). Par contre, leur spectre d'action est étroit : elles n'agissent que sur les microorganismes phylogénétiquement proches de la souche productrice.

III.4.2. Classification des archaeocine

Le terme « archaeocine » a été inventé pour distinguer les substances antibactériennes de nature protéique produites par les Archées de celles produites par

les membres du domaine Bactéries (Price et Shand, 2000). Les Halocines se caractérisent par une diversité dans leur taille qui s'étend de 3 à 35 kDa, par une stabilité thermique et une dépendance au sel. Leur spectre d'activité est large vis-à-vis des autres haloarchaea. les principales caractéristiques de certaines d'halocines sont résumé dans le tableau annexe.

Selon (Shand et Leyva, 2007), Les halocines sont regroupées en deux familles à savoir les microhalocines dont le poids moléculaire ne dépasse pas 10 kDa et les halocines qui sont des protéines de poids moléculaire supérieur à 10kDa (Tableau II et annexe 3)

Tableau II représentant la classification des archaeocine selon Shand et Leyva, 2007.

| Microhalocines (< 10 kDa) | Halocines (> 10 kDa) |
|--|--|
| Halocine S8 (HalS8) Halocine R1 (HalR1) Halocine H6/H7 Halocine A4 (HalA4) Halocine C8 (HalC8) | Halocine H1 (HalH1) Halocine H4 (HalH4) |

III.4. 3. Application des Halocines

Ces substances ont une large application, notamment dans la conservation des produits alimentaires par salaison (viande, poisson,...) (Oren, 1999).

L'utilisation des halocines comme agents chimiothérapeutiques, actifs contre les germes pathogènes humains ou animaux n'a pas été encore concrétisée, mais vu les centaines de différentes halocines qui restent encore non caractérisées, suggère que d'autres halocines puissent avoir des applications cliniques (Shand et Leyva, 2007). L'inhibition de l'antiport Na^+/H^+ par l'halocine H7 a été montré chez les haloarchaea (Meseguer et *al.*, 1986) et chez certains chiens. Cette halocine peut servir de traitement pour protéger le myocarde contre les effets nocifs de l'ischémie (Shand et Leyva, 2007).

L'étude a été réalisée au laboratoire génie biologique.

I.1. Les échantillons :

Les échantillons d'eau et de sel ayant servi pour isoler les souches, proviennent du Chott El Beida au sud d'Eulma, W. Sétif, Algérie. Les prélèvements ont été effectués le 14 Mars 2012 à 11H30.

Les échantillons ont été apportés au laboratoire de génie biologique en conditions aseptiques. L'eau est conservée à 4°C et les échantillons de sel sont conservés à température ambiante.

Pour l'eau : Les échantillons ont été repartis en 5 tubes de 20ml pour chaque zone

Zone I : à l'intérieur du Chott

Zone II : loin de la rive

Zone III : proche de la rive

Zone IV : très proche de la rive

Pour le sel : Les échantillons ont été stockés dans des sacs en plastique à fermeture hermétique. Ils proviennent de cinq zones différentes qui sont:

Zone I : sel semi sec

Zone II : sel de la rive

Zone III : sel sec

Zone IV : sel humide en formation

Zone V : sel en profondeur

I.2. Milieux de culture

I.2.1. Composition

L'isolement est effectué sur deux milieux de culture afin de rechercher des halophiles extrêmes aérobies se développant à des concentrations en NaCl dépassant les 10%, à pH 7,2.

Deux milieux sont utilisés pour l'isolement et /ou la culture des souches. Il s'agit du milieu Brown (Br7) et milieu complexe(MC7) dont la composition est donné en annexe 2.

I.2.2. Préparation

Pour préparer 1000ml de milieu, on doit d'abord chauffer 700 ml d'eau distillée à 60°C puis on ajoute les sels (le poids à ajouter est mesuré selon la concentration finale voulue en sel) et on ajuste jusqu'à 800ml. La solution est agitée jusqu'à la dissolution totale de sel.

Les ingrédients organiques et l'agar sont dissous dans 150 ml d'eau distillée chauffée à 60°C, puis ajustés jusqu'à 195 ml. La solution est mise sous agitation.

Les deux solutions sont mélangées, le pH est ajusté à 7,2 avec une solution de NaOH à 2N puis stérilisés à 120°C/20min.

Les milieux de culture solides et semi solides sont obtenus par addition de 20 et 8g /l d'agar respectivement au milieu liquide.

Le milieu complexe a été utilisé uniquement pour l'isolement des souches.

I.3. Isolement

I.3.1 Isolement direct (Rodriguez-Valera et al., 1985)

L'isolement a été effectué par étalement de 0,1 ml de l'échantillon d'eau ou des dilutions de sel. Ces dernières ont été effectuées en inoculant 9 ml d'une solution de NaCl à 25 % (p/v) stérile avec 1 ml d'échantillon de sel.

Les boîtes inoculées ont été incubées en aérobie en duplicata, pour deux à quatre semaines, dans des sacs plastiques et la croissance est vérifiée à la fin de chaque semaine.

L'isolement en milieu solide est effectué 37°C.

Les colonies qui sont poussées sur les boîtes ont été comptées à la fin de la troisième semaine.

Nous avons obtenu 25 boîtes sur milieu Brown et le même nombre sur milieu complexe (5 boîtes pour les échantillons de sel et 20 boîtes pour les échantillons d'eau (4 zones avec 5 boîtes chacune).

I.3.2 Isolement par enrichissement

L'isolement a été effectué en inoculant 0,1 ml de l'échantillon d'eau et des dilutions (pour le sel) avec 5ml du milieu dans des tubes de 20 ml. Les cultures sont incubées au bain marie à 40°C sous agitation (110 rpm).

Pour les échantillons de sol, prélevés en 2012, les souches (BGI, BGII, BGIII et BGIV) utilisées dans ce travail ont été revivifiées à partir des boîtes de Petri des souches isolées du sol et qui ont été conservées à 4°C, par repiquage sur milieu Br7 liquide. Elles sont ensuite incubées au bain marie à 40°C sous agitation (110 rpm).

Les quatre zones de prélèvement sont espacées d'environ 10 mètres. Nous avons réalisé l'enrichissement sur 29 tubes pour chaque milieu de culture (20 tubes pour les isolements d'eau, 5 tubes pour le sel et 4 tubes pour la revivification des isolats du sol).

I.4. Purification des souches

Après incubation, la sélection des isolats a été réalisée sur la base des caractères cultureux (couleur, forme, contour, opacité et élévation). Les colonies bien séparées sont ré-isolées plusieurs fois en stries sur des boîtes contenant le même milieu. La pureté des souches est vérifiée par une observation des cellules à l'état frais.

Une colonie de culture pure est transférée dans 10 ml du milieu Br7 liquide et incubée à 40°C sous agitation (110rpm) pendant 5-7 jours afin de les utiliser dans les tests d'activité anti archéenne. Chaque isolat purifié est considéré comme étant une souche à part.

I.5. Souches indicatrices

Les souches archéennes utilisées comme indicatrices ou cibles sont :

-Quatre souches de référence :

- *Halobacterium salinarum* (DSM 3754)
- *Haloferax mediterranei* (DSM 1411)
- : *Haloarcula argentinensis* (DSM 12282)
- *Natrinema pallidum* (DSM 15624):

Ces souches ont été conservées en culture dans le milieu préconisé par DSMZ pour les haloarchées (M372). Elles nous ont été fournies par le laboratoire MCAM du MNHN de Paris. Elles sont relancées en milieu Br7 liquide

-Les souches locales caractérisées par l'ADNr16S

- *Haloarcula sp*(.SH) (souche isolée du lac Ichakaben dans la wilaya de Bejaïa).
- *Natrinema sp* (A9) isolée sol Ichakaben).
- *Haloarcula sp* (2Z) isolée d'un mélange sol+sel d'Idnanen, à Béjaïa.

Les souches A9 et SH sont des souches locales identifiées et affiliées au genre *Natrinema*. La souche 2Z appartient au genre *Haloarcula*. Ces trois souches ont été repiquées sur milieu Brown (Br7).

I.6. Etude morphologique des souches.

I.6.1. Aspect des colonies

Tous les tests ont été réalisés avec des suspensions de cellules d'archées après 4 jours d'incubation.

L'aspect macroscopique est déterminé sur milieu solide Br7 et MC7 pour chaque isolat après 15 jours d'incubation à 37°C.

I.6.1. Observation au microscope

La forme cellulaire et la motilité ont été examinées sur une lame préparée avec une culture liquide en phase exponentielle de croissance à l'aide un microscope optique (Zeiss), disponible au laboratoire.

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

I.7. Recherche de l'activité anti archéenne par la méthode de diffusion en double couche

I.7.1. Recherche de l'activité anti archéenne dans les cultures liquides

La méthode utilisée est rapportée par Meseguer et *al.*, 1986; Torreblanca M et *al.*, 1994. Elle se base sur la capacité des bactériocines à diffuser à travers la gélose. Pour cela, un volume de 5 µl de la souche à tester est déposé en spot sur des boîtes de Petri préalablement ensemencées avec la souche cible (figure 6). L'activité anti archéenne se traduit par l'apparition de zones d'inhibition autour des spots.

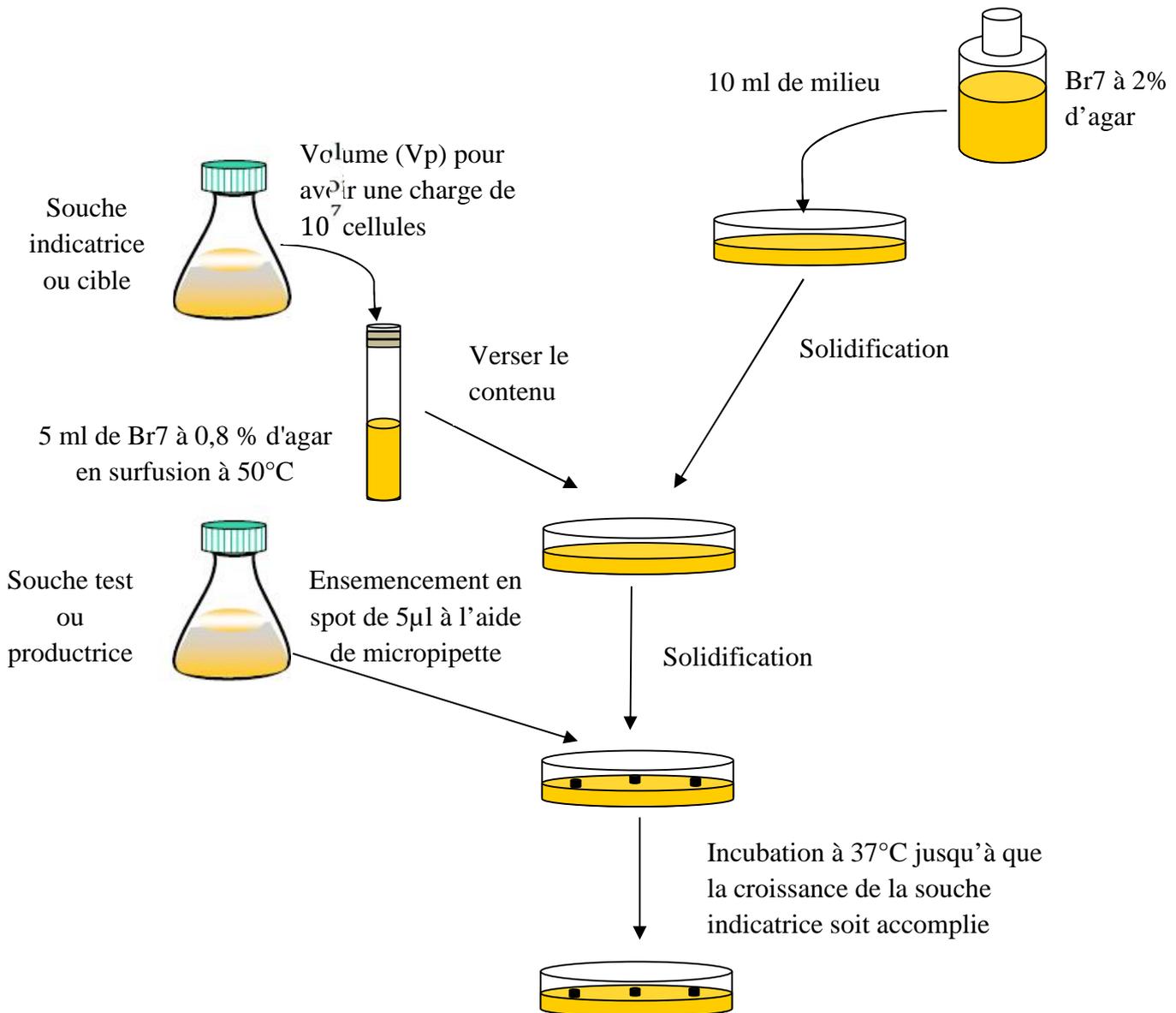


Figure 6 : Test d'activité anti archéenne sur milieu solide

Le volume du germe cible ensemencé doit avoir une charge de 10^7 cellules. Le volume prélevé (Vp) est calculé comme suit :

La DO de la souche cible est mesurée à 600nm.

On doit ensuite chercher le volume de la culture à prélever de façon à avoir DO finale de 0.001. Ceci nous amène à calculer un facteur de dilution comme suit :

$$\text{Facteur de Dilution (FD)} = \text{abs} (\text{à } 600\text{nm}) / 0,001$$

Le volume à prélever est calculé ensuite par rapport au volume de gélose semi solide qui sera inoculé de germe cible.

Volume à prélever (V_p) = Volume gélose molle (5 μ l) / FD

Haloferax mediterranei (DSM 1411) est utilisée comme souche productrice (contrôle positif), la souche *Halobacterium salinarum* (DSM 3754) est utilisée comme souche indicatrice.

I.7.2. Recherche de l'activité anti archéenne dans le culot et le surnageant.

Pour la suite du travail, nous avons sélectionné trois souches sur la base du diamètre d'inhibition obtenu avec la souche indicatrice DSM3754. Il s'agit de BSIII, BGIII et BWII.

Afin de déterminer l'origine intra ou extracellulaire du métabolite actif contre les souches indicatrices utilisées dans cette étude, nous procédons comme suit : 1ml de la souche test a été centrifugé dans des Eppendorf, à 12000 Tr/min (SIGMA) pendant 15min afin de séparer le culot du surnageant. Le culot est re-suspendu dans du milieu neuf (pour servir au test de spot). Le surnageant est mis dans un nouvel Eppendorf stérile. Les fractions récupérées du culot et du surnageant sont déposées en spots en plus de la culture elle-même.

Tous les tests d'activité anti archéenne, ils ont été réalisés deux fois pour la reproductibilité des résultats.

I.7.3. Essai de détermination de la nature de l'activité anti archéenne.

. Les souches précédemment sélectionnées sont utilisées pour inoculer des Erlens de 100ml contenant 30 ml de milieu Br7 et incubées à 40°C sous agitation (110rpm) pendant à 120h (4jours).

I.7.3.1. Traitement par les protéases

Selon **Torreblanca et coll (1994)**, la nature protéique de la substance inhibitrice a été prouvée par inactivation avec des protéases. Le surnageant libre de cellules (SLC) a été traité par une solution de pronase (1mg/ml), solution de trypsine (1 mg/ml) ou solution de proteinase K (1 mg/ml) et laissé pendant 1 heure à la

température de la pièce. L'ensemencement se fait en spot sur des boîtes gélosées contenant la souche indicatrice. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant plusieurs jours. Des boîtes contrôle sont traitées selon le même protocole mais sans protéases pour comparer les zones d'inhibition (Salgaonkar *et al.*, 2012).

Le SLC traité avec les protéases ainsi que ses deux témoins (protéase et SC non traité) ont subi un traitement thermique à 60°C /15min (Hezayen *et al.*, 2001).

I.7.3.2. Effet de la température et du pH sur l'activité.

La stabilité du surnageant à différentes températures a été déterminée en suivant le protocole proposé par Salgaonkar *et coll* (2012) en exposant le SLC à 120°C pendant 15 minutes et 100°C en eau bouillante pendant 10, 30 et 60 min.

La stabilité du SLC à la variation du pH a été déterminée par ajustement du SLC à différents pH : 2.0 ; 4.0 ; 6.0 ; 8.0 et 10.0 à l'aide de la solution NaOH 2M et solution HCl 2M. Le pH du milieu stérile a été ajusté à 7 et utilisé comme contrôle. (Salgaonkar *et al.*, 2012).

1.8. Essai d'identification des souches.

L'identification des isolats a été faite sur la base des tests proposés par Oren *et al.*, (1997) pour la description des nouveaux taxons dans l'ordre des *Halobacteriales*. Les caractères biochimiques, physiologiques (optimum NaCl) et résistance à quelques antibiotiques ont été déterminés pour les trois isolats présentant une activité anti archeenne.

I.8.1 .Tests biochimiques.

- **Recherche de la catalase**

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

-

- **Recherche de l'activité amylolique**

La présence d'activité amylolique sur boîte a été déterminée suivant la méthode décrite par Jayachandra et *al.*, (2012), en utilisant un milieu gélosé qui contient de l'amidon . Après incubation à 37°C pendant 7 jours, la boîte a été inondée avec une solution 0.3% I₂ - 0.6% KI, une zone claire autour de la croissance indique l'hydrolyse de l'amidon.

- **Test de production d'indole**

Le test de production d'indole se fait par l'inoculation de la souche à tester dans un milieu contenant l'eau peptonée exempte d'indole modifié par ajout de quantités appropriées de NaCl (250g/l) et de MgSO₄ (20g/l). Le test positif se manifeste par l'apparition d'un anneau rouge en surface après ajout de quelques gouttes du réactif KOVACS (Burns et *al.*, 2007).

I.8.2. Sensibilité aux antibiotiques

Des boîtes de Petri contenant 10ml de milieu solide sont ensemencées avec 1ml, par inondation, d'une culture de 72 heures à raison de 10⁶ cellules/ml. Le test de sensibilité antibiotique a été réalisé par utilisation de disques imprégnés d'antibiotiques (Oren et *al.*, 1997 ; Duckworth et *al.*, 2000). Les antibiotiques utilisés sont(: la pénicilline (10 UI), le chloramphénicol (30 µg), la rifampicine (30 µg) et la tétracycline (10 g). La souche est considérée sensible si la zone d'inhibition dépasse au moins deux mm autour du disque après 14 jours d'incubation à 37°C (Bonelo et *al.*, 1984).

I.8.3. Détermination de l'optimum de salinité

Des milieux de croissance contenant des concentrations de NaCl de 10, 15, 20, 25, et 30 % ont été utilisés pour déterminer l'exigence des isolats en NaCl. Les cultures sont incubées à 37°C pendant 144 h. la croissance est mesurée par spectrophotométrie (absorbance à 600 nm) à intervalles de 24 heures. La lyse cellulaire à des concentrations basses en NaCl a été confirmée par examen microscopique des cellules et par réduction de la turbidité des cultures.

II .1. Isolements

II .1.1. Isolement direct

Après plusieurs ré-isolements et repiquages sur le même milieu (Br7 solide) en aérobie à 37°C, les colonies pures ont été mises en culture sur milieu Br7 liquide.

Les colonies ont pris 1-3 semaines pour bien pousser sur milieu Br7 solide. Toutefois, les premières colonies sur milieu complexe ne sont apparues qu'au bout de la deuxième semaine et il a fallu 4 semaines pour avoir une bonne croissance. Le nombre de colonies est plus élevé sur milieu Br7 que sur milieu complexe.

Selon Schneegurt (2012) quand on travaille avec les échantillons de l'environnement hébergeant des communautés de populations microbiennes nouvelles, les milieux et les conditions de croissance choisies enrichissent pour certaines populations et pas pour d'autres, ce qui explique la légère différence des résultats obtenus sur les deux milieux utilisés (Br7 et MC7). Généralement, les halophiles extrêmes sont représentés d'une manière prédominante par des archées et sont mises en culture à la température de 37°C avec des salinités de 20% ou plus.

D'après Bowers et Wiegel (2011), 63% des espèces d'archées halophiles extrêmes ont des températures optimales de croissance comprises entre 37 et 40°C.

Les isolats sont désignés selon un code composé de lettres (B : Beida, S : sel, G : ground (sol), W : water (eau) et de numéros provenant de différentes zones de prélèvements (I, II, III, IV).

Le plus grand nombre de colonies isolé a été observé sur Br7 (BSI, BSIII, BWI et BWII (Tableau III), par contre, nous avons observé une faible croissance dans la zone IV de l'échantillon d'eau.

Tableau III: Dénombrement des colonies des échantillons d'eau sur milieu Br7 après 3 semaines.

| Echantillons d'eau | Nombres de colonies en UFC | | | | |
|--------------------|----------------------------|--------|--------|--------|--------|
| | Tube 1 | Tube 2 | Tube 3 | Tube 4 | Tube 5 |
| Zone 1 | 90 | 75 | 50 | 110 | 80 |
| Zone 2 | 60 | 90 | 60 | 20 | 30 |
| Zone 3 | 30 | 25 | 60 | 30 | 50 |
| Zone 4 | 10 | 7 | 12 | 4 | 0 |

Nous avons remarqué que la croissance des isolats issus du sel est nettement plus rapide que celle des isolats de l'eau (observation de premières colonies des isolats du sel au bout de 8 jours. Cependant les premières colonies des isolats de l'eau sont apparues au bout de 11 jours. Les colonies isolées du sel sont plus nombreuses que celles isolées de l'eau. Il a été rapporté que la croissance microbienne dans les milieux de haute salinité est souvent lente, donc ce n'est pas exceptionnel d'obtenir des cultures au bout de semaines plutôt que de jours (Schneegurt, 2012)

Tableau IV : dénombrement des colonies des échantillons de sel sur milieu Br7 et milieu complexe après 3 semaines.

| Echantillons d'eau | Nombres de colonies en UFC | | | | |
|--------------------|----------------------------|--------|--------|--------|--------|
| | Zone 1 | Zone 2 | Zone 3 | Zone 4 | Zone 5 |
| Milieu Br7 | 90 | 65 | 40 | 60 | 70 |
| Milieu MC7 | 35 | 15 | 25 | 40 | 35 |

Toutes les colonies obtenues sur les boîtes ont montré des pigmentations différentes de couleurs rouge, orange et pourpre.

Une étude de la chromogénèse est nécessaire pour identifier la substance responsable de cette couleur. Les images ci-dessous représentent les colonies des souches étudiées photographiées à l'aide d'un appareil photo numérique11.

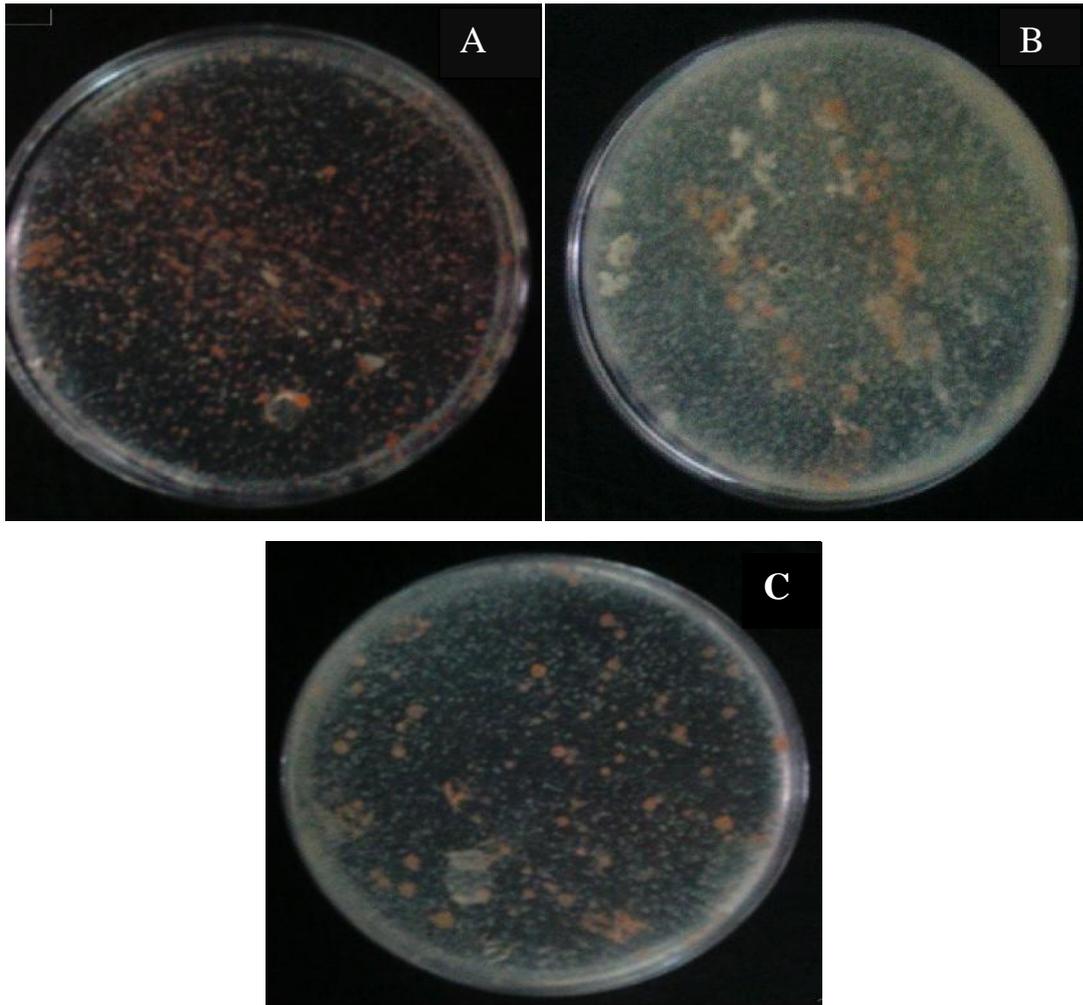


Figure 7 : Isolements à partir des échantillons de sel : BSIII sur milieu Br7 solide(A) et sur milieu complexe (B), et isolements à partir d'échantillons d'eau : BWII sur Br7(C).

II.1.2. Isolements par enrichissement

Nous avons observé des troubles dans les tubes indiquant une croissance sur la majorité des échantillons d'eau et de sel au bout de 7 jours sauf pour la zone 4 de l'échantillon. Les troubles ont été observés après 9 jours d'incubation au bain marie à 40°C sous agitation à 110rpm

II.2. Revivification des souches

Pour les souches revivifiées à partir des stocks gélosés, nous avons eu des troubles au bout du cinquième jour. Nous avons noté que les souches purifiées sont poussées plus rapidement que les isolements effectués sur milieu liquide en raison de

la phase de latence qui est plus courte chez les souches revivifiées du fait qu'elles ont été conservées sur le même milieu que le milieu de culture (Br7)

Sous des conditions optimales de croissance, les cultures liquides sont de couleur rose. Selon Burns et coll., 2007, à hautes densités cellulaires, les pigments caroténoïdes des haloarchées donnent souvent une couleur rose distinctive aux milieux liquides. Ils sont partiellement responsables des pigmentations roses typiques des lacs salins et des étangs hautement concentrés en sel où ils prédominent (Ventosa et al., 1999).



Figure 8 : photo des douze (12) souches sélectionnées pour les tests d'activité anti archéenne sur milieu Br7 liquide

Un total de 12 souches ont été sélectionnées selon l'aspect des colonies et la pigmentation pour les tests d'activité anti archéenne dont 8 souches nouvellement isolées à partir des échantillons environnementaux (4 souches pour le sel (BSI, BSII, BSIII, BSIV), 4 souches pour l'eau (BWI, BWII, BWIII, BWIV) et 4 souches isolées du sol en 2012 et revivifiées (BGI, BGII, BGIII, BGIV).

La présence de communautés des membres de la famille des *Halobacteriaceae* dans les environnements hyper-salins peuvent être souvent observés à l'œil nu grâce à la coloration rouge, orange, ou pourpre des milieux de croissance (Oren, 2006). La pigmentation due à la présence de la bactériorubérine

(C50-carotenoids) est un trait qui caractérise en général les archées halophiles extrêmes (Grant et *al.*, 2001 ;Rodriguez-Valera, 1993)

II.3. Les souches de référence et les souches locales identifiées antérieurement.

Les souches de référence repiquées sur milieu solide ont pris 9 jours pour bien pousser. Cependant, sur milieu liquide, les troubles ont été observés au bout de 7 jours.

II.4. Identification morphologique des souches purifiées

II.4.1. Aspect des colonies :

Afin de déterminer quelques caractéristiques des souches étudiées, nous avons d'abord analysé la morphologie de ces isolats, après 10 jours d'incubation à 37 °C. Les colonies des souches sélectionnées sont généralement rondes d'un diamètre d'environ 0.5 à 2 mm, surface lisse, avec un contour régulier et bombées.

Certaines souches sont opaques et d'autres sont translucides. L'aspect opaque des colonies indique la présence de vacuoles à gaz à l'intérieur des cellules (Joo et Kim, 2005) (annexe 4).

Ces observations correspondent à celles des souches des *Halobacteriaceae* (Oren et *al.*, 2012).

II.4.2. Observation microscopique des souches :

L'observation à l'état frais des formes des cellules ainsi que leur mobilité a révélé que la plupart des cellules étaient des coques de taille variable et des bâtonnets irréguliers. Selon (Grant et *al.*, 2001), ce pléomorphisme est une autre propriété des archées halophiles extrêmes. On a observé aussi que quelques souches étaient mobiles.

La coloration de Gram réalisée selon la technique de Dussault (1955) a donné un résultat négatif pour toutes les souches étudiées. Les résultats coïncident avec ceux des *Halobacteriaceae* décrits dans le Bergey's manuel (Grant et *al.*, 2001).

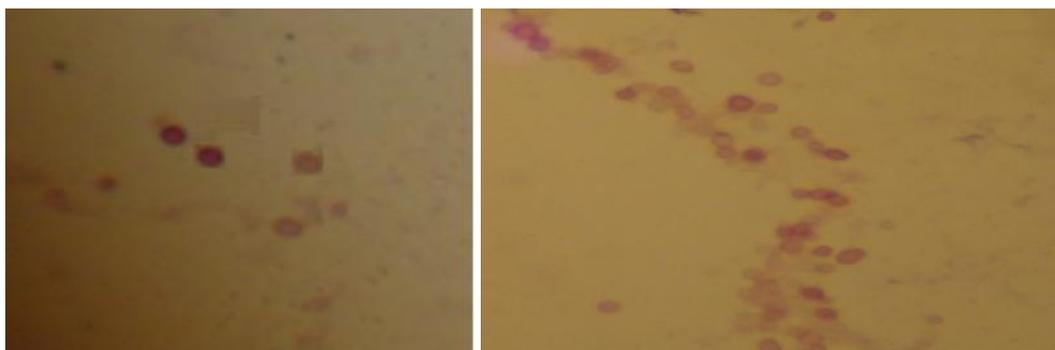


Figure 9 : Photos microscopiques de quelques souches halophiles extrêmes étudiées (BWII, BSIII) (Forme et Gram) (Grossissement 10x100)

II.5. Recherche de l'activité anti archéenne des souches isolées

II.5.1. Recherche de l'activité anti archéenne dans les cultures liquides des souches isolées

Les tests d'activité effectués par la méthode de diffusion en double couche ont permis de montrer que les 12 souches ont une activité inhibitrice vis-à-vis des souches cibles utilisées. Les résultats sont illustrés dans le tableau V et la figure 10.

Tableau V : résultats des tests d'activité anti archéenne.

| les souches productrices | Les souches indicatrices (diamètre d'inhibition en mm) | | | | | | |
|--------------------------|--|---------|----------|----------|----|----|----|
| | DSM3754 | DSM1411 | DSM12282 | DSM15624 | 2Z | SH | A9 |
| BSI | 25 | - | - | - | - | 10 | - |
| BSII | 20 | 8 | - | - | 10 | - | - |
| BSIII | 40 | 15 | 12 | - | 35 | 15 | 18 |
| BSIV | 22 | 10 | 18 | - | - | - | 8 |
| BGI | 23 | - | - | - | 15 | 12 | 18 |
| BGII | 15 | - | 8 | - | - | - | - |
| BGIII | 35 | 23 | - | - | 18 | 12 | 10 |
| BGIV | 18 | - | - | - | - | - | - |
| BWI | 15 | 12 | - | - | - | - | 10 |
| BWII | 35 | 20 | 10 | - | 15 | 8 | - |
| BWIII | 12 | - | 15 | - | 12 | - | - |
| BWIV | 10 | - | - | - | - | - | - |



Figure 10 : Quelques photos illustrant l'activité anti archéenne des quelques souches vis-à-vis de DSM3754

Les résultats obtenus montrent que toutes les souches ont une activité inhibitrice vis-à-vis de DSM3754 avec des spectres d'inhibition allant de plus faible (10mm ; BWIV) au plus large (40mm BSIII). Par contre, on n'a observé aucune activité sur la souche DSM15624.

Selon Platas et All (1996), l'une des caractéristiques importantes des bactériocines est qu'elles inhibent seulement les micro-organismes phylogéniquement proches de la souche productrice. Ceci est donc en faveur de la présence d'isolats faisant partie des archées halophiles extrêmes.

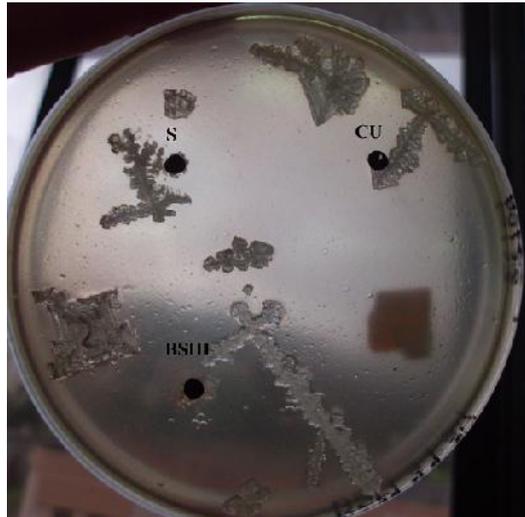
Les souches BSIII, BGIII et BWII présentent des activités anti archéennes vis-à-vis de 6, 5 et 5 souches cibles et qui sont respectivement DSM3754 (*Halobacterium salinarum*), DSM1411 (*Haloferax mediterranei*) et le genre *Haloarcula* (DSM12228, 2Z et Natrinema SH).

D'après les travaux de Platas et al (1996) portant sur l'halocine H1 de *Haloferax mediterranei*, il a été suggéré que Halocin H1 était très active contre deux des quatre espèces du genre *Haloferax* testées. Les deux souches de *Halobacterium salinarum* testées sont considéré sensibles. Deux espèces du genre *Haloarcula* ont montré une sensibilité modérée. De même pour les travaux de Price et Shand (2000) sur l'halocine S8 qui s'est trouvé active sur *Halobacterium salinarum* et *Haloferax mediterranei* seulement. Ceci rend les trois souches BSIII, BGIII et BWII d'une importance primordiale pour une éventuelle production d'halocine à large spectre d'inhibition.

Ces trois souches BSIII, BGIII et BWII ont été sélectionnées pour la suite de l'étude.

II.5.1. recherche de l'activité anti archéenne dans le culot et le surnageant

L'inhibition des souches cibles est due aux métabolites qui diffusent à travers la gélose. Ces métabolites peuvent être excrétés en dehors de la cellule productrice (agent extracellulaire), donc, en milieu



liquide, on les trouvera dans le surnageant, soit ils sont adsorbés à la paroi cellulaire. Par conséquent, on les trouvera dans le culot.

Les résultats des tests d'activité effectués sur le surnageant des souches BGIII et BWII ont montré des zones d'inhibition d'un diamètre de 15 et 12 mm respectivement autour des spots (figure 11). De même pour le culot, on a observé des zones d'inhibition de 10 et 8 mm. Cela est probablement dû à une faible concentration de l'agent anti archéen adsorbé aux cellules puisque la grande partie a été excrétée dans le milieu, ce qui a donné un diamètre d'inhibition du surnageant plus large que celui du culot.

Il y'a lieu de signaler que selon Salgaonkar et *al* (2012), les halocines sont des peptides antimicrobiens qui sont produits pendant la phase stationnaire de la croissance, donc il est nécessaire d'établir une cinétique de croissance dans le but de déterminer le temps d'incubation des cultures pour la production de substances antibactériennes. On évite ainsi d'avoir des activités dans le surnageant et le culot en même temps.

Pour la souche BSIII, Les résultats obtenus sur le surnageant étaient positifs avec un diamètre d'inhibition de 18mm. Par contre, aucune zone d'inhibition n'est observée avec les tests effectués sur le culot. Ce résultat suggère que le métabolite antimicrobien est faiblement concentré et qu'il ne s'adsorbe pas sur les cellules.

Nos résultats coïncident avec les observations de Meseguer et coll (1986) qui ont noté que la famille *Halobacteriaceae* est connue pour sécréter un peptide antibiotique (halocine), par conséquent nos souches appartiennent à cette famille.



Figure 11 : photos des tests d'activité de la culture, culot ainsi que surnageant des souches BGIII (gauche) et BSIII (droite).

II.6. Essai de détermination de la nature de l'activité anti archéenne.

Pour vérifier les hypothèses sur la nature de l'agent anti archéen, plusieurs tests ont été effectués sur les surnageants obtenus à partir des trois souches (BSIII, BGIII, BWII).

II.6.1. Action des protéases.

Le surnageant a été traité avec des protéases pour déterminer si l'activité inhibitrice est de nature protéique et qu'elle n'est pas due à la présence d'un métabolite toxique ou une autre substance non-protéique (Price et Shand, 2000).

La possibilité que les souches cibles soient inhibées par les protéases utilisées, nous a amené à faire des spots témoins contenant les enzymes testées dans chaque boîte de Petri. Ces tests se sont révélés négatifs.

Les résultats obtenus ont montré des zones d'inhibition autour des spots contenant le SLC pour les trois souches utilisées (Figure 12). Par contre, les SLC traité par les protéases ont perdu leur activité inhibitrice vis-à-vis de la souche DSM3754, ce qui est traduit par l'absence de zones d'inhibition autour des spots. La perte de l'activité inhibitrice confirme le caractère protéique de l'agent anti archéen produit par les trois souches.

Après traitement par la pronase, pepsine ou protéinase K, les zones d'inhibition ont totalement disparu. Ces résultats confirment ceux rapportés par Torreblanca et coll (1994) qui ont signalé que la perte des zones d'inhibition indique la nature protéique de la substance inhibitrice, Sur cette base, on peut supposer que les activités montrées ici sont dû à la production d'halocines.

Figure 12 : photos illustrant les activités des surnageants des souches BSIII (gauche) et BGIII (droite), S (surnageant), SK (surnageant traité par protéinase K), Pe (pepsine), Pr (pronase), K (protéinase K), SPe (surnageant traité par pepsine), SPPr (surnageant traité par pronase).



(pepsine), Pr (pronase), K (protéinase K), SPe (surnageant traité par pepsine), SPPr (surnageant traité par pronase).

II.6.2. Effet de la température et du pH sur l'activité.

Des zones d'inhibition des surnageants des souches BGIII, BSIII et BWII ont été observées après leur traitement à 100°C pendant 10min (figure 13). Cependant, les autres tests réalisés se sont révélés négatifs (tableau VI).

L'intervalle de pH permettant une activité du surnageant se situe entre 4 et 8 pour les souches BSIII et BGIII. Cependant, le SLC de la souche BWII ne tolère que les pH 6 et 8. Les surnageants des trois souches ajustés aux pH 2 et 10 n'ont montré aucune zone d'inhibition (tableau VI).



Figure 13 : Résultat du test de traitement par la chaleur à 100°C pendant 10 min.

Tableau VI : Résultats des traitements par la chaleur et le pH

| Les traitements | Activité des souches | | |
|---------------------|----------------------|-------|------|
| | BSIII | BGIII | BWII |
| Chaleur | | | |
| 100°C pendant 10min | + | + | + |
| 100°C pendant 30min | - | - | - |
| 100°C pendant 60min | - | - | - |
| 120°C pendant 20min | - | - | - |
| pH | | | |
| 2 et 10 | - | - | - |
| 4,6 et 8 | + | + | + |

+ : Présence d'activité - : Absence d'activité

Les résultats observés sur les trois souches coïncident avec les résultats obtenus par (Salgaonkar et *al.*, 2012) sur deux souches de la famille des *Halobacteriaceae*, (*Har. japonica* et *Hfx. Volcanii*), sauf pour les tests de traitements par chaleur à 100°C pendant 30 min. Dans notre étude, les substances anti archéennes présentes dans les surnageants se sont révélées inactives après traitement à 100°C pendant 30min.

II.7. Essai d'identification des souches actives.

II.7.1. Tests biochimiques

Toutes les souches étudiées sont catalase positive. L'hydrolyse de l'amidon est effectuée par toutes les souches testées. L'hydrolyse de l'amidon a été observée chez de nombreuses halobactéries(Oren et *al.*, 1999 ; 2002).

Toutes les souches ne produisent pas d'indole. Ces résultats des critères étudiés coïncident avec ceux des *Halobacteriaceae* décrits dans le Bergey's manuel (Grant et *al.*, 2001). Les résultats sont résumés dans le tableau VII.

Tableau VII représentant les résultats des tests biochimiques effectués

| Les souches à tester | Les tests biochimiques effectués | | |
|----------------------|----------------------------------|--------|--------|
| | Catalase | Amidon | Indole |
| BSIII | + | + | - |
| BGIII | + | + | - |
| BWII | + | + | - |

(-) test négatif (+) test positif

II.7.2. Sensibilité aux antibiotiques

Les antibiotiques qui inhibent les archées sont différents de ceux qui inhibent les bactéries (Oren, 2002). Toutes les souches sont insensibles à la pénicilline : antibiotique agissant sur la synthèse du peptidoglycane pariétal.

Les souches BGIII et BWII sont insensibles au Chloramphénicol et à la tétracycline mais elles montrent des zones claires autour des disques de la rifampicine. Cependant, la souche BSIII s'est montrée résistante à tous les antibiotiques. Ces résultats suggèrent que les souches étudiées appartiendraient aux archées halophiles extrêmes (Grant et *al.*, 2001; Elevi et *al.*, 2004). Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau VIII.

Tableau VIII : les résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques

| Souches | Antibiotiques testés | | | |
|---------|----------------------|------------------------|--------------------------|-------------------------|
| | Pénicilline (P10) | Rifampicine (Rif 5) | Chloramphénicol (C30) | Tétracycline (TE 30) |
| BGIII | R | S | R | R |
| BSIII | R | R | R | R |
| BWII | R | S | R | R |

(R) résistante (S) sensible

II.7.3. Détermination de l'optimum de salinité

Les résultats montrent que des différences ont été trouvées dans l'absorbance des souches à 600 nm . Elles pourraient être dues à la capacité de former des agrégats pendant la croissance, ce qui rend la mesure de la DO difficile.

Cet obstacle rend ces tests non exploitables. Par conséquent, on a contourné ce problème en faisant des dilutions afin de diminuer la charge cellulaire.

Les souches archéennes étudiées sont poussées dans des milieux de culture dont la concentration en NaCl a atteint 30 % (p/v) (5,2 M). Bowers et Wiegel (2011) ont rapporté que la concentration minimale NaCl pour la croissance des halophiles extrêmes est de 1.7 M, ou l'équivalent de 10% NaCl (w/v).

Les résultats obtenus montrent que les souches étudiées présentent des optimums de croissance à 25 % de NaCl. La concentration optimale en NaCl dans le milieu est celle qui présente la densité optique la plus élevée (figure 14, 15 et 16). Les cellules se lysent en eau distillée.

En comparant ces résultats à la classification de Kushner, 1992, il apparaît clairement que les souches étudiées appartiennent au groupe des halophiles extrêmes. Aux salinités proches de la saturation, la majorité de micro-organismes sont des archées halophiles extrêmes qui appartiennent à la famille *Halobacteriaceae* (Oren, 2002)

Une autre considération à noter ; la culture sur milieu liquide réalisée à différentes concentrations de NaCl a montré que la pigmentation des milieux de culture variait selon la salinité, la pigmentation rouge est augmentée lorsque la salinité diminue et de même lorsque la salinité augmente, la pigmentation devient moins intense (Rodriguez-Valera et *al.*, 1985 ; Schneegurt, 2012).

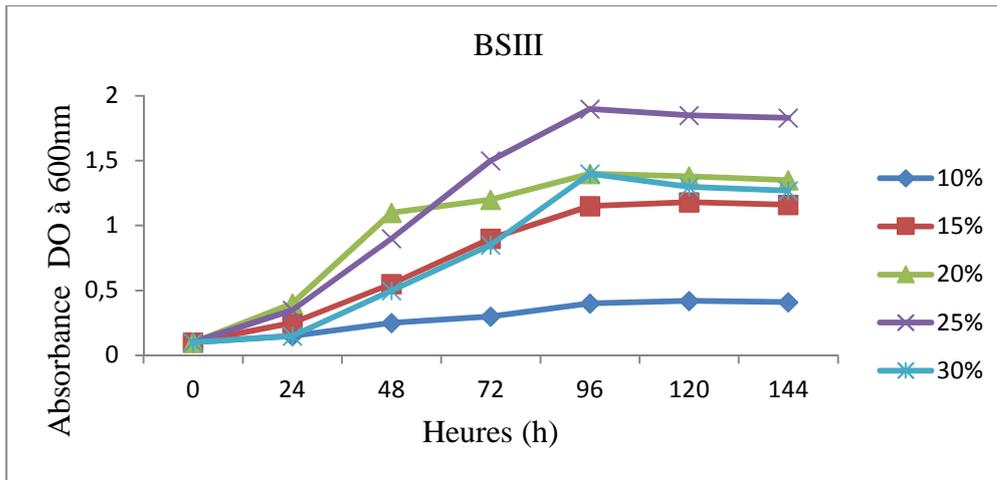


Figure 14 : Croissance de la souche BSIII à différentes concentration de NaCl

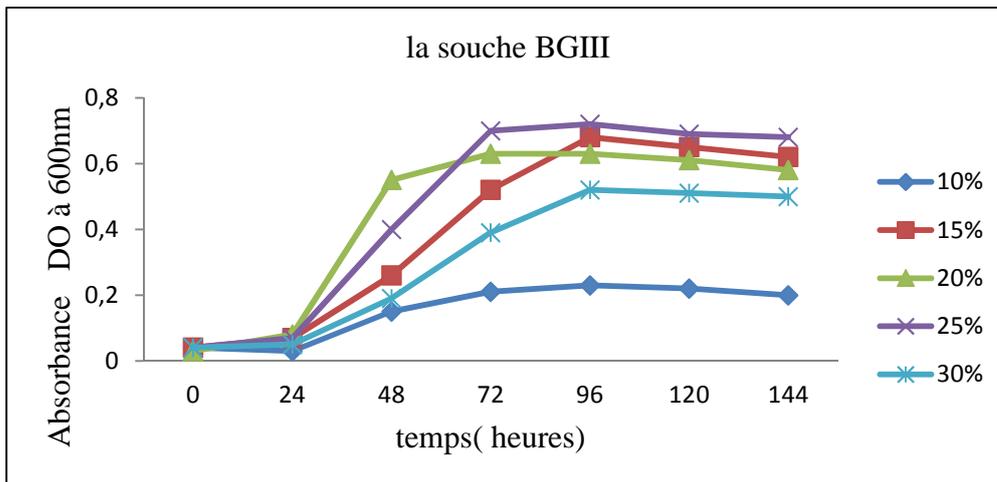


Figure 15 : Croissance de la souche BGIII à différentes concentration de NaCl

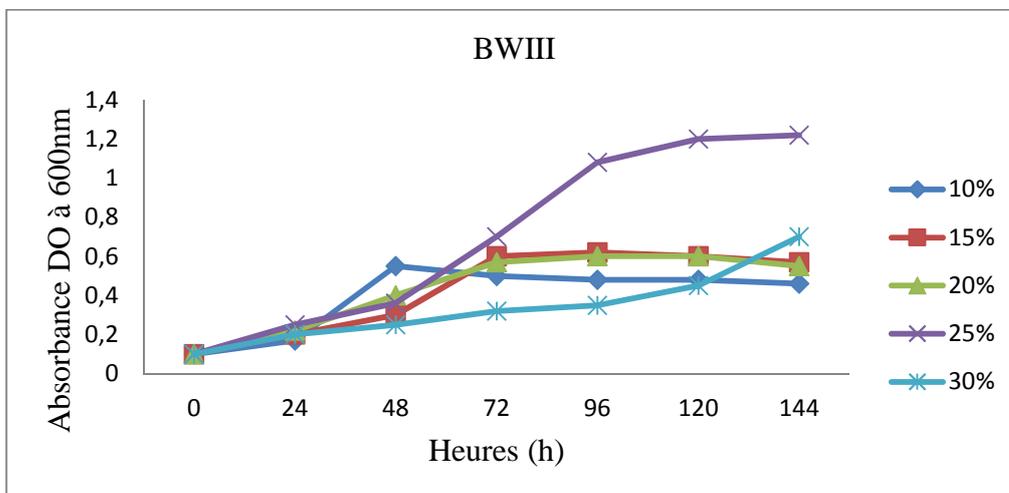


Figure 16 : Croissance de la souche BWIII à différentes concentration de NaCl

Dans notre étude, nous avons recherché des souches d'archées halophiles extrêmes locales productrices de substances antiarchéennes. Les isollements à partir des échantillons conservés au laboratoire ont abouti à la sélection (sur la base de la pigmentation) d'une douzaine de souches se développant à de fortes concentrations en sel (25% NaCl).

Des milieux de culture spécifiques aux archées halophiles extrême (Br7 et MC7) ont servis à l'isolement et à la caractérisation des isolats. Les souches pures sont caractérisées phénotypiquement puis soumises à une recherche d'activité antiarchéenne.

Les tests d'activité antiarchéenne ont été effectués sur les douze souches sélectionnées vis-à-vis sept souches indicatrice (quatre souches de référence et trois souches locales caractérisées par l'ADNr16S). Toutes les souches testées se sont révélées douées d'une activité inhibitrice vis-à-vis d'au moins une souche indicatrice avec des zones d'inhibition qui sont parfois importantes allant jusqu'à 40mm de diamètre (BSIII). Trois souches performantes ont été sélectionnées (BSIII, BGIII et BWII).

Les substances antiarchéennes produites par la souche sélectionnées BSIII a été mises en évidence dans le surnageant seulement, cependant, pour les deux autres souches (BGIII et BWII), l'activité a été mises en évidence dans le surnageant et le culot, toutefois, le spectre d'inhibition du SLC est plus large que celui de culot.

La perte de l'activité antiarchéennes des SLC des trois souches après un traitement à la pronase, pepsine ou protéinase K suggère que cette activité est due à la présence d'une substance antiarchéenne de nature protéique.

L'apparition de zones d'inhibition autour des spots contenant le SLC des trois souches traité à 100°C pendant 10min ont montré que les substances antiarchéennes résiste a la chaleur mais pour une courte durée (10 min).

Les résultats obtenus après le traitement des surnageants à un intervalle de pH allant de 2 à 10 ont montrés les substances actives sont résistantes à la variation du Ph allant de 4 à 8 pour les deux souches BSIII et BGIII, par contre, pour le surnagent de la souche BWII, la substance s'est montré active aux Ph 6 et 8 seulement.

Conclusion et perspectives

Suite à cette étude, il apparaît clairement que les méthodes culturales et moléculaires sont parfaitement complémentaires et nécessaires à l'étude de la diversité microbienne d'un écosystème, il serait particulièrement intéressant de poursuivre l'identification des souches.

La recherche d'intérêt biotechnologique de ces souches faisait partie des objectifs fixés dans cette étude. Les résultats obtenus nous incitent, dans le futur, à Purifier ces substances actives et d'approfondir leur caractérisation notamment leur nature chimique.

Essaie d'élargissement de spectre d'activité aux germes pathogènes et halophiles contaminant des produits salés.

Annexe 1

Matériel utilisé

- Microscope électronique à balayage (FEI Quanta 200)
- Spectromètre à absorption atomique (Thermo-Scientific ICE 3500)
- Spectro à flamme
- Autoclave ALFA-10-PLUS (PBI International)
- Spectrophotomètre (SHIMADZU)
- GPS (GARMIN)
- Four Pasteur (RAYPA)
- Etuve (MEMMERT)
- pH mètre combiné thermomètre pH700 (EUTECH Instruments)
- Bain marie agitateur (IKA Labortechnik)
- Bain marie (RAYPA et Julabo TW12)
- Centrifugeuse (SIGMA 1-14)
- Vortex ZX3 (VELP Scientifica)
- Plaque chauffante agitatrice (RAYPA)
- Balance électronique CS200 (OHAUS)
- Microscope Optique (ZEISS)
- Réfrigérateur
- Becs Benzène
- Portoirs de tubes
- Tubes à essai (20ml)
- Tubes de culture en plastique stériles (10ml)
- Boîtes Pétri
- Erlenmayer
- Becher
- Fiole graduée
- Eprouvette graduée
- À Flacons
- Seringues (60ml)
- Pipettes (5ml et 10ml)
- Pipettes Pasteur
- Micropipettes (ACCUMAX)
- Embouts jaunes
- Embouts bleus
- Eppendorfs

- Anse de platine
- Anses en plastique jetables
- Lames et lamelles
- Spatule

Produits utilisés :

- Acide acétique (2%)
- Ethanol (70%)
- Fuschine
- Violet de gentiane
- Chlorure d'hydrogène (HCl) (2N)
- Hydroxyde de sodium (NaOH) (2N et 1N)
- Hydroxyde de potassium (KOH)
- Phosphate de potassium (KPO₄)
- Chlorure de calcium (CaCl₂)
- Acide sulfurique (H₂SO₄)
- Iodo-ioduré (Iugol)
- Phénolphtaléine
- Méthyle orange
- Murexide
- EDTA
- Réactif KOVACS

Souches utilisées :

Souches indicatrices

- *Halobacterium salinarum* (DSM 3754) ;
- *Haloferax mediterranei* (DSM 1411) ;
- *Haloarcula argentinensis* (DSM 12282) ;
- *Natrinema pallidum* (DSM 15624) ;

Les souches locales caractérisées par l'ADNr16S

- *Haloarcula* sp(.SH) (souche isolée du lac Ichakaben dans la wilaya de Bejaïa).
- *Natrinema* sp (A9) isolée sol Ichakaben).
- *Haloarcula* sp (2Z) isolée d'un mélange sol+sel d'Idnanen, à Béjaïa.

Annexe 2

Milieux de culture (en g/l)

Milieu BROWN : (pH=7)

- NaCl.....250
- Extrait de levure.....5
- KCl.....2
- Citrate Tri-Sodique.....3
- MgSO₄.....20
- Agar.....20

Milieu Complexe : (pH=7)

- NaCl.....250
- Extrait de levure.....5
- Extrait de viande.....2
- Peptone.....5
- KCl.....2
- Citrate Tri-Sodique.....18
- MgSO₄.....20
- Agar.....20

Milieu à base d'amidon : (pH=7)

- NaCl.....250
- Extrait de levure.....5
- KCl.....2
- Citrate Tri-Sodique.....3
- MgSO₄.....20
- Amidon.....10
- Agar.....20

Annexe 3

Caractéristiques de quelques halocines

| Halocine | Genre Productisant | Poids Moléculaire (KDa) | Relation avec le sel | Relation avec la température | Autres caractéristique | Références |
|----------|------------------------------|-------------------------|----------------------|------------------------------|---|---|
| H4 | Haloferax Méditerranéi | 28 | Sel dépendant | Thermolabile | La transcription de l'Halocine H4 est présente à un niveau bas durant la phase stationnaire | Mesegur (1985) Oren (2000) Torreblanca (1989) |
| H6 | Haloferax gibbonsii | 32 | Non sel dépendant | Thermostable | Sensible à la pronase, pas à la trypsine Son activité diminue durant la phase stationnaire Effet bactéricide qui s'accompagne de lyse cellulaire | Oren (2000) Torreblanca (1989) |
| Hal R1 | Halobacterium SP GN 101 | 6,2 | Non sel dépendant | Thermostable | Elle est active pendant un temps prolongé Effet bactériostatique | Oren (2000) |
| S8 | Halobacterium SP | 2,8 | Non sel dépendant | Thermostable | Son activité diminue durant la phase stationnaire Comprend 36 acide aminés | Oren (2000) Price et Shand |
| HI | Haloferax Méditerranéi Xia 3 | 31 | Sel dépendant | - | Active vis-à-vis les Gram négatifs Ces conditions physico-chimique optimale sont similaires à celles du milieu d'isolement sont :20% de NaCl et une température(37-42°C | Platas (1996) Torreblanca (1989) Oren (2000) |

Annexe 4

Caractéristiques des colonies des douze souches sélectionnées

| Souches | Etats frais | | Couleur | Conteur | Opacité | Elévation | Surface | Coloration Gram |
|---------|-------------------|----------|---------|----------|-------------|-----------|---------|-----------------|
| | Forme | Mobilité | | | | | | |
| BSI | Bâtonnet arrondis | + | rouge | régulier | translucide | Peu bombé | lisse | - |
| BSII | cocci | - | orange | régulier | translucide | Peu bombé | lisse | - |
| BSIII | Bâtonnet arrondis | + | rouge | régulier | translucide | Peu bombé | lisse | - |
| BSIV | cocci | - | orange | régulier | translucide | bombé | lisse | - |
| BGI | Bâtonnet | + | orange | régulier | translucide | Peu bombé | lisse | - |
| BGII | Bâtonnet | + | orange | régulier | translucide | Peu bombé | lisse | - |
| BGIII | Bâtonnet | + | orange | régulier | translucide | Peu bombé | lisse | - |
| BGIV | Bâtonnet arrondis | + | rouge | régulier | translucide | Peu bombé | lisse | - |
| BWI | cocci | - | rouge | régulier | opaque | bombé | lisse | - |
| BWII | cocci | - | rouge | régulier | translucide | bombé | lisse | - |
| BWIII | Bâtonnet arrondis | + | orange | régulier | opaque | bombé | lisse | - |
| BWIV | cocci | - | rouge | régulier | opaque | bombé | lisse | - |

A

Amoozegar MA, Fatemi ZA, Karbalaee-Heidari HR et Razavi MR. (2007). Production of an extracellular alkaline metalloprotease from a newly isolated, moderately halophile, *Halohalobium* sp. strain AF-2004. *Microbiol Res* .162,369-377.

B

Baati H, Guermazi S, Amdouni R, Gharsallah N, Sghir A, Ammar E.(2008). Prokaryotic diversity of a Tunisian multipond solar saltern. *Extremophiles*. 12:505–518

Bonelo G, Ventosa A , Megás M et Ruiz-Berraquero F. (1984). The sensitivity of halobacteria to antibiotics. *FEMS microbiology letters*.21(3), 341-345.

Boone DR et Castenholz. (1989). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Ed. New York, 600p.

Boutaiba S,Bhatnagar T,Hacene H,Mitchell DA et Baratti JC. (2006). Preliminary characterisation of lipolytic activity from an extremely halophilic archaeon, *Natronococcus* sp. *J.of Molecular catalysis B:Enzymatic*.41,21-26.

Burns DG,Janssen PH,Iton T,Kamekura M,Li Z,Jensen G,Rodriguez-Valera F,Bolhuis H et Dyall-Smith ML.(2007). *Halosquadratum walsbyi* gen.nov, sp, nov, the square haloarchaeon of Walsby, isolated from saltern crystallizers in Australia and Spain. *Int J,Syst Evol, Microbiol*.57, 387-392.

Bowers KJ, Mesbah NM et Wiegel J. (2009) .Biodiversity of polyextremophilic bacteria: does combining the extremes of high salt, alkaline pH and elevated temperature approach a physicochemical boundary for life? *Saline Syst* 5,9.

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

C

Cayol JL, Ollivier B, Patel BKC, Prensier G, Guezennec J et Gracia JL. (1994). Isolation and characterization of *Halothermothrix orenii* gen. nov, sp, nov, a halophilic, thermophilic, fermentative, strictly anaerobic bacterium. Int J Syst Bacteriol.44, 534-540.

D

Duckworth AW, Grant WD, Jones BE, Meijer D, Marquez MC et Ventosa A. (2000). Halomonas magadii sp. nov., a new member of the genus Halomonas, isolated from a soda lake of the East Africa Rift Valley. Extremophiles. 4, 53-60.

Dussault HP.(1955).An improved technique for staining red halophilic bacteria.journal of bacteriology.70(4),484.

Dyall-Smith ML. (2006). The Halohandbook : Protocols for halobacterial genetics Ver 6.01. Haloarchaeal Genetics Laboratory, Department of Microbiology and Immunology, University of Melbourne, Australia .6 - 9.

E

Elevi R, Assa P, Birbir M , Ogan A et Oren A. (2004). Characterization of extremely halophilic archaea isolated from the Ayvalik salterns, Turkey. World J. Microbiol. Biotechnol. 20,719- 725.

F

Fendrihan S, Legat A, Pfaffenhuemer M, Grüber C, Weidler G, Gerbl et Stan- Lotter, H. (2006). Extremely halophilic archaea and the issue of long-term microbial survival. Rev Environ Sci Biotechnol .5, 203-218.

Fukushima T, Mizuki T, Echigo A, Inoue A et Usami R. (2005). Organic solvent tolerance of halophilic α -amylase from a haloarchaeon, Haloarcula sp. strain S-1. Extremophiles. 9, 85–89.

G

Grant WD, Kamekura M, McGenity TJ et Ventosa A. (2001). Classe III. Halobacteria In Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd Ed. Springer-Verlag, New York. 1, 294 - 334.

Guiraud GP. (1997). Microbiologie alimentaire, Ed. Dunod, Paris, pp 652.

Gupta R, Gigras P, Mohapatra H, Goswami KV et Chauhan B. (2003). Microbial - amylase: a biotechnological perspective. Process Biochem. 38, 1599-1616.

H

Hedi A, Sadfi N, Fardeau M, Rebib H, Cayol J, Ollivier B et Boudabous A. (2009). Studies on the Biodiversity of Halophilic Microorganisms Isolated from El-Djerid Salt Lake (Tunisia) under Aerobic Conditions. Hindawi Publishing Corporation International Journal of Microbiology, 17 pages.

Hezayen FF, Rehm BHA, Tindall et Steinbüchel A. (2001). Transfer of *Natrialba asiatica* B1T to *Natrialba taiwanensis* sp. nov. and description of *Natrialba aegyptiaca* sp. nov., a novel extremely halophilic, aerobic, nonpigmented member of the Archaea from Egypt that produces extracellular poly(glutamic acid). Int J Syst Evol Microbiol. 51, 1133–1142.

Hezayen FF, Tindall BJ, Steinbüchel et Rehm BHA. (2002). Characterization of novel halophilic archaeon, *Halobiforma haloterrestris* gen. nov., sp. nov., and transfer of *Natronobacterium nitratireducens* to *Halobiforma nitratireducens* comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 52, 2271 -2280.

J

Jayachandra S, Kalantar JS et Eslick GD. (2012). Rectal ganglioneuromatosis with polyps. The American journal of gastroenterology. 107(11).

Joo WA et Kim CH. (2005). Proteomic of halophilic Archaea. Journal of Chromatography B. 815, 237- 250.

K

Kamekura M et Dyall-Smith ML. (1995). Taxonomy of the family Halobacteriaceae and the description of two new genera *Halorubrum* and *Natrialba*. Journal of General Applied Microbiology. 41, 333-350.

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

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

L

LITCHFIELD CD, GILLEVET PM .(2002). MICROBIAL DIVERSITY AND COMPLEXITY IN
HYPERHALINE ENVIRONMENTS: A PRELIMINARY ASSESSMENT. *J IND MICROBIOL BIOTECHNOL*
28:48–55

M

McGenity TJ, Gemmell RT, Grant WD et Stan-Lotter H. (2000). Origins of halophilic
microorganisms in ancient salt deposits. *Environ Microbiol*. 2,243-250.

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

N

Noll K.M. (1992). Archaeobacteria (Archaea). *Encyclopedia of microbiology*.1,149-160.

O

Oren A, Ventosa A et Grant WD. (1997). Proposed Minimal Standards for Description
of New Taxa in the Order *Halobacteriales*. *Int J Syst Bacteriol*.47, 233-238.

Oren A. (1999). Microbiology and Biogeochemistry of Halophilic Microorganisms. In
Microbiology and Biogeochemistry of Hypersaline Environments. Ed,A Oren,CRC
Press. Boca Raton London New York Washington, DC,pp. 1-9.

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

Oren A. (2006). The order halobacteriales. *The prokaryotes*. 3, 113-164.

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

P

Perry JJ, Staley TJ et Lory S. (2004). *Microbiologie « Cours et questions de révision»* Ed. Dunod, pp .397- 403.

Pérez-Pomares F, Bautista V, Ferrer J, Pire C, Marhuenda-Egea FC et Bonete MJ. (2003). Alpha-amylase activity from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*. *Extremophiles*. 7,299–306.

Platas G, Meseguer I et Amils R. (1996). Optimisation of the production of a bacteriocin from *Haloferax mediterranei* XIA3. *Microbiologia SEM* .12, 75-84.

Prescott M, Hasley JP et Klein DA. (2003). *Biologie*. 2ème Ed. Boeck Université, Paris,pp.493-1015.

Price LB et Shand RF .(2000) .Halocin S8: a 36-amino-acid microhalocin from the haloarchaeal strain S8a. *J Bacteriol* .182,4951–4958.

R

Rodriguez-Valera F, Ventosa A, Juez G et Imhoff JF. (1985). Variation of environmental features and microbial populations with salt concentrations in a multi-ponds saltern. *Microb Ecol*.11, 107-115.

Rodriguez-Valera F. (1993). Introduction to saline environments. In: Vreeland R.H, Hochstein L.I.(eds),*The biology of halophilic bacteria*. CRC Press Boca Ratom FL,1-23.

Roussel EG, Cambon Bonavita MA, Querellou J, Cragg BA, Webster G, Prieur D et Parkes RG. (2008). Extending the subsea-floor biosphere. *Science* .320 (5879),1046.

S

Salgaonkar BB, Mani K, Nair A, Gangadharan S et Braganca JM. (2012). Interspecific Interactions Among Members of Family *Halobacteriaceae* from Natural Solar Salterns. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*.

Schneegurt MA. (2012). Media and Conditions for the Growth of Halophilic and Halotolerant Bacteria and Archaea. *Advances in Understanding the Biology of Halophilic Microorganisms*. Springer Netherlands, pp.35-58.

Shand RF et Leyva KJ. (2007). Peptide and Protein Antibiotics from the Domain Archaea: Halocins and Sulfolobocins, In *Bacteriocins : Ecology and Evolution*, Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg .93 - 109.

T

Torreblanca M , Meseguer I et Ventosa A. (1994). Production of halocin is a practically universal feature of archaeal halophilic rods. *Letters in applied microbiology*, 19(4), 201-205.

Torreblanca MF, Rodriguez-Valera G, Juez A, Ventosa A, Kamekura M et Kates M. (1986). Classification of non-alkaliphilic halobacteria based on numerical taxonomy and polar lipid composition, and description of *Haloarcula* gen. nov. and *Haloferax* gen. nov. *Syst. Appl. Microbiol* .8, 89–99.

Tortora GJ, Funke BR et Case CL .(2003). *Introduction à la microbiologie*. Ed. de Renouveau pédagogique Inc, pp.157- 355.

V

Ventosa A, Gutierrez MC, Kamekura M et Dyll-Smith ML. (1999). Proposal to transfer *Halococcus turkmenicus*, *Halobacterium trapanicum* JCM 9743 and strain GSL-11 to *Haloterrigena turkmenica* gen. nov, comb. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 49, 131-136.

Vidyasagar M, Prakash S, Litchfield C et Sreeramulu K. (2006). Purification and characterization of a thermostable, haloalkaliphilic extracellular serine protease from extreme halophilic archaeon *Halogeometricum borinquense* strain TSS101. *Archaea* .2, 51-57.

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

W

Wainø M, Tindall BJ et Ingvorsen K. (2000) *Halorhabdus utahensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic, extremely halophilic member of the Archaea from Great Salt Lake, Utah. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50,183–190.

Woese CR, Kandler O et Wheelis ML. (1990). Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87, 4576-4579.

Y

Yachai M. (2009). Carotenoid production by halophilic Archaea and its applications. Thesis of Doctorat, university Prince of Songkla. 173p.

Résumé

Une étude ayant pour objectif, la détermination de la nature de l'activité antiarchéenne des souches d'archées halophiles extrême isolés d'environnements hypersalin algérien est réalisée. Pour cela, Des isoléments à partir des échantillons conservé au laboratoire ont aboutit a la sélection de douze souches. des tests d'activité antiarchéenne ont été effectués sur les douze souches sélectionnées vis-à-vis sept souches indicatrice. Toutes les souches testées se sont révélées douées d'une activité inhibitrice vis-à-vis d'au moins une souche indicatrice. Les substances antiarchéennes produites par la souche sélectionnées BSIII a été mises en évidence dans le surnageant seulement, cependant, pour les deux autres souches (BGIII et BWII), l'activité a été mises en évidence dans le surnageant et le culot. La perte de l'activité antiarchéennes des SLC des trois souches après un traitement à la pronase, pepsine ou protéinase K suggère que cette activité est due à la présence d'une substance antiarchéenne de nature protéique. Les résultats obtenus après les tests de caractérisation ont montré que les substances actives sont restées actives après traitement de chaleur à 100°C pendant 10 min et qu'elles résistent à la variation de Ph allant de 4 à 8.

Mots clés : archées halophiles extrêmes, environnements hypersalins, isoléments, activité antiarchéenne.

Abstract

A study aimed at the determination of the nature of the activity of the isolated antiarchéenne Algerian hypersaline environments of extreme halophilic archaea strains is performed. For this Isolates from samples stored in the laboratory have led to the selection of twelve souches. des antiarchéenne activity tests were carried out on twelve selected vis-à-vis seven indicator resistant strains. All strains tested were found endowed with inhibitory activity vis-à-vis at least one indicator strain. The antiarchéennes substances produced by BSIII selected strain was identified in the supernatant only, however, for the other two strains (BglIII and BWii) activity has been detected in the supernatant and the pellet. The loss of activity of SLC antiarchéennes the three strains after treatment with pronase, pepsin or proteinase K suggests that this activity is due to the presence of a proteinaceous substance antiarchéenne. The results obtained after characterization tests have shown that the active ingredients remain active after heat treatment at 100 ° C for 10 min and they resist change Ph ranging from 4 to 8.

Keywords: extreme halophilic archaea, hypersaline environments, isolations, anti Archean activity.