

République Algérienne Démocratique et Populaire Ministère de
l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira de Bejaïa



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Microbiologie

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Biotechnologie Microbienne

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

*Etude phénotypique d'activité antagoniste de deux souches haloarchaea locales
Essai de contribution à la détermination de la nature biologique*

Présenté par :

MEZIANI Rosa

SALMI Younes

Soutenu le : 13/07/2022

Membres de Jury :

Président : KECHA M.

Examinatrice : BELHAMICHE N.

Promotrice : YAHIAOUI H.

Année Universitaire 2021/2022

Remerciement

Nous remercions en premier, le grand Dieu pour le courage, la patience et la santé qu'il nous a donné pour suivre nos études.

Nous tenons à remercier le président de jury, Monsieur Kecha M, ainsi l'examinatrice Mme Belhamiche N d'avoir bien voulu juger et évaluer notre travail.

Nos profondes gratitude, et nos vifs remerciements vont également s'adresser à notre promotrice Mme Yahiaoui H pour son temps, sa franchise, son aspect sérieux dans le travail et son bagage de connaissance qu'elle nous a fait partager.

Enfin nous remercions toute personne ayant contribué à l'élaboration de notre travail.

Dédicaces

Tout d'abord, louange à Allah qui m'aide et me donne la patience et le courage durant ces longues années d'étude, sans sa miséricorde, ce travail n'aurait pas abouti.

Je dédie ce mémoire à :

Mes très chers parents,

Du moment qu'ils sont là, je n'ai besoin de rien, leur présence me suffit et leur sourire me comble. Ils sont la lanterne qui éclaire mon chemin et m'illumine de douceur et d'amour, ils sont le vrai quand je suis dans le faux, ils sont les bons quand tout est mauvais, Ils sont la lumière quand toutes ténèbres.

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce qu'ils méritent pour tous les sacrifices qu'ils n'ont cessé de m'encourager, soutenir, et de prier pour moi tout au long de mon parcours

Ce travail est l'un des fruits de leurs sacrifices qu'ils ont consentis pour et ma formation.

Mon cher frère Amine

Un profond respect et un remerciement particulier et sincère pour son aide, générosité, soutien, encouragement et tous ses efforts fournis

*A mes chères tantes **Lalah, Fatiha, Fadila, Hania***

*A mes chers oncles **Saou, Farouk, Samir***

*A mes chères cousines **Farah, Ferial, Imene, Meriame Malek***

A mon binôme Younes,

A tous mes amis

Ainsi tous les étudiants de biotechnologie microbienne promotion 2022

Je leur dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

ROSA

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à

Mes chers parents

Qu'ont permis de me former et encouragé pendant toute ma formation, que dieu les protège et les garde en bonne santé.

Mes très chères sœurs,

Dont la préférable Nadjima que j'aime énormément ainsi que

Mon frère adoré Lemnoir.

Tous mes oncles, mes tantes, et les membres de leurs familles, mes cousins, mes cousines.

Tous mes amis sans exceptions sur tout Yacine et Syphax, ceux qui me sont chers à mon cœur dont je me souviendrai toujours.

A mon binôme Melle Meziani Rosa et leurs membres de sa famille.



Younes

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	1
Chapitre I: Synthèse bibliographique	4
1. Halophilie.....	4
2. <i>Archaea</i>	6
3. <i>Haloarchaea</i>	6
4. Taxonomie.....	7
5.1 Biotechnologie des archées.....	9
5.1 Bactériorhodopsine et Biosurfactants.....	9
5.1.1 Bactériorhodopsine.....	9
5.1.2 Biosurfactants.....	9
5.2 Polyhydroxyalcanoates et Exopolysaccharide.....	9
5.2.1 Polyhydroxyalcanoates.....	9
5.2.2 Exopolysaccharides.....	10
5.3 Enzymes.....	10
6. Peptide antimicrobien.....	10
7. Halocine C8 et caractéristique.....	11
Chapitre II : Matériels et méthodes	14
1. Matériel.....	14
2. Matériel biologique.....	14
3. Méthodes.....	14
3.1 Revivification et repiquages.....	14
3.2 Recherche de l'activité antagoniste.....	15
2.3 Propriétés physicochimique de la substance produite.....	16
2.4 Thermo dénaturation.....	16
2.5 Effet des solvants organiques.....	16
2.5.1 Traitement à l'acétone.....	16
2.6 Traitement à la protéase.....	16
Chapitre III : Résultat et discussion	18
1. Revivification des souches.....	18

2. Purification des souches.....	19
3. Recherche de l'activité antagoniste.....	20
3.1 Préparation des surnageant.....	20
4. Propriétés physicochimique de la substance produit.....	20
4.1 Vérification de la sensibilité à la chaleur.....	23
4.2 Effet des solvants organiques.....	24
4.2.1 Traitement à l'acétone.....	24

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations

AMPs : Antimicrobial peptides

Br : Brown

Br7 : Brown à pH= 7

BR : Bactériorhodopsine

DSM : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen

HalC8: Halocine C8

ProC8 : Proprotéine C8

PGRB-1 : plasmide **GRB-1**

PHA : Polyhydroxyalcanoates

Rpm: Rotation per minute

SLC : Surnageant Libre de cellules

Sp: *Species*

S3: *Natrinema sp*

S9: *Natrinema sp*

Liste des figures

Figure:1	Mécanismes d'adaptation des halophiles à leur environnement	4
Figure:2	Classification des halophiles en fonction de tolérance à la salinité	5
Figure:3	Division des lignées d'archées	8
Figure:4	Photos des trois souches préparées pour le test d'activité antiarchéenne sur milieu Br7 solide	18
Figure:5	Photos des trois (3) souches préparées pour le test d'activité anti archéenne sur le milieu Br7 liquide	18
Figure:6	Photo de la souche S9 après sa purification	19
Figure:7	Photos des trois (3) surnageant des souches	20
Figure:8	Photo des résultats d'activité antagoniste entre les souches S3et S9.....	22
Figure:9	Photos des résultats du test de traitement par la chaleur à 100°cen fonction de temps	23
Figure:10	Photos des résultats des surnagent des souches après traitement à l'acétone...	24
Figure:11	Représentation graphique de l'absorbance des souches à 1/10 de dilution	25
Figure:12	Représentation graphique des volumes initiaux des souches S3, S9, DSM en fonction d'absorbance et de volume final	25

Liste des tableaux

Tableau I :	Les AMPs produits par les trois domaines de la vie	11
Tableau II :	Résultats des mesures des DO avant et après la dilution de 1/10	21
Tableau III :	Résultat du calcul de volume initial par le rapport du volume final et de la DO après sa dilution	21
Tableau IV :	Résultats du test des traitements des surnageant par la chaleur a100°C en fonction de temps	21
Tableau V :	Résultats du test des traitements des surnageant par la chaleur à 100°C en fonction de temps	24

Introduction

L'identification et la taxonomie des micro-organismes a été faite au début des années 1970 grâce aux travaux de Foxet Woese sur les sous-unités des ribosomes «16S et 23S».

Carl Woese a confirmé que la vie sur cette planète comprendrait trois domaines ; *Bacteria*, *Eucarya*, *Archaea*. Les archées survivent dans des conditions défavorables donc inhabituelles à leur prolifération. Il s'agit donc de conditions physiques et/ou chimiques extrêmes.

Parmi les écosystèmes extrêmes, on peut citer ceux à hautes ou basses valeurs des paramètres physicochimiques tels que : le pH, la température, la salinité. En Algérie, plus précisément au Sahara, on rencontre un grand nombre de chotts et de sebkhas où la salinité atteint des teneurs extrêmement élevées.

Les micro-organismes qui se développent dans ces habitats hautement salins sont considérés comme des extrémophiles. Ils résistent à une composition ionique élevée, à des facteurs de stress environnementaux tels que : pH alcalin, faible disponibilité en oxygène, température relativement élevée, présence de métaux lourds et/ou autres composés toxiques.

Les halophiles ont de nombreux aspects importants et intéressants. Ils peuvent être une source de nombreux composés organiques tels que : les agents antimicrobiens (tels que les halocines), les enzymes, les colorants, les solubilisant compatibles et les agents formant des biofilms. Ces composés fonctionnent dans des conditions défavorables applicables dans de nombreux domaines ; pharmaceutiques, colorants alimentaires, bioplastiques, biosurfactants et textiles. La production d'halocines est une propriété commune des halophiles, bien qu'il y en ait des centaines sur la liste, seulement quelques-unes ont été étudiées en profondeur (**Quadri et al., 2017**).

Les halocines sont des peptides ou protéines antibiotiques classés parmi les produits synthétisés par les archées halophiles. Ces substances sont synthétisées et sécrétées pour empêcher d'autres souches du même genre, sensibles, d'occuper la même niche écologique.

Notre travail s'inscrit dans cette optique et constitue une contribution à la mise en évidence de l'antagonisme et de la production des substances inhibitrices par des souches d'haloarchées locales. Notre étude est constituée de trois (3) parties :

- Une partie théorique consacrée à des généralités sur les archées halophiles et leurs exploitations en biotechnologie. La production d'halocines en est un exemple.
- La deuxième partie correspond au travail pratique qui a pour objectifs :
 1. La vérification du caractère antagoniste des deux souches d'Archaea locales sur une souche de référence.
 2. La recherche de l'activité antagoniste entre les souches archéennes locales ayant une activité antagoniste sur la souche de référence.
 3. Une contribution à la détermination de la nature de la substance inhibitrice.
- La troisième partie décrit les résultats et la discussion ainsi qu'une conclusion générale et les perspectives de ce travail.

Chapitre I : *synthèse bibliographique*

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1 Halophilie

Les halophiles extrêmes sont des micro-organismes extrémophiles qui peuvent survivre à un niveau élevé de salinité (10-30 % NaCl). Ils s'adaptent aux fortes concentrations en suivant diverses stratégies qui les aident à garder l'équilibre osmotique. Ces stratégies sont résumées dans la **Figure1**.

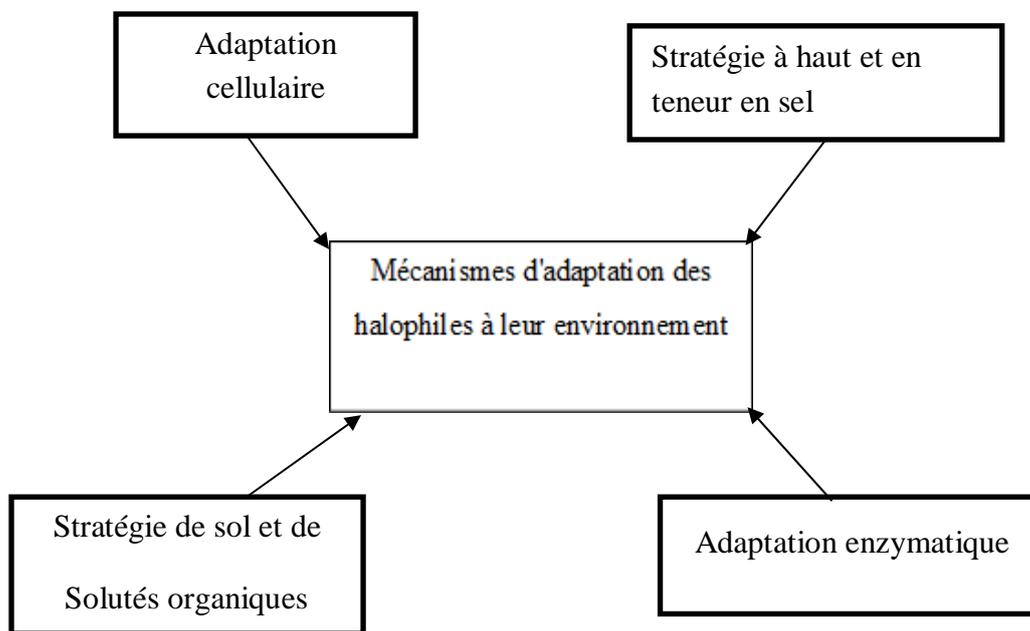


Figure1 : Mécanismes d'adaptation des halophiles à leur environnement (Gunjal et al., 2022).

Les micro-organismes qui ne peuvent pas tolérer des concentrations élevées de sel ont tendance à perdre de l'eau et à rétrécir leurs cellules. Ce qui entraîne une perte complète de la structure et de la fonction cellulaire. Les halophiles produisent des protecteurs osmotiques qui renforcent l'activité osmotique de leur cytoplasme. Certains peuvent produire des concentrations de sel en excès au sein de la cellule pour obtenir une concentration en sel égale à celle du milieu. Les enzymes des halophiles ont la particularité de pouvoir supporter des températures élevées et de rester stables à des concentrations de sel et à un pH élevé.

Ces enzymes aident les halophiles à se développer dans des conditions riches en sel. Il y a des enzymes produits par des halophiles, à savoir des amylases, xylanases, protéases, cellulases, estérases, pullulanases, endoxylanases (**Edbeib et al.,2016**).

Les halophiles sont classées en plusieurs groupes comme le montre la **Figure2** :

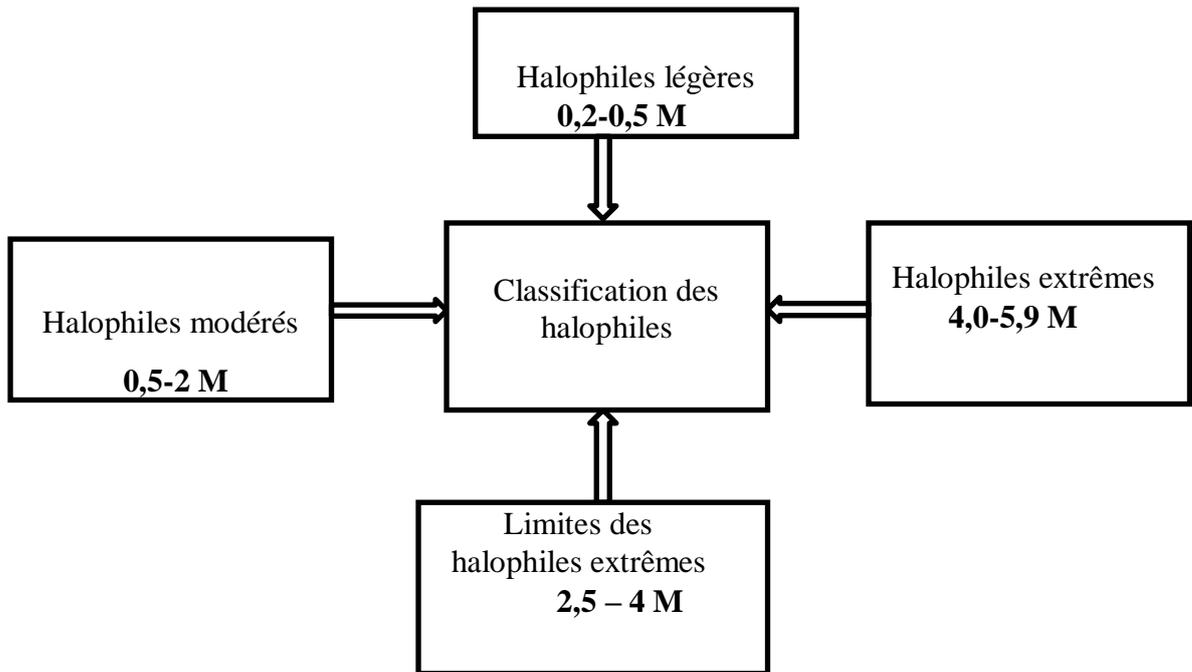


Figure 2 : Classification du groupe des halophiles en fonction de tolérance à la salinité (**Gunjal et al., 2022**)

Les protéines des halophiles adaptent une stratégie "Salt-in" pour survivre dans des environnements salins. Une bonne concentration en sels est indispensable aux organites intracellulaires pour le fonctionnement de ces protéines (**Kanekar et al.,2012**).

La thalassohaline a une concentration en sel de 35%, 10 fois supérieure à celle de l'eau de mer. Par exemple ; le Grand Lac Salé et la Mer Morte, la saumure solaire, les mines de sel et les sources de saumure.

Les protozoaires, les diatomées et les algues se trouvent dans moins de 10% de NaCl dans les sels solaires. *Dunaliella sp* et *Artemia salina*, *Halomonas sp*, *Salinivibrio sp*

et flavobactéries se trouvent principalement dans des concentrations très élevées de sel. La proline, la glutamine et la carboxamine sont des osmolytes principaux qui se trouvent chez les halophiles pourpres, autres osmolytes comme exemple : le carbamoyl-L-glutamine-1-amide et le N-acétyl glutaminyl amide (Besse et al., 2015).

I.2 les archées ou Archaea

Les premières *Archaea* qui ont été identifiées par des auteurs sont généralement les extrémophiles qui se trouvent dans des habitats pauvres en oxygène tels que marécages (méthanogènes), dans des eaux hyper-salées comme la Mer Morte (Halophiles), dans des températures très élevées comme dans les bouches hydrothermales des fonds ou des sources chaudes comme dans le parc de Yellowstone (thermophiles), ou vice versa dans des conditions de froid permanent, comme les lacs asséchés de l'Antarctique (psychrophiles) et à pH extrême. En général, il existe une certaine similarité entre les cellules d'archées et les cellules bactériennes, mais contrairement aux bactéries, la paroi des cellules archéennes sont dépourvus de peptidoglycane et contiennent des lipides à base d'isoprène liés au glycérol-1-phosphate par des liaisons éther (Tourte et al., 2020).

Les *Archaea* sont considérées comme des organismes ubiquitaires présents dans tous les milieux terrestres, dans les microbiotes humains ; peau, systèmes digestif et respiratoire. Cependant l'impact sur la santé humaine reste à déterminer (Moissl-Eichinger et al., 2018). Les génomes des *Archaea* possèdent une forte densité de gènes et consistent en un chromosome circulaire dont la taille varie entre 0,49 (*Nanoarchaeume quitans*) et 5,75 Mbp (*Methanosarcina acetivorans*), Ils peuvent avoir des plasmides, dont 60 ont été isolés à ce jour (Kellner et al., 2018).

I.3 Haloarchaea

Les *Haloarchaea* sont des microorganismes vivant dans des environnements extrêmes, pour faire face aux conditions hostiles de leur habitat telles que la dessiccation, l'exposition aux rayonnements...etc. Ils acquièrent des adaptations physiologiques. L'halomucine d'*Haloquadratum walsbyi* est une grande protéine avec une longue chaîne de 9159 acides aminés, qui aident à retenir l'eau dans les cellules en formant une capsule riche en eau. En ce qui concerne la nutrition, plusieurs *Haloarchaea* augmentent leur rapport surface/volume afin de profiter des nutriments de l'environnement. Récemment, des *Haloarchaea* avec un volume des surfaces accru ont été observées dans des inclusions fluides dans les cristaux d'halite

(Gunjal et al., 2022).

Les *haloarchaea* sont capables de survivre à de fortes doses de rayonnement qui peuvent être dues à la polyploïdie. Par conséquent, lorsqu'ils sont exposés aux rayonnements, ces derniers provoquent des ruptures d'ADN double brin. Ce qui conduit à une altération de la transcription et de la traduction. Les microorganismes polyploïdes sont capables de réparer ces ruptures (Soppa et al., 2013).

I.4 Taxonomie

Le développement des techniques du séquençage à haut débit et l'amélioration des analyses phylogénétiques en 2002 ont identifié plusieurs nouveaux groupes d'*Archaea* tels que *Korarchaea*, *Nanoarchaea* et *Thaumarchés*.

La phylogénie des *Archaea* a évolué. Elle s'est enrichie d'une nouvelle classification par la mise en évidence d'un nouveau groupe, qui comprend *Thaumarchea*, *Aigararchaeae*, *Crenarchaeae*, *Koarchaeae* et le groupe des DPANN, qui se caractérise par de petits génomes (~0,5 à 1,5 Mb) et se compose de *Diapherotrites*, *Parvarcaea*, *Aenigmarchea*, *Nanoarchaea* et *Nanohaloarchaea* (Kellner et al., 2018).

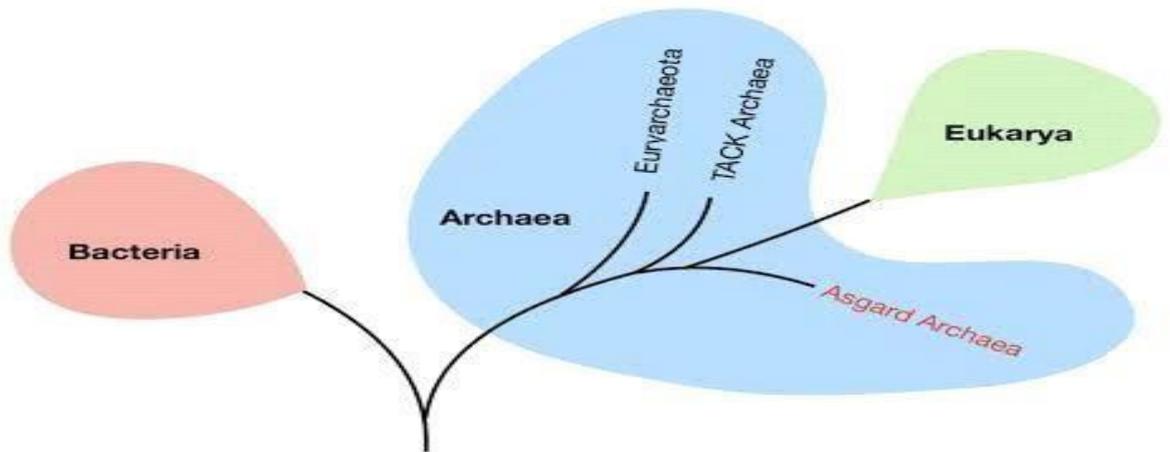
La découverte d'une nouvelle branche, *Lokiarchaea* dans les sédiments marins près du château de Loki (fond hydrothermal au centre de l'océan Atlantique) a mis des données méta génomiques sur la phylogénie des archées, qui ouvre une nouvelle perspective sur l'ancêtre commun des eucaryotes et des archées (Eme et al., 2017)

Récemment une souche de *Lokiarchaea* du groupe Asgard appelée *Prometharchaeum symtrophicuma* été isolée à partir de sédiments prélevés dans les profondeurs marines au Japon et peut désormais être cultivée au laboratoire (Imachi et al., 2020).

Cette grande avancée ouvre de nombreuses connaissances et apportera de nouveaux éléments à notre compréhension des relations évolutives primitives avec les bactéries et les eucaryotes (Basista et al., 2020).

La **Figure 3** montre que les lignées d'*Archaea* sont aujourd'hui divisées en quatre clades : les Euryarchées, DPANN, TACK, Asgard (Eme et al., 2017).

A)



B)

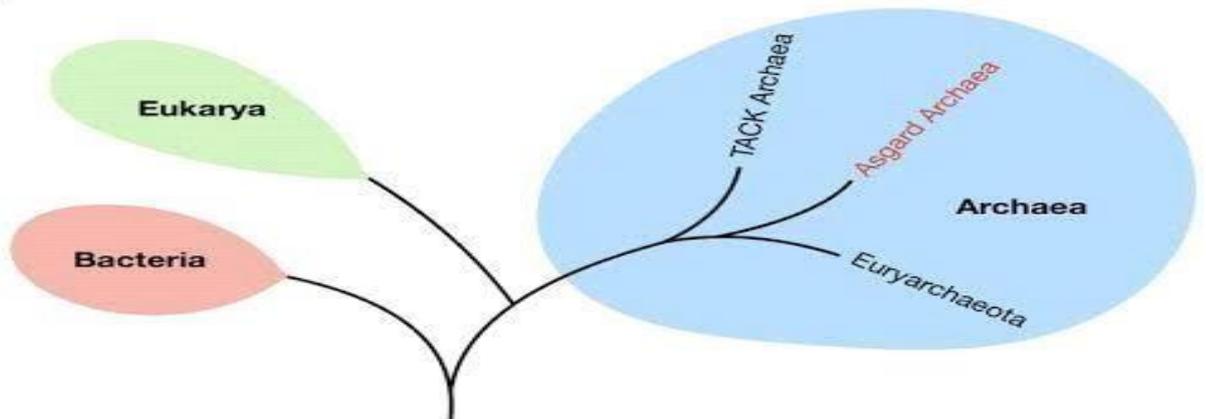


Figure 3 : Division des lignées d'archées (Eme et *al.*, 2017).

I. 5 Biotechnologie des archées

I.5.1. Bactériorhodopsine et Biosurfactants

I.5.1.1 Bactériorhodopsine

La Bactériorhodopsine est une protéine structurellement similaire à la rhodopsine de la rétine humaine. Leur pompe à protons photoconductrice possède de nombreuses propriétés ;

-L'énergie lumineuse est convertie en énergie chimique.

-Elle fonctionne bien entre 0-45°C et pH varie de 1 à 11,

-Elle est active dans l'eau douce et dans les solutions fortement concentrées en sel,

-Elle tolère des températures supérieures à 80°C dans l'eau et jusqu'à 140°C à l'état sec,

-Elle résiste à la digestion par la plupart des protéases (**Oren et al., 2002**).

En effet, elle peut être incorporée dans des membranes synthétiques pour produire de l'électricité à partir de la lumière du soleil. Quelques solutés organiques, tels que l'ectoïne, sont produits en fortes concentrations dans de nombreux micro-organismes halophiles en tant qu'osmorégulateurs. Ces substances utilisées comme stabilisateurs de molécules biologiques (enzymes et ADN) (**Javor et al., 1989**).

I.5.1.2 Biosurfactants

Les Biosurfactants sont un groupe hétérogène d'agents tensio-actif générés par de nombreux organismes vivants. Ces composés amphiphiles ont la capacité de réduire la tension interfaciale entre différentes phases du fluide. Leurs applications commerciales sont signalées dans plusieurs domaines, y compris dans la récupération du pétrole, émulsifiants et hydratants pour les industries pétrolières, alimentaires et cosmétique respectivement. La production de biosurfactants à partir d'archées halophiles peut jouer un rôle important dans l'assainissement accéléré des environnements d'eau salée contaminés par les hydrocarbures ainsi que la réduction de la tension superficielle (**Kebbouche et al., 2009**).

I.5.2. Polyhydroxyalcanoates PHA et Exo-polysaccharides

I.5.2.1 Polyhydroxyalcanoates

Les Polyhydroxyalcanoates ou PHA sont des polymères produits naturellement par fermentation bactérienne de sucre ou lipides. Les cellules *Haloferax* contiennent des

quantités importantes de PHA. Elles sont utilisées comme plastique biodégradables.

Ce qui constitue une alternative aux plastiques synthétiques qui présentent un enjeu environnemental majeur, résistant à la dégradation par l'air et l'eau. La biodégradabilité, la biocompatibilité distinguent les PHAs par leurs utilisations dans différents domaines, y compris l'industrie de l'emballage, en pharmacie, ou en tant qu'ingrédient de synthèse des produits chimiques et colorants (**Poli et al., 2011**).

Ils sont utilisés en médecine : les valves cardiaques, les sutures, les implants osseux, ingénierie tissulaire et dans les systèmes d'administration de médicaments (**Quillaguamán et al., 2010**).

L'un des avantages de l'utilisation des *Archaea* halophiles pour produire du PHA est de réduire les coûts d'extraction. Le risque de contamination microbienne dans le processus de la fermentation du PHA peut être minimisé en raison de la présence d'une salinité élevée. Alternativement, les organismes peuvent se développer sur des simples sources de carbone telles que le glucose et une petite quantité d'extrait de levure (0,1 g) pour générer du PHA. Ce qui réduit également les coûts de production (**Kanekar et al., 2012**).

I.5.2.2 Exopolysaccharides

Plusieurs *Archaea* halophiles en particulier le genre *Haloferrax* produisent de grandes quantités d'exo-polysaccharides. Leur composition et structures sont mutables. Ils peuvent être des homos ou des hétéro-polysaccharides, peuvent contenir de nombreux ingrédients organiques ou inorganiques. Ces polysaccharides peuvent être utilisés dans plusieurs applications et dans des nombreux domaines : médecine, pharmacie, industries alimentaires et cosmétiques (**Oren et al., 2002**).

Les propriétés de ces polysaccharides sont liées à leur comportement en solution, en particulier leur capacité à épaissir, émulsionner, stabiliser,

I.5.3 Enzymes

Des souches de genre *Haloferrax*, *Halobacterium*, *Halorhabdus* et *Natronococcus* synthétisent des amylases, protéases, nucléases, cellulases, xylanases, chitinases, estérases, qui sont les plus étudiées (**Oren et al., 2010**).

Les exonucléases, amylases, amylo-glucosidases, protéases et lipases sont utilisés dans les processus biologiques tels que la destruction des macromolécules à des concentrations élevées en sel (**Oztetik et al., 2014**).

Les enzymes des *Archaea* utilisés dans le domaine de la biotechnologie présentent un intérêt majeur pour les industries. Ils fonctionnent parfaitement à des niveaux de température, salinité et de pH. Ces paramètres limitent la durée de leurs vies. Les fortes concentrations en sels dans les cultures des *Archaeas* provoquent un niveau faible de contamination (**Eichler et al., 2001 ; Makhdoumi et al., 2011**).

I.6. Peptides antimicrobiens

Les populations de micro-organismes les plus diverses se forment dans tous les milieux naturels. Une communauté confrontée à une lutte constante pour l'espace et les ressources alimentaires qui jouent un rôle important. La production de protéines ou peptides antimicrobiens (AMPs) est une propriété universelle.

Tableau I : Les peptides antimicrobiens(AMPs) produits par les trois domaines de la vie (**Quadri et al., 2017**).

Domaine de la vie	Peptide antimicrobien
<i>Archaea</i>	Halocine, sulfobiocine
<i>Bacteria</i>	Bactériocines
<i>Eucarya</i>	Eucaryocines

Les AMPs jouent un rôle important. Ils sont considérés comme un moyen puissant pour concurrencer les autres microorganismes et prospérer dans diverses niches environnementales. Il a été estimé que les *Archaea* produisent au moins un AMP.

Leur activité antimicrobienne puissante est généralement dirigée contre des espèces étroitement liées à la souche productrice, mais certains ont montré un spectre d'action plus étendu à travers les genres, embranchements, et même les domaines (**Atanasova et al., 2013 ; Besse et al., 2015**).

I.7 Halocine C8 et caractéristiques

HalC8 est une microhalocine stable qui a été produite et purifiée à partir d'une souche d'*Archaea* halophile *Natrinema sp* isolée d'un lac salé en Chine. Elle présente une puissante activité antiarchéenne avec d'autres souches du même domaine. L'HalC8 est constitué d'une proprotéine de 238 d'acides aminés qui sont traduits en deux peptides fonctionnels ; halC8 C terminal et la protéine immunitaire N terminale. L'activité antimicrobienne d'halC8 reste stable après un an de stockage à 4°C, après une heure de traitement à 100°C, après dessalage, traitement avec la trypsine et des solvants organiques (Sun et al., 2005).

Chapitre II : *Matériel et méthodes*

Chapitre II : Matériel et méthodes

Le présent travail a été fait au laboratoire génie biologique de l'université Abderrahmane Mira Bejaia. Il a été réalisé en deux parties :

La première concerne la confirmation de l'activité antagoniste des souches d'*Archaea* locales productrices de substances antiarchéennes sur la souche de référence qui est une souche sensible (DSM3754 est donc la souche indicatrice).

La deuxième partie consiste à vérifier la nature de la ou des substances produites, en étudiant leur sensibilité à certains paramètres tels que la température, les solvants organiques et les protéases.

II .1. Matériel

Le matériel ainsi les réactifs utilisés sont mentionnés en **Annexe 1 et 2**

II.1.1 Matériel biologique

Les microorganismes utilisés dans cette étude sont des *Archaea* halophiles, isolés de différentes salines d'Algérie, qui font partie de la collection de souches du laboratoire génie biologique.

Trois souches ont été choisies pour réaliser ce travail

Deux souches locales car elles ont déjà été identifiées par le séquençage de leur ADNr 16S et leur activité biologique a déjà été démontrée.

Natrinema sp S9 (isolée du sol Ichakaben), Bejaia

S3 isolée du sel du Chott El Beida, Sétif.

Une souche de référence : *Halobacterium salinarum* (DSM 3754).

Ces souches ont été conservées dans des boîtes de Pétri et dans des tubes, en culture liquide.

II.2. Méthodes

II.2.1 Revivification et repiquages

Le milieu que nous avons utilisé pour la revivification est conçu pour les souches halophiles

répondant ainsi à leurs exigences nutritionnelles. Il contient des concentrations appropriées en NaCl et MgSO₄. Ce milieu est le milieu Brown préparé à pH7. Il est utilisé sous deux formes : liquide et solide.

La composition des milieux est mentionnée en **Annexe 3**

Le milieu liquide est utilisé pour faire des cultures liquides afin de préparer les surnageants et le milieu solide pour vérifier la pureté des souches et pour réaliser les tests d'antagonisme.

Les cultures solides et liquides sont incubées à **40°C** pendant une à deux semaines.

La souche de référence qui a été utilisée comme cible ou souche indicatrice pour les tests d'activité, en l'occurrence *Halobacterium salinarum* (DSM 3754), est habituellement mise en culture dans le milieu Brown préconisé pour les *Haloarchaea*.

Les souches locales S3 et S9 ont été repiquées sur le même milieu liquide.

Les souches poussées ont repiqué pour obtenir des souches pures.

Les souches poussées sur milieu Brown liquide ont fait l'objet d'un repiquage sur boîte contenant le même milieu.

Ainsi, nous avons fait :

Tableau II : Ensemencement des différentes souches sur milieu Brown

Ensemencement	S3 liquide	S3 liquide	S9 solide	DSM solide	DSM liquide
Milieu Br solide	+	+	+	-	-
Milieu Br liquide	+	+	-	+	+

+ : Appliquer - : non appliquer

II.2.2 Recherche de l'activité antagoniste

Il s'agit de mettre en évidence la capacité d'une souche à produire ou non des agents antimicrobiens (halocines) contre d'autres souches et ainsi de mettre en évidence une activité antagoniste.

Pour ce faire, nous utilisons une méthode similaire à la méthode de la double couche ; seul le surnageant a été testé. 1ml de la souche à tester a été centrifugé dans des Falcon à 5000trs/min pendant 10min pour séparer le culot du surnageant.

Les surnageants ont été transférés dans un nouvel Eppendorf stérile.

- Tester les surnageants des cultures S3 et S9 sur des boîtes Pétri,ensemencées par DSM 3754 pour les tests d'activité des souches locales sur la souche de référence.
- Tester le surnageant de S3 sur S9 pour les tests d'antagonisme des souches locales entre elles.

II.2.3 Propriétés physicochimique de la substance produite

II.2.3.1 Thermodénaturation

La thermostabilité a été déterminée par traitement thermique de surnageant des cellules des souches S3 et S9 à 100°C dans le bain marie pendant 5,10 et 30 min.

Le surnageant ainsi traité est conservé au frais pour les tests de confirmation.

II.3 Effet des solvants organiques

II.3.1 Traitement à l'acétone

Dans des tubes Falcon, 400µl du surnageant de chacune des souches S3 et S9 ont été mélangés avec 1600µl d'acétone froid, puis placés au réfrigérateur à -20°C pendant une nuit.

Homogénéiser les solutions à l'aide d'un vortex, puis les remettre au réfrigérateur pendant une heure.

Centrifuger à 5000 rpm pendant 20min, afin de prélever les culots dans 40 µl d'eau distillée stérile.

II.4 Traitement à la protéase

4mg de trypsine en poudre dans un Eppendorf ont été mélangé avec 1500 µl de surnageant des souches S3 et S9. La concentration de la solution mère est de 40mg/ml dans un tampon d'eau distillée stérile, pour tester la sensibilité des halocines générées à la protéase par un test d'activité antibactérienne.

Incubation à 37°C pendant 1h.

Chapitre III : *Résultats et discussion*

Chapitre III : Résultat et discussion

III.1 Revivification de souches

Pour les souches revivifiées par le repiquage sur le milieu solide Br7 dans des boîtes de Pétri, les colonies sont bien poussées à 40°C pendant deux semaines (**Figure 4**)

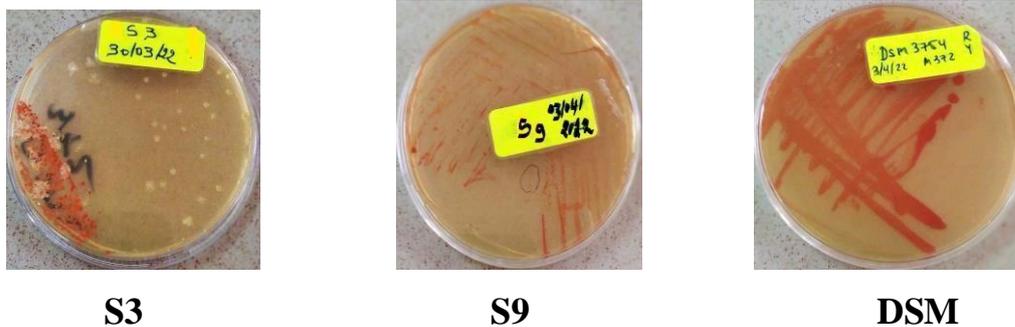


Figure 4 : photos des trois souches préparées pour le test d'activité antiarchéennes sur milieu Br7solide.

Pour les souches ensemencées sur le milieu liquide Br7 dans des tubes, la prolifération des souches est observable à l'œil nu, par le trouble et le changement de couleur du milieu.

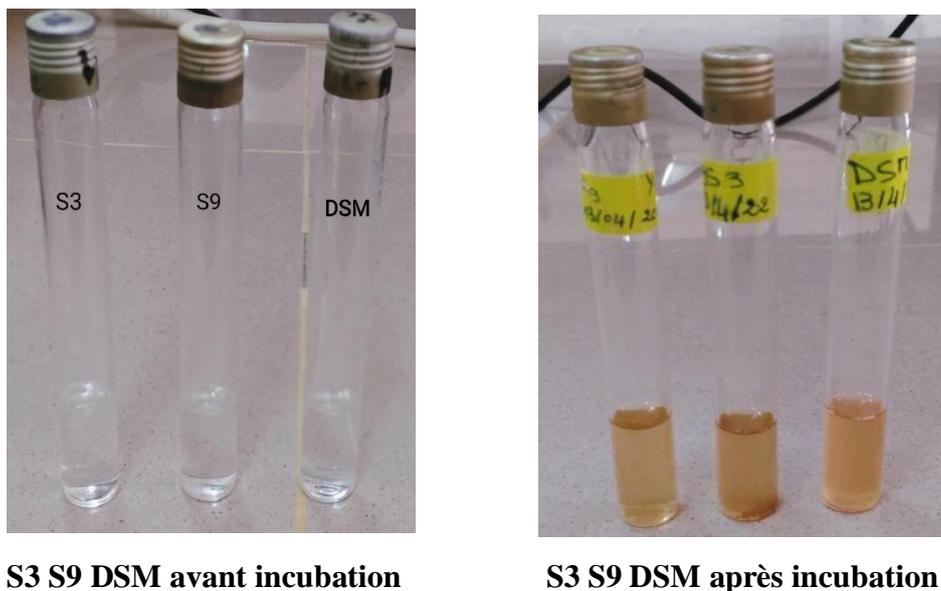


Figure5 : photos des trois (3) souches préparées pour le test d'activité antiarchéenne sur milieu Br7 liquide.

Un trouble est visible à l'œil nu, signifie que le phénomène de pigmentation se déroule, qui montre une caractéristique générale des archées halophiles.

Les membres de la famille des *Halobacteriaceae* marquent leur présence dans les milieux hypersalins par le changement de la couleur du milieu vers le rouge, l'orange ou le violet (**Oren et al., 2002**).

À fortes concentrations en sels, les caroténoïdes des *Haloarchaea* confèrent souvent une couleur rose distinctive aux milieux liquides. Ils sont responsables de la pigmentation qui caractérise les lacs et étangs d'eau salée (**Ventousa et al., 1995**).

III.2 Purification des souches



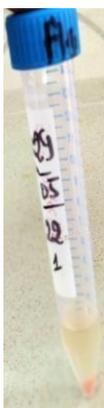
Figure 6 : Photo de la souche S9 après sa purification

30µl de la souche S9 sont déposés à l'aide d'une micropipette sur le milieu Br7 solide, après leur incubation, l'observation à l'œil nu des colonies arrondies coloré en rose, due au phénomène de pigmentation, la synthèse du caroténoïde est un caractère des halophile, signifie que la souche S9 est pure.

III .3 Recherche de l'activité antagoniste

III .3.1 Préparation des surnageant

Après la centrifugation à 5000 rpm pendant 15 min., nous avons eu un surnageant et un culot bien distinct comme le montre la **Figure 7**.



Surnageant
et culot S3



Surnageant
et culot S9



Surnageant
et culot DSM

Figure 7 : Photos des trois (3) surnageant et culot des souches étudiées

À l'œil nu, observation d'un surnageant transparent et d'un culot rose foncé au fond du tube Falcon. Le surnageant riche en métabolites synthétisés par les souches et le culot riche en cellules.

III.3 Propriétés physicochimique de la substance produite

Après la mesure de la DO des suspensions S3, S9, DSM3754 à une longueur d'onde égale à 600 nm, les valeurs trouvées sont multipliées par 10, selon la relation mathématique suivante :

$$\text{DO de la culture initiale} = \text{DO mesurée} * 10$$

Tableau III : Résultats des mesures de DO avant et après la dilution au 1/10

Souches	DO mesurée	Dilution	DO de la culture initiale
S9	0.111	*10	1,11
S3	0.179	*10	1,79
DSM	0.316	*10	3,16

Les mesures de la DO des suspensions microbienne sont utilisées pour la standardisation de l'inoculum, afin de déterminer le volume à prélever et à mettre dans la gélose pour avoir un tapis homogène selon la relation suivante :

$$V \text{ initial} = V \text{ final} * DO \text{ finale} / DO \text{ de la culture initiale.}$$

Tableau IV : Résultat du calcul du volume initial à prélever par le rapport du volume final et de la DO de la culture.

Souches	V f (µl)	DO de la culture	Vi (µl)
S3	20	1,79	11
S9	20	1.11	18
DSM	20	3,16	6

Les valeurs des volumes initiaux sont utilisées pour la standardisation de l'inoculum qui va constituer le tapis de la souche indicatrice pour les tests d'activité antagoniste.

Des zones d'inhibition de différents diamètres sont observables à l'œil nu autour des spots des surnageant. Ces zones sont dues aux métabolites présents dans le

surnageant qui diffusent à travers la gélose. Les résultats obtenus montrent que la souche S3 a une activité inhibitrice vis-à-vis de la S9 avec un diamètre d'inhibition de 10 mm.

La souche S3 présente une activité antiarchéenne vis-à-vis de souche cible DSM 3754. Le même résultat est observé avec la souche S9 sur DSM 3754 (**Figure 8**)



Figure8 : Photo des résultats d'activité antagoniste entre les souches S3 et S9

La particularité (spécificité) de ce résultat réside dans le fait que les deux souches appartiennent au genre *Natrinema* et possèdent toutes les deux le gène de l'halocine C8 (Travaux non encore publiés). Si ce résultat est confirmé, cela peut vouloir dire qu'une autre substance inhibitrice serait à l'origine de l'inhibition.

Ces métabolites sont des halocines. Ce sont des peptides antimicrobiens synthétisés lors de la phase stationnaire au cours d'une croissance, le temps d'incubation des cultures déterminée par les tests des surnageant contient ces substances antibactériennes.

III.4.1 Vérification de la sensibilité à la chaleur

Des zones d'inhibition du surnageant des souches S3 et S9 après leur traitement par la chaleur à 100°C à différents temps ont été constatées dans la **Figure 9**. Les résultats sont illustrés dans le **tableau V**.

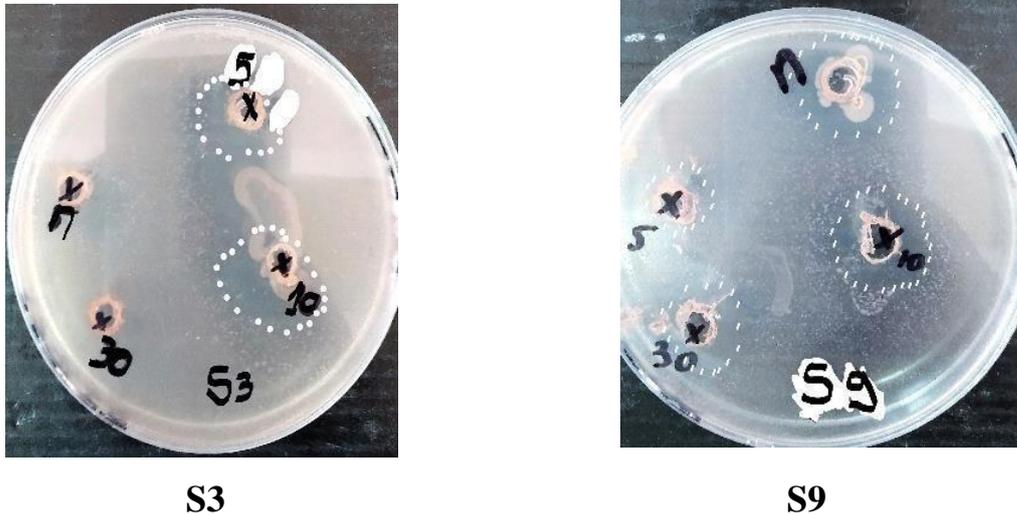


Figure 9 : Photos des résultats du test de traitement par la chaleur à 100°C en fonction de temps.

Tableau V : Résultat du test des traitements des surnageant par la chaleur à 100°C en fonction de temps.

Les traitements	Activité des souches	
	S3	S9
Pendant 5 min	+	+
Pendant 10 min	+	+
Pendant 30 min	NT	+

+ : Positive NT : Non testée.

Dans notre étude, les substances anti archéennes présentes dans les surnageants sont révélées actives après traitement à 100°C pendant 5 et 10 min. Nous n'avons pas pu vérifier l'activité après 30 min car nous n'avions plus de surnageant.

L'activité persiste même après traitement à la chaleur. Ceci dénote que la substance produite est thermorésistante. Ceci est une caractéristique des halocines. La ou les substances inhibitrices produites par les souches locales serait donc probablement une ou plusieurs halocines.

Le résultat obtenu avec le traitement du surnageant à la chaleur, est en accord avec les travaux de Sun et coll. 2005. L'Activité antimicrobienne d'halC8 reste stable après un an de stockage à 4°C, après une heure de traitement à 100°C, après dessalage, traitement avec la trypsine et des solvants organiques (Sun et al., 2005).

III.4.2 Effet des solvants organiques

III.4.2.1 Traitement à l'acétone



S3



S9



DSM

Figure 10 : Photos des résultats du surnageant des souches après traitement à l'acétone

Après la centrifugation, les tubes Falcon sont enlevés de la centrifugeuse. La manipulation a été interrompue car nous n'arrivions pas à récupérer le culot étant donné qu'il n'adhérait pas à la paroi du tube. Cette manipulation nécessite une centrifugation de 12000rpm. La centrifugeuse que nous avons au laboratoire ne permet pas d'assurer cette vitesse de centrifugation.

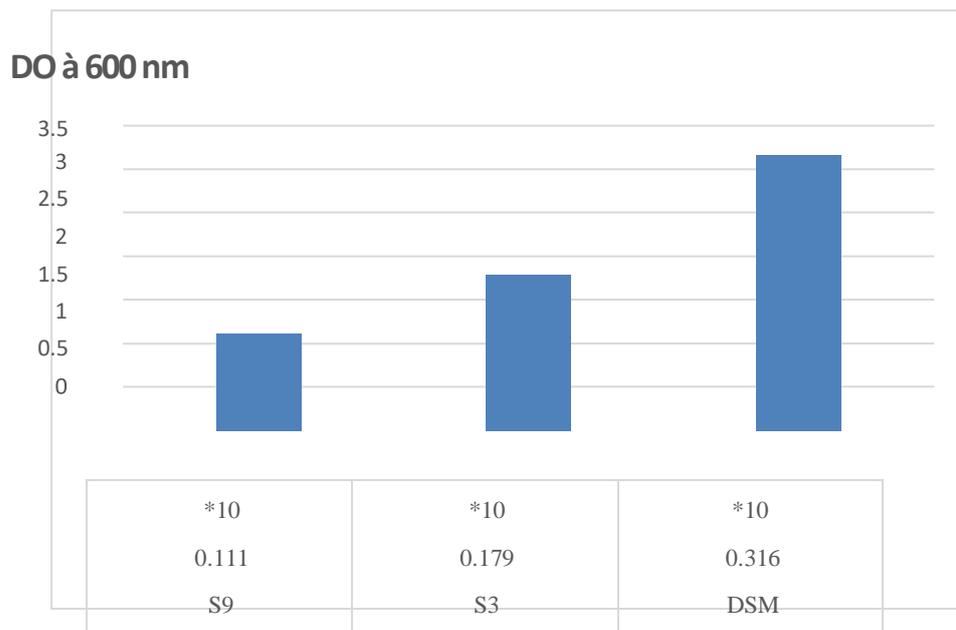


Figure 11 : Représentation graphique de l'absorbance des souches à 1/10 de dilution

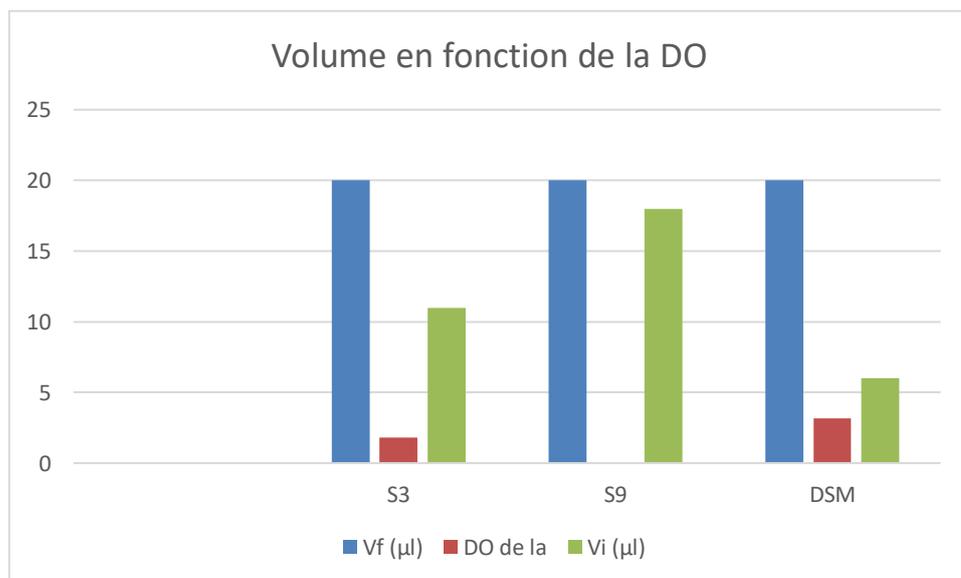


Figure12 : Représentation graphique des volumes initiaux des souches S3, S9, DSM en fonction de l'absorbance et du volume.

Conclusion

Ce travail avait pour objectifs :

- Vérification du caractère antagoniste de deux souches locales sur une souche de référence DSM 3754
- La confirmation de la présence d'une activité antagoniste entre deux souches d'archées locales

Dans notre étude, nous avons recherché l'activité antagoniste des souches d'archées halophiles locales productrices de substances antiarchéennes. Le but été la confirmation que la souche S3 et S9 antagoniste entre elle.

Un milieu de culture spécifique aux archées halophiles extrême Br7 est utilisé pour toutes nos expériences. Les tests d'activité anti-archéenne ont été effectués sur les deux souches locales vis-à-vis d'une souche indicatrice DSM et entre elles. Les deux souches S3 et S9 testées sont révélées douées d'une activité inhibitrice vis-à-vis de la souche indicatrice avec des zones allant jusqu'à 30 mm de diamètre (S3).

Les substances anti archéennes produites par les souches locales S3 et S9 ont été mises en évidence dans le surnageant. L'apparition de zones d'inhibition autour des spots contenant le SLC (**surnageant libre de cellules**) des trois souches traitées à 100°C pendant 5 et 10 min ont montré que les substances antiarchéennes résistent à la chaleur.

*Références
bibliographique*

Références bibliographique

A

Atanasova, N.S. Pietila, M.K. and Oksanen, H.M. (2013). *Diverse antimicrobial Interactions of halophilic archaea and bacteria extend over geographical distances and Cross the domain barrier*. Microbiology. 17,811-825.

B

Basista M. (2020). Métabolisme de l'ARN chez les Archaea: dialogue entre helicase à ARN ASH-SKI2, l'exoribonucléase 5'-3' à ARNase J et l'exosome 3'-5' à ARN, à proximité des ribosomes. Thèse de doctorat, biologie moléculaire. Université Paul Sabatier – Toulouse III, 280 pages.

Besse A., Peduzzi J., Rebuffat, S., Carré Mlouka A. (2015). *Antimicrobial peptides and proteins in the face of extremes: lessons from archaeocins*. Biochemistry, 118, 344–355.

Boutaiba, S., Bhatnagar, T., Hacene, H., Mitchell, D. A. and Baratti, J. C. (2006). *Preliminary characterisation of lipolytique activity from an extremely halophilic Archaeon*, Natronococcus sp. J.Mol.Catal.41,21-26

E

Edbeib, M.F., Wahab, R.A. and Huyop, F. (2016). Halophiles: Biology, *adaptation and their role in the decontamination of hyper saline environments*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 32(8), 1–23.

Eichler J. (2001) Biotechnological uses of archaeal extremozymes. Biotechnol Adv 19: 261-278.

Eme L., Spang, A., Lombard, J Stairs, C. W., and Ettema, T.J.G. (2017). *Archaea and the origin of eukaryotes*. Natural journals. Microbiology 16 (2), 120.

Eme L., Spang, A., Lombard, J., Stairs, C.W., and Ettema, T.J.G. (2017). *Archaea and the origin of eukaryotes*. Natural journal. Microbiology 15 (12), 711–723.

Eme L., Spang, A., Offer, P., Szöllösi, G.J., Petit jean, C. and Williams, T.A. (2017). *Genome size volution in the Archaea*. *Emerging Topics in the Life Sciences*, 2(4), 18-21.

G

Gunjal A.B. et Badoddekar N (2022). Halophiles (chapitre 2). In: Physiology, Genomic and Biotechnological Application of Extermophiles, Publisher: IGI Global USA. PP 13-34. DOI: 10.4018/978-1-7998-9144-4. Ch002

I

Imachi, H., Nobu, M.K., Nakahara, N., Morono, Y., Ogawara, M., Takaki, Y., Takano, Y., Uematsu, K., T. Ikuta, M. Ito, Y. Matsui, M. Miyazaki, K. Murata, Y. Saito, S. Sakai, C. Song, E. Tasumi, Yamanaka, Y., Yamaguchi, T., Kamagata, Y., Tamaki, H. and Takai, K. (2020). *Isolation of an archaeon at the prokaryote-eukaryote interface*. Nature 577, (7791): 519-525.

J

Javor B. J. (1989), hypersalin Environments. Microbiology and biogeochemistry New York, Springer. Pp 233- 269.

K

Kaneker P., Kanekar S., Kelkar A. et Dhakephalkar P. 2012. Halophiles - Taxonomy diversity, physiology and application. In Microorganism in Environmental Management: Microbes and the Environment. Springer, the Netherlands. Pp 1-34.

Kebouche-Gana S. Gana M. L., Khemili S., Fazouane-Naimi F Bouanane N. A, Penninchx M et Hacene H. (2009). Isolation and characterization of halophilic archaea able to produce biosurfactants. J Ind microbiol Biotechnology. 36: 727-738.

Kellner S., Spang A., Offer P., Szollosi G.J, Petitjean C. et Williams T. A. (2018). Genome size evolution in the archaea. *Emerging topics in the life science* 2(4) : 595-605.

M

Meseguer I. et Roderiguez-Velera F. (1986). Effect of halocin H4 on cells of *Halobacterium halobium*. *J Gen Microbiol* 132: 3061-3068.

Mkhdoumi Kakhki A., Amoozegar M. A. Mahmodi Khaledi E (2011). Diversity of hydrolytic enzymes in haloharchaea strains isolated from Salt Lake. *Int J Environ Technol* 8: 705-714.

Moissl-Eichinger C., Pausan M., Taffner J., Gabrielle Berg G., Corinna Bang C., Schmitz R. A. (2018). Archaea are interactive components of complex microbiomes. *Microbiol Trends* 26:70-85.

Q

Oren A. (2002). Molecular ecology of highly halophilic archaea and Bacteria, *FEMS Microbiol Ecol* 39: 1-7.

Oren A. (2010). Industrial and environmental application of halophilic microorganism. *Environ Technol* 31: 25-34.

Oztetik E. et Cackir A. (2014). New food for an old mouth: new enzyme for ancient archaea. *Enz Micr Technol* 55:58-64.

P

Poli A., Donato P. D., Abbamondi G. R. et Nicolaus B. (2011). Synthesis, Production and Biotechnological Application of Exopolysaccharides and polyhydroxyalkanoates by Archaea. *Archaea* 2011: 1-13.

Q

Quillaguamán, J., Guzmán, H., Van-Thuoc, D. and Hatti-Kaul, R. (2010). *Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles current potential and future prospects*. *Appl Microbiol Biotechnol*.85;1687–1696.

Quadri T. I, (2017). Criblage des souches extremophiles isolées des chotts et des sebkhas Algériens pour la recherche de molécules anti cellulaires. Thèse de doctorat, microbiologie appliquée. Université Houari Boumediene – Alger, 239 pages.

S

Soppa, J. (2013). *Evolutionary advantages of polyploidy in halophilic archaea*. *Transactions of the Biochemical Society*, 41(1), 339–343.

Sun, C., Li, Y., Mei, S., Lu, Q., Zhou, L. and Xiang, H. (2005). *A single gene Directs both production and immunity of halocin C8 in a haloarchaeal strain AS7092*. *Mol Microbiol*. 57, 537-549.

T

Tourte, M., Schaeffer, P., Grossi, V. and Oger, P.M. (2020). *Function alized membrane domains: an ancestral feature of archaea*. *Frontiers in microbiology* 11,

V

Ventosa, A. and Nieto, J.J. (1995). *Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms*. World J Microbial Biotechnol. 11, 85-94.

Annexes

Annexes

Annexe 1 : Appareillages

Matériels utilisés

- Autoclave
- Balance
- Boites de Pétri
- Béchers
- Bain marie
- Bec Benzène
- Centrifugeuse
- Erlenmeyer de 250ml
- Étuve
- Éprouvette de 100ml
- Embouts blanc
- Embouts jaunes

- Eppendorfs
- Flacon de 200ml
- Micropipette 100ul
- Plaque chauffante et agitation magnétique
- PH-mètre Eutech pH 700
- Réfrigérateur
- Spectrophotomètre UV 2540
- Vortex
- Tubes
- Tubes Falcon

Annexe 2 : Réactifs

Produits utilisés

- Acétone
- Chlorure de SodiumNaCl
- Chlorure de PotassiumKCl
- Citrate trisomique
- Eau distillée

- Extrait de levure
- Ethanol
- Hydroxyde de Sodium.....NaOH
- Hydroxyde de ChloreNaCl
- Protéase
- Trypsine
- Sulfate de Magnésium Mg SO4

Annexe 3 : milieux de culture

Milieu Br liquide

- Citrate sodique.....0,6g
- Chlorure de potassium KCl0.4g
- Eau distillée.....200ml
- Extrait de levure.....1g
- NaCl.....49.1g
- Sulfate de magnésium4g
- Le pH=7, stérilisation à 120°C pendant 2 heures.

Milieu Brown (Br) solide

- Eau distillée200ml
- Extrait de levure.....1g
- Citrate sodique 0,6g
- Chlorure de potassium KCl0.4g
- NaCl 49.1g
- Sulfate de magnésium4g
- Agar4g

Annexe 4 : Matériels biologiques

Souches utilisées

- S3
- S9
- *Halobacterium salinarum* DSM 3754

Résumé

Notre travail porte sur la confirmation de l'activité inhibitrice de la souche archéenne S3 sur S9, isolés d'environnements hypersalins en Algérie. Des repiquages ont été effectués sur le milieu Br7 solide et liquide pour la revivification des souches. Des tests antiarchéennes ont été effectués sur les deux souches S3, S9, vis-à-vis une souche indicatrice et entre elles. Des tests physicochimiques ont été effectués afin de vérifier le caractère antagoniste de deux souches d'*Archaea* locale, potentiellement productrice d'halocine C8. Les résultats obtenus après le test de thermodénaturation ont montré que la substance antiarchéennes sont restée active après le traitement de la chaleur à 100°C, pendant 5, 10 min.

Mots clés : *Archaea*, environnements hypersalins, activité antiarchéenne, substance antiarchéenne, Halocine C8.

Abstract

Our work focuses on the confirmation of the inhibitory activity of the Archean strain S3 on S9, isolated from hypersaline environments in Algeria. Subcultures were carried out on the solid and liquid Br7 medium for the revivification of the strains. Antiarchaeal tests were carried out on the two strains S3, S9, vis-à-vis an inducing strain and between them. Physicochemical tests were carried out in order to verify the antagonistic character of two strains of local *Archaea*, possibly producing halocin C8. The results obtained after the thermodenaturation test showed that the antiarcheal substance remained active after the heat treatment at 100°C, for 5, 10 min.

Key words: *Archaea*, hyper saline environments, antiarcheal activity, antiarchaeal substance, Halocin C8.