

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية



République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
جامعة زيان عاشور- الجلفة  
Université Ziane Achour – Djelfa  
كلية علوم الطبيعة و الحياة  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
قسم العلوم البيولوجيا



Département des sciences biologiques  
Projet de fin d'étude

En vue de l'obtention du Diplôme de Master en sciences biologiques

Option : Biotechnologie microbienne

## Thème

# *Production et caractérisation d'halocine produite par des bactéries halophiles*

Présenté par:

- ✓ Bouzidi Karima
- ✓ Chine Samira Naima

Promoteur :

\*Boutaiba Saad

Co- promoteur :

\*Khireddine Ahmed

Soutenu le :.....

Année universitaire:

2016/2017

## Remerciements

*En premier lieu , nous tenon à remercier Allah , notre créateur pour nous avoir donné la force pour accomplir ce travail.*

*D'abord nous profitons cette occasion pour adresser nos remerciements à notre promoteur monsieur Saad Boutaiba, chéf de spécialité de biotechnologie microbienne .Il nous a consenti beaucoup de son temps et n'a ménagé aucun effort pour nous guider et pour sa disponibilité, sa contribution générale à l'élaboration de ce travail.*

*Nous remercions également monsieur Ahmed Kfireddine Co-promoteur pour l'aide qu'il a bien voulu nous accorder, quant à la forme à donner au présent document.*

*Nous remercions vont aussi à tous les membres du jury .....président de jury, et messieurs .....et .....examineurs pour le soutient l'attention qu'ils nous ont prêtes pendant toute la durée de présentation et pour avoir eu l'extrême amabilité 'de juger notre travail.*

*Enfin nous ne pouvons pas oublier le chef de labo monsieur Gassab, les techniciens Aissa, Zineb, Amina, ainsi que toute l'équipe du labo qui nous a facilités le travail pratique.*

*Ainsi que toute personne ayant participée de prés ou de loin à la réalisation de ce travail accepte notre grand et sincère remerciement.*

## Dédicace

*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'aura 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 tout est 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 mon éducation et ma formation.*

*Mes frères et sœurs*

*Un profond respect et un remerciement particulier et sincère pour leur aide, générosité, soutien, encouragement et tous leurs efforts fournis.*

*A ma famille*

*A mon binôme Samira,*

*A tous mes amies ; surtout Oumelkheir, MANEL*

*Ainsi tous les étudiants de biotechnologie microbienne promotion 2017*

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

*Karima*

## Dédicace

*Tout d'abord je tiens à remercier Allah de m'avoir aidé de fait ce travail.*

*Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut ....*

*Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour ; le respect et la reconnaissance .....*

*C'est tout simplement que je dédie ce projet de fin d'étude....*

*A ma Mère :*

*« Tu m'as donné la vie, la tendresse et le courage pour réussir .Tout ce que je peux t'offrir ne pourra exprimer l'amour et la reconnaissance que je tu porte.En témoignages, je t'offre ce modeste travail pour te remercier pour tes sacrifice et pour l'affection dans tu m'as toujours entourée. »*

*A mon Père :*

*« L'épaulé solide, l'œil attentif compréhensifs et la personne la plus digne de mon estime et de mon respect.*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer mes sentiments, que Allah te préserve et te procure santé et langue vie. »*

*A mes sœurs et mes frères, A ma famille*

*A mon binôme Karima,*

*A tous mes amies*

*Ainsi tous les étudiants de biotechnologie microbienne promotion 2017*

*Samira*

## *Liste des abréviations*

**%** : pourcentage  
**°C**: Degré Celsius  
**ADN** : acide désoxyribonucléique  
**ARN** : acide ribonucléique  
**ATCC** : American Type Culture Collection  
**BaCl<sub>2</sub>** : Barium chloride  
**CaCl<sub>2</sub>** : Chlorure de calcium  
**cm** : Centimètre  
**COOH** : Fonction carboxylique  
**DO** : Densité Optique  
***E.coli*** : *Escherichia Coli*  
**g** : Gramme  
**g/l** : Gramme par Litre  
**GN** : gélose nutritif  
**h** : heure  
**Hal** : Halocine  
**HCl** : Chlorure d'hydrogène  
**IR** : Infrarouge  
**KCl** : Chlorure de potassium  
**kDa** : Kilos Dalton  
**Km** : kilomètre  
**KOH** : Hydroxyde de potassium  
**l**: Litre  
**m** : mètre  
**M** : Molaire  
**mg**: milligramme  
**MgCl<sub>2</sub>** : chlorure de Magnésium  
**MgSO<sub>4</sub>** : Sulfate de magnésium  
**MH** : Mueller Hinton  
**min**: minute  
**ml**: millilitre  
**mm** : millimètre  
**MSH** : Milieu Spécifique Halophile  
**NaBr** : Bromure de sodium  
**NaCl** : chlorure de sodium  
**NaHCO<sub>3</sub>** : Bicarbonate de sodium  
**NaOH** : Hydroxyde de sodium  
**NH** : Fonction amine  
**nm** : nanomètre  
**nm**: Nanomètre

**OH** : Hydroxyde  
**p/v** : Poids/volume  
**p<sup>v</sup>** : poids par volume  
**pH** : potentiel d'hydrogène  
**Rpm**: Rotation par minute  
**RS** : Rocher de sel  
**Sb** : Sebkha  
**UV** : Ultraviolet  
**λ**: longueur d'onde  
**μl** : microlitre

## *Liste des figures*

<b>Figure N°01</b>	Exemple de protéines et de peptides antimicrobiens(AMP) présents dans les trois domaines de la vie sur un arbre phylogénétique.	<b>Page05</b>
<b>Figure N°02</b>	Organigramme général de méthode du travail.	<b>Page14</b>
<b>Figure N°03</b>	Situation géographique de rocher de sel (Google Earth).	<b>Page16</b>
<b>Figure N°04</b>	Situation géographique de Zerhez el chergui.	<b>Page16</b>
<b>Figure N°05</b>	Méthode d'antibiogramme (technique des puits).	<b>Page24</b>
<b>Figure N°06</b>	Méthode d'antibiogramme (technique de disque d'agar).	<b>Page25</b>
<b>Figure N°07</b>	Diagramme résume les étapes de la production d'halocine.	<b>Page28</b>
<b>Figure N°08</b>	Purification et la conservation sur MSH solide.	<b>Page32</b>
<b>Figure N°09</b>	Purification et la conservation sur MSH liquide.	<b>Page33</b>
<b>Figure N°10</b>	<b>A</b> . Revivification de la souche Sb12 par la méthode de trois quadrants <b>B</b> . le repiquage de la souche Sb12 sur le MSH solide.	<b>Page35</b>
<b>Figure N°11</b>	Conservation des souches dans les tubes inclinés par MSH solide.	<b>Page35</b>
<b>Figure N°12</b>	<b>A</b> .Résultats d'observations microscopiques après la coloration de Gram (observation par microscope optique G×100 a immersion) <b>B</b> . Résultat de Gram KOH.	<b>Page37</b>
<b>Figure N°13</b>	<b>A</b> . Résultat de Test d'antibiose sur milieux liquide <b>.B</b> . Résultat de test d'antibiose sur milieux semi solide.	<b>Page39</b>
<b>Figure N°14</b>	Cinétique de croissance pour les souches étudiées.	<b>Page41</b>
<b>Figure N°15</b>	Résultat de l'activité sur milieu semi solide(disque d'agar).	<b>Page41</b>
<b>Figure N°16</b>	Résultat de Test d'activité sur MSH liquide par la souche RS42(test des puits).	<b>Page42</b>
<b>Figure N°17</b>	Résultat de test d'activité sur milieu liquide (test des puits ) par la souche SB30.	<b>Page42</b>
<b>Figure N°18</b>	Résultat de Test d'activité sur MSH liquide (test des puits) par la souche Sb41.	<b>Page42</b>
<b>Figure N°19</b>	Cinétique de croissance et de production de composé actif	<b>Page44</b>

	par la souche RS42.	
<b>Figure N°20</b>	Cinétique de croissance et de production de composé actif par la souche Sb30.	<b>Page44</b>
<b>Figure N°21</b>	Cinétique de croissance et de production de composé actif par la souche Sb41.	<b>Page45</b>
<b>Figure N°22</b>	Résultat de production d'agent anti-archéenne par la souche Sb41.	<b>Page45</b>
<b>Figure N°23</b>	Localisation de l'activité inhibitrice si intra ou extracellulaire. <b>A</b> : Surnageant <b>B</b> : Culot.	<b>Page48</b>
<b>Figure N°24</b>	Résultat de concentration de l'activité d'halocine.	<b>Page48</b>
<b>Figure N°25</b>	Résultat de l'effet de concentration de sel sur l'activité anti-archéenne.	<b>Page49</b>
<b>Figure N°26</b>	<b>A.</b> Surnageant avant la dialyse <b>.B.</b> surnageant après la dialyse.	<b>Page49</b>
<b>Figure N°27</b>	Résultat de cinétique de dialyse.	<b>Page51</b>
<b>Figure N°28</b>	Effet de la température sur l'activité d'halocine.	<b>Page52</b>
<b>Figure N°29</b>	<b>A.</b> Résultat de thermo-stabilité sur l'activité d'halocine à 70°C. <b>B.</b> images qui représente les zones d'inhibition à 70 °C dépend du temps.	<b>Page53</b>
<b>Figure N°30</b>	Effet de PH sur l'activité d'halocine.	<b>Page54</b>
<b>Figure N°31</b>	Résultat de traitement du surnageant par la chaleur.	<b>Page56</b>
<b>Figure N°32</b>	Résultat d'analyse du surnageant par l'IR.	<b>Page56</b>
<b>Figure N°33</b>	Résultat d'effet antibactérienne d'halocine .	<b>Page57</b>

## *Liste des tableaux*

<b><i>Tableau 01:</i></b> Les différentes caractéristiques d'halocine les plus connues.	<b><i>10</i></b>
<b><i>Tableau 02:</i></b> Les constituants de MSH.	<b><i>18</i></b>
<b><i>Tableau 03:</i></b> Les Résultats de l'aspect macroscopique des souches.	<b><i>34</i></b>

# ***SOMMAIRE***

<i><b>Remerciement</b></i>	
<i><b>Dédicace</b></i>	
<i><b>Liste des abréviations</b></i>	
<i><b>Liste des figures</b></i>	
<i><b>Liste des tableaux</b></i>	
<i><b>Introduction générale</b></i>	01
<i><b>Chapitre 1 : Revue bibliographique</b></i>	
<i><b>1. Bactériocines</b></i>	03
<i><b>2. Bactériocines produites par les halobactéries</b></i>	03
<i><b>2.1. Halocine</b></i>	04
<i><b>2.1.1. Histoire d'halocine</b></i>	04
<i><b>2.1.2. Types d'halocine</b></i>	05
<i><b>2.1.2.a. Micro-halocines (<math>\leq 10</math>KDa)</b></i>	06
<i><b>2.1.2.a.1. Halocine S8</b></i>	06
<i><b>2.1.2.a.2. Halocine R1</b></i>	07
<i><b>2.1.2.a.3. Halocine C8</b></i>	07
<i><b>2.1.2.a.4. Halocine A4</b></i>	07
<i><b>2.1.2.b. Macro-halocines (<math>\geq 10</math>KDa)</b></i>	08
<i><b>2.1.2.b.1. Halocine H1</b></i>	08
<i><b>2.1.2.b.2. Halocine H6/H7</b></i>	08
<i><b>2.1.2.b.3. Halocine H4</b></i>	<b>09</b>
<i><b>2.1.2.b.4. Halocine HA3</b></i>	09
<i><b>2.1.3. Voie de synthèse des halocine</b></i>	11
<i><b>2.1.4. Mode d'action</b></i>	11
<i><b>2.1.5. Spectre d'activité</b></i>	11
<i><b>2.1.6. Production d'halocine</b></i>	<b>11</b>
<i><b>2.1.7. Différence entre halocine et sulfolobucine</b></i>	11
<i><b>2.1.8. Intérêt écologique et biotechnologique des halocines</b></i>	12
<i><b>Chapitre 2 : Matériel et méthodes</b></i>	
<i><b>I. Matériel</b></i>	
<i><b>I.1. Situation géographique des zones d'étude</b></i>	<b>15</b>

<i>1.1. Rocher de sel (Hadjer Elmelh</i>	15
<i>1.2. Zerhez el chergui (sebka</i>	15
<i>I.2. Matériels biologiques</i>	17
<i>2.1. Souches tests</i>	17
<i>2.2. Souches cibles</i>	17
<i>I.3. Milieux de cultures utilisées</i>	17
<b><i>II-Méthodes</i></b>	
<i>II. 1.Revivification des souches</i>	18
<i>II.2. Conservation des souches</i>	19
<i>II.3. Identification des souches d'intérêts</i>	19
<i>3. 1.Caractérisation morphologique</i>	19
<i>II.4.La cinétique de croissance</i>	21
<i>II.5.Test d'antagonisme</i>	21
<i>5.1. Antagonisme sur MSH solide (disque d'agar</i>	21
<i>5.2. Antagonisme sur MSH liquide (test des puits</i>	22
<i>II.6.La cinétique de croissance et de production d'halocine</i>	23
<i>II.7.Production d'agent anti-archéenne 'Halocine</i>	26
<i>7.1. Comparaison de la production des substances inhibitrice en milieu liquide et en milieu solide</i>	26
<i>7.2. Culture sur milieu liquide</i>	26
<i>II.8.Caractérisation préliminaire de l'activité antagoniste</i>	26
<i>8.1. Localisation de l'activité d'halocine</i>	26
<i>8.2. Concentration de l'activité halocine</i>	27
<i>8.3. Effet de sel sur l'activité d' halocine (Test de salinité</i>	27
<i>8.3.1. Effet de concentration de sel sur l'activité d'halocine</i>	27
<i>8.3.2 .Cinétique de dialyse</i>	27
<i>8.4. Effet de température sur l'activité</i>	29
<i>8.5. Thermo- stabilité</i>	29
<i>8.6. Effet de pH sur l'activité</i>	29
<i>8.7. Traitement d'activité inhibitrice par la chaleur</i>	29
<i>8.8. Analyse par infrarouge de l'halocine</i>	30
<i>8.9. Effet antibactérienne de l'halocine</i>	30
<i>II.9. Purification et conservation des souches</i>	31
<i>9.1. Sur milieu liquide</i>	31

<i>9.2. Sur milieu solide</i>	<b>31</b>
<i>Chapitre 3 : Résultats et discussion</i>	
<i>1. Revivification des souches</i>	34
<i>2. Conservation des souches</i>	34
<i>3. Caractères morphologiques</i>	34
<i>3.1.étude macroscopique</i>	34
<i>3.2. étude microscopique</i>	36
<i>3. 3.Test d'antibiose</i>	36
<i>4. Cinétique de croissance</i>	38
<i>5. Activité antagoniste</i>	40
<i>5.1. Sur milieu semi solide</i>	40
<i>5.2.Sur milieu liquide(Test de puits)</i>	40
<i>6. Cinétique de croissance et la production d'halocine</i>	43
<i>7. La production d'agent antiarchéenne 'Halocine'</i>	43
<i>8. caractérisation préliminaire d'activité antagoniste</i>	46
<i>8.1. Localisation de l'activité d'halocine</i>	46
<i>8.2. Concentration de l'activité d'halocine</i>	46
<i>8.3. Effet de sel sur l'activité d'halocine</i>	47
<i>3.1.Effet de concentration de sel sur l'activité</i>	47
<i>3.2. Cinétique de dialyse</i>	50
<i>8.4. Effet de température sur l'activité d'halocine</i>	50
<i>8.5. Thermo-stabilité</i>	50
<i>8.6. Effet de PH sur 'activité inhibitrice</i>	54
<i>8.7. Traitement du surnageant par la chaleur</i>	54
<i>8. 8.Analyse par infrarouge de l'halocine</i>	54
<i>8.9. Effet antibactérienne de l'halocine</i>	57
<i>Conclusion et perspectives</i>	59
<i>Références bibliographiques</i>	
<i>Annexes</i>	
<i>Glossaire</i>	

## *Problématique*

Les habitats hyper-salés formés depuis une longue période de l'histoire de la Terre sont caractérisés par une faible diversité microbienne (forme de vie). Les microorganismes qui vivent dans un milieu à conditions extrême de salinité où la concentration du sel très élevée, sont producteurs de substances protéiques excrétées dans l'environnement appelées halocines. , inhibent les autres micro-organismes proches.

L'existence de ces microorganismes dans les écosystèmes hyper-salins a conduit à demander :

- S'il est possible de la production des antibiotiques à partir de ces microorganismes pour des applications biotechnologiques, pharmaceutique, cosmétique,...etc.
- S'il y a des agents bactériocine (Halocine) est produite pour inhiber les croissances des autres bactéries.



*Introduction*



L'identification et la classification des micro-organismes se fait au début des années 1970, les travaux de Fox et Woese sur l'ARN de la petite sous unité de ribosome « 16s et 18s » a été effectuée afin d'établir une classification du monde procaryote.

En 1987 Woese confirme que la vie sur cette planète serait alors être considéré comme comprenant trois domaines: Bacteria, Eucarya et Archaea (Fox et woese, 1977), les chercheurs ont commencé à trouver des organismes qui survivent dans des conditions hors des normes, dans des milieux caractérisés par des conditions physiques et/ou chimiques extrêmes (Peduzzi *et al*, 2006).

Depuis la découverte des micro-organismes extrémophiles, les Archaea ont été les plus identifiées dans les environnements extrêmes (Woese *et al*, 1978); lorsque ces microorganismes localisait dans des habitats aux valeurs extrêmes de température (thermophiles extrêmes), salinité (Halophiles extrêmes) ou environnements anaérobies pour les (méthanogènes) et le pH (Kristjansson et Hreggvidsson, 1995 ; Jerome *et al*, 2004 ; Auguet et Casamayor 2008 ; Prescott *et al*, 2010).

On peut citer par exemple la température pour les hyper-thermophiles qui croissent de manière optimale au-dessus de 80°C, A l'inverse, les psychrophiles préfèrent des températures inférieures à 15°C. Les barophiles peuvent supporter des pressions allant jusqu'à 1000 atmosphères dans les grands fonds marins. Les halophiles (*Archaea* et bactéries) ; c'est une mot composé de deux parties « hals » qui veut dire le sel et « phil » qui veut dire aime, de ce fait les microorganismes halophiles sont définis comme étant des organismes qui requièrent du sel pour leur croissance (Ebel *et al*, 2004), où la concentration minimal en sels(NaCl) est de 9%, elles exigent 20% à 26% de NaCl (approche de la saturation) pour leur croissance devient optimale (Woese *et al*, 1990 ; Costenaro, 2001 ; Ventosa *et al*, 2008 ; Bautaiba *et al*, 2011).

Comme pour les autres caractéristiques des micro-organismes ; comme la température, et la croissance. La concentration de sel est un indice qui caractérise les *Archaea* halophiles (Litchfield, 1998); les environnements extrêmes est celui des lacs hypersalines ou à sel élevé. Ces habitats sont dominés par des archées haloarchaea qui nécessitent un minimum de 9% (p/v) de NaCl pour la croissance (Edgerton et Brimblecombe, 1981 ; Boutaiba *et al*, 2006 ; Madaline *et al*, 2007 ; Nina *et al*, 2012).

Les Archaea halophiles extrêmes produisent des substances protéiques qui, appelées halocines ;ces derniers sont des antibiotiques excrétées dans l'environnements, où elles inhibent la croissance des autres *Halobactéries* (Rodriguez-valera, 1982 ;Meseguer *et al*, 1985 ;O'Conner et Shand, 2002 ;Bouktit *et al*, 2003 ;Sun *et al*, 2005) ; Bien que la production d'halocine soit une

caractéristique pratiquement universelle de la plupart des halophiles extrêmes, seulement quelques-unes ont été purifiées et caractérisées au niveau protéique (Sun *et al*, 2005), trois d'entre elles se distinguent par leur haut poids moléculaire : H4, H6 et H1, toutefois, les deux micro-halocines restantes s'avèrent de petit poids moléculaires soit 3 KDa pour S8 et moins de 2.5 KDa pour l'halocine R1 (Bouktit, 2003).

L'étude entreprise au cours de ce travail a été menée à pour objectif principale : la production et la caractérisation préliminaire d'halocine produit à partir des bactéries halophiles isolé de la zahrez el chergui et rocher de sel de la wilaya de Djelfa.

Le travail a été organisé et présenté en trois parties comme suit :

- Une partie théorique Consacrée sur l'étude des Archaea en général, de plus la production d'archeocine de type halocine produit par les bactéries halophiles.
- La deuxième partie représente le travail pratique et qui indique les différentes techniques mises en œuvre afin de :
  - ❖ Production de la substance inhibitrice à partir des bactéries halophiles isolée du Zahrez el chergui et Rocher de Sel.
  - ❖ Sélectionner la souche active, productrice de substance antimicrobienne grâce aux tests d'antagonisme vis-à-vis de souche cible.
  - ❖ Caractérisation préliminaire de halocine par tests (pH, salinité, température...).
- La troisième partie décrit les résultats et la discussion ainsi qu'une conclusion générale et les perspectives de ce travail.

## **1. Bactériocines**

Les micro-organismes produisent des toxines ou bien des antimicrobiens qui tuent les autres organismes pour survivre dans leurs environnements. La production de ces substances antimicrobiennes est connue chez les organismes cellulaires des trois domaines de la vie (Shand et Levya, 2007).

Presque toutes les espèces bactériennes (99%), produisent au moins une bactériocine. Ces molécules sont des peptides ou protéine, elles sont divisées en plusieurs catégories basées sur un grand choix de facteurs, y compris le poids moléculaire, la sécrétion et le spectre d'activité. Les souches *E.coli* produisent des substances inhibitrices appelées : colicines. Cette bactériocine est la première qui a été décrite (Gratia et Fredericq, 1950 ; Densi, 2001 ; Paul B, 2008).

Les bactériocines ont une activité bactéricide intra-espèces. Cela est habituellement lié à l'organisme producteur (Kleanhammer, 1988 ; Riley, 1998). Ils sont le groupe le plus abondant et le plus divers de système de défense bactériens (Riley et Wertz, 2002).

Ils visent la cellule cible en identifiant des récepteurs spécifiques de la surface de la cellule et tue alors cette dernière en formant des canaux ion-perméables dans la membrane cytoplasmique ; ce qui provoque la lyse cellulaire, ou bien par dégradation de l'ADN ou bien l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane de la paroi cellulaire (Riley, 1998).

## **2. Bactériocines produites par les halobactéries**

Les halophiles (Archaea, bactéries) produisent des substances antibactériennes de nature protéique, nommées Archaeocines, qui inhibent la croissance des autres halobactéries (Rodriguez-Valera et al, 1982 ; Tamar et Oren, 2000). Jusqu'à présent le terme « Archaeocine » a été adopté pour distinguer le peptide et l'antibiotique produit par les Archaea (Paul B, 2008 ; Nina S et al, 2012).

## 2.1. Halocine

### 2.1.1. Histoire d'halocine

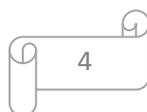
Avec la richesse des études sur les bactériocines, qui ont commencé par les travaux de Gratia en 1925 (Shand et Levya, 2007), et les eucaryocines (protéines antimicrobienne sécrétés par les eucaryotes) depuis le début des années 1960 (O'Connor et Shand, 2002). Cependant la caractérisation des peptides et des protéines inhibitrices produites par les Archaea « archeocines » n'ont commencé que récemment (Shand et Levya, 2007).

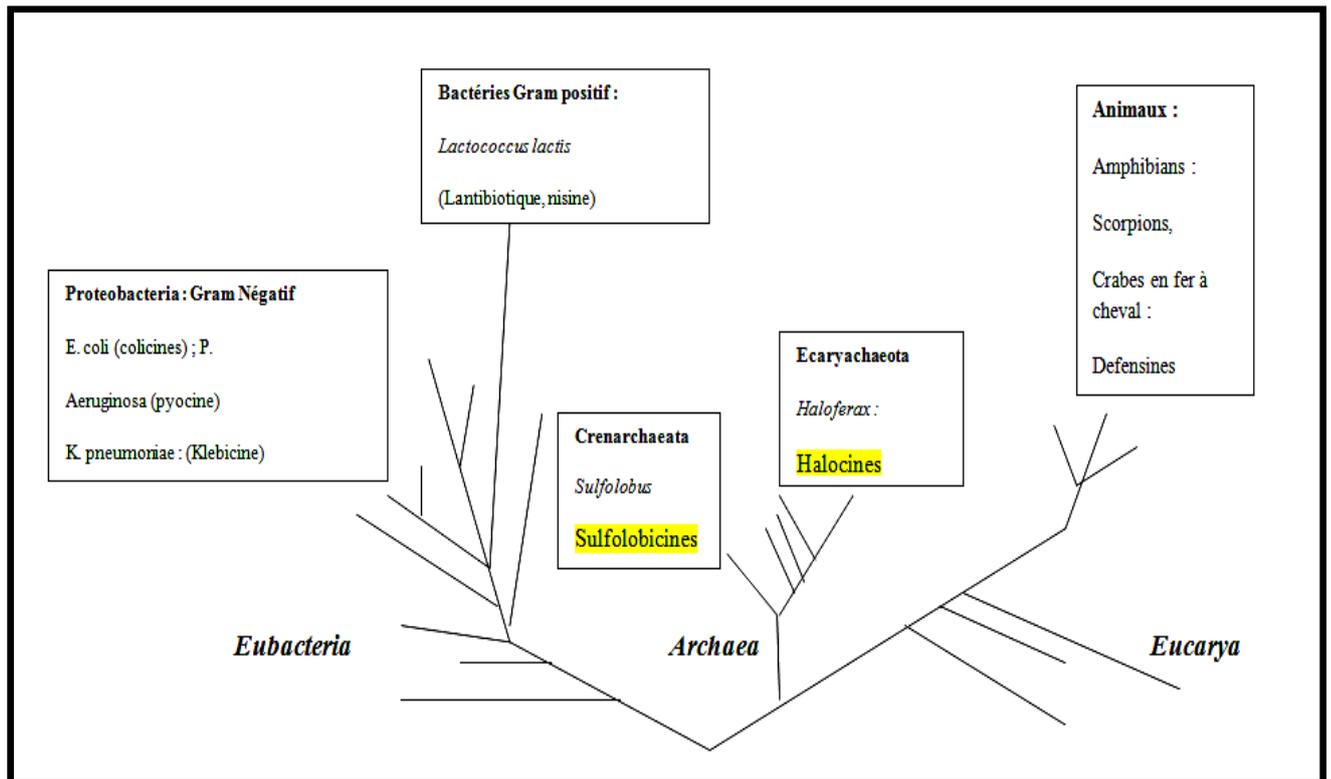
Le terme « halocine » a été inventé pour la première fois en 1982 par Francisco Rodriguez-Valera, qui a supposé que ces substances étaient les bactériocines et qui a logiquement semblable nomenclature (Joyce *et al*, 1997; Price et Shande, 2002) ; suite leurs travaux pour la mis en évidences d'un antagonisme entre les souches halophiles isolées des marais salants d'Alicante en Espagne (Torreblanca *et al*, 1994).

Les archaeocines sont produit par deux groupes phylogénétiques : Les Euryarchaeota (Haloarchaea (O'Connor et Shand, 2002 ; Shand et Levya, 2007) et les crenarchaeota (hyperthermophile) (Prangishvili *et al*, 2000 ; Haseltine *et al*, 2001 ; Paul, 2008), Cependant sept autres halocines dont une sulfolobicine n'ont été que partiellement caractérisée. Pour cela, la plupart d'Archaea a pour être examiné encore pour la production de ces molécules (Shand et Levya, 2007).

De plus il y à des souches bâtonnets halophiles probablement des halobactéries, produisent des substances qui inhibent les croissances d'autre halobactéries ; mais non celle des halococcus. (Rodriguez-Valera *et al*, 1982). La sécrétion de ces agents inhibiteurs pourrait se faire soit en phase exponentielle ou en phase stationnaire de la croissance de l'organisme producteur (Haseltine *et al*, 2001).

Bien que la production d'halocine pratiquement une caractéristique universelle des halobactéries en batonnet.(Torreblanca, 1994 ;O'Connor et Shand, 2002 ;Kharroub, 2007) Jusqu'à maintenant, seulement trois halocines ont été caractérisées en détail. Il s'agit des halocines H4, H6 qui sont produites par *Haloferax* et Hal R1 produit par *Halobactérium* ; sont tous au commencement détectés en tant que les cultures partent des croissances exponentielle et entrant dans la phase stationnaire (Joyce *et al*, 1997).





**Figure N°01 :** exemple de protéines et de peptides antimicrobiens(AMP) présents dans les trois domaines de la vie sur un arbre phylogénétique (Meknaci, 2015).

### 2.1.2. Types d'halocines

Les halocines sont divisées en halocines peptidique (micro-halocine) avec une petite taille de 3.6KDa et des halocines protéiques avec une grande taille de 35KDa (O'Connor et Shand, 2002 ; Shand et Levy, 2007). Cette dernière constitue un groupe des extrêmement archaéa halophiles qui sont placés dans l'ordre halobactériels, famille Halobacteriaceae (Gutiérrez *et al*, 2007).

Ils sont caractérisés par la stabilité thermique, et sel-dépendance. Leurs spectres d'activité sont typiquement 'larges' en ce qui concerne les haloarchaéa. Cependant quelques micro-halocines ont démontré une action inhibitrice contre des microorganismes appartenant aux autres phylums (shand et Levy, 2007).

### **2.1.2.a. Micro-halocines**

Dans la nomenclature des bactériocines, Ceux ayant un poids moléculaire compris entre 5 KDa et 10 KDa sont placés dans une catégorie spéciale appelée les micro-cines (Price et Shand, 2000).

Ce sont donc des peptides de poids moléculaire inférieur à 10KDa, hydrophobes et robustes, résistant à la chaleur, au dessalement et à l'exposition à des solvants organiques. A la différence des bactériocines et des eucaryocines, les micro-halocines possèdent un grand nombre de résidus neutres et ne sont pas cationiques (O'Connor et Shand, 2002; Li et al, 2003).

Les seules halocines décrites au niveau peptidique sont C8 (Sun *et al*, 2005) et S8 (Price et Shande, 2000), après le temps les chercheurs ont découvert des autres types des micro-halocines. On distingue les types suivants :

#### **2.1.2.a.1. Halocine S8**

Halocine S8(HalS8) est produite par la souche S8a, isolée du Grand lac salé, est un micro-halocine hydrophobe de 36 acides aminés (3,58KDa), c'est la première micro-halocine à être décrite. Cet antibiotique de peptide est unique. De plus est situé à l'intérieur d'une protéine du résidu 311 de la quelle ils sont libérés par mécanisme inconnu (Shand et O'connor, 2002).

L'halocine S8 est tout à fait robuste, car il peut être dessalé, bouilli, soumis aux dissolvants organiques, et être stocké à 4 °C pendant des périodes prolongées sans aucune perte de l'activité. En outre l'halocine S8 résiste à la trypsine, mais sensible à la protéinase. La séquence des acides aminés complète de cette halocine est la suivante :

H<sub>2</sub>N-S-D-C-N-S-N-T-A-A-D-V-I-L-C-F-N-Q-V-G-S-C-A-L-C-S-P-T-L-V-G-G-P-V-P-COOH.

L'activité d'halocine met en parallèle des niveaux de la transcription de gène Hal S8, leur activité est beaucoup plus caractérisée à la phase stationnaire (Shand et Price, 2000 ; Shand et O'Connor, 2002 ; Riley *et al*, 2002).

### **2.1.2.a. 2.Halocine R1**

C'est la deuxième halocine caractérisé produit par la souche *Haloarchaeom salinarum*, à l'origine d'isolement dans Néger de Guerro(Mexique); est un micro-halocine de 38acides aminés (3.8KDa) (Shand et O'Connor, 2002 ; Sun *et al*, 2005). Comme la plupart de halocines l'activité Hal R1 est d'abord détecté dans les surnageant de culture à la transition à la phase stationnaire (Cheung *et al*, 1997), à la déférence de H6, l'halocine R1 ne semble pas être archeaolytic, puisqu'il ne cause aucun changement de la densité optique de la cellule.

Comme hlocine S8, l'activité Hal R1 est inchangée en dessalement, aussi elle est résistant aux acides, aux bases et aux solvants organiques, leur activité est résistant à ADN<sub>ase</sub>, ARN<sub>ase</sub>, protéases spécifiques telle que la pipérine, trypsine ou thermo-lysine ; mais aux protéases générales telle que la protéinase. K.

L'activité de Hal R1 à été stable pour cette années à 48°C, bien que pas aussi thermostable que Hal S8, Hal R1 maintien 100% de son activité après incubation à 60°C pour 24h ; mais perd toute son activité après 5min à 93°C (Shand et O'Connor, 2002).

### **2.1.2.a.3 Halocine C8**

Halocine C8 c'est une micro-halocine extrêmement stable, montrant une forte activité antimicrobienne contre les halo-archaea (Mei *et al*, 2008) et aussi hydrophobe, son activité est maximale sur la transition d'exponentiel à phase stationnaire (Sun *et al*, 2005), excrété par *halobactérium*.

C'est une micro-halocine de 76 acides aminés et 6.3KDa. (Mecnaci *et al*, 2014) Elle est sensible à la protéinase K mais pas à la trypsine. L'halocine C8 est tout à fait stable, su fait qu'elle peut être dessalée, bouillie, congelée, et soumise à des dissolvants organiques et entreposé dans le surnageant du culture à 4°C. L'halocine C8 présente un spectre d'activité très large (Li *et al*, 2003).

### **2.1.2.a.4.Halocine A4**

L'hlocine A4, est produite par une halobactérie non caractérisée, isolé à partir d'un marais salin Tunisien par Pfeifer. Sa masse moléculaire est de 7.435KDa (très similaire à l'halocine C8), (Meknaci, 2015).L'halocine A4 caractérisée par :

\* n'étaient pas toxique pour le *solfatarius* de *sulfolobus* ;

\*le traitement à (protéase) du halocine A4, est inactivé la toxicité ; indique que le facteur A4 toxique est doit être une protéine.

\*La supplémentations de chlorure de potassium ; à renforcé la toxicité ; impliquant l'utilisation de mécanisme sel dépendant.

\*L'utilité des halocines A4 pour la manipulation génétique du *solfatarius* de *sulfolobus* ; à été évaluer par l'isolement des mutants résistants causé par l'UV. (Haseltine *et al*, 2001).

### **2.1.2. b. Macro-halocines ( $\geq 10\text{KDa}$ )**

Sont des protéines supérieur de 10KDa, on peut distinguez les halocines H1 et H4, jusqu'à maintenant ces deux types sont déterminer au niveau protéique :

#### **2.1.2. b.1. Halocine H1**

L'halocine H1 est une bactériocine produite par un halophiles extrêmes isolé à partir de la méditerranée. Il s'agit de l'archaea *Haloferax*, Pour une production optimale de l'halocine H1, il faut la concentration en sel de 20% et une température entre 37 et 42°C(Platas *et al*,1996). Cette bactériocine possède un poids moléculaire de 31 KDa et un large spectre d'activité contre les haloarchaea. L'activité de cette dernière est décelable pendant la phase exponentielle au lieu du début de la phase stationnaire. Comme pour la plupart des autre halocines (Shand et O'connor, 2002 ; Li *et al*, 2003).

#### **2.1.2.1. b.2. Halocine H6/H7**

Halocine H6/H7 à été obtenu à partir du surnageant de culture de la souche *Haloferax gibbonsii* (Torreblanca *et al*, 1989), à été isolé la première fois et décrit par Torreblanca et autres en 1989, l'activité est produisent au transition dans la phase stationnaire, car l'activité attentent les niveaux maximaux à la phase stationnaire et diminue alors graduellement ensuite , c'est une substance de poids moléculaire de 32KDa (Shand et O'Connor, 2002). Du plus le mécanisme d'action à été établi seulement pour l'halocine H6.(Shand et Price, 2000 ; Riley *et al*, 2002). L'halocine H6 empêcher la sorti provoquer par la lumière de  $\text{Na}^+$  dans des vésicules de la membrane de *halobium* de *Halobactérium* (Meseguer *et al*, 1995).

Elle est caractérisé par :

\*elle est non sel-dépendant (maintien son activité après exposition à l'eau distillée), (Torreblanca *et al*, 1989), sensible à la prônasse ; qui dénature la nature protéique de cette dernière mais pas à la trypsine même à une concentration de 5mg.

\*Hal H6 est caractérisée par la résistance de la chaleur : il est reste entièrement actif après chauffage à 90°C pendant 10min, et après traitement thermique à 100°C ; l'activité maintient 50% (Torreblanca *et al*, 1989 ; Shand et O'Connor, 2002).

#### **2.1.2. b.3. Halocine H4**

L'halocine H4 produite par *Halobacterium*(ATCC33500), C'est la première halocine étudiée et maintiennent bien caractérisé aux niveaux de la transcription d'ADN (Meral et Selda, 2005), est un antibiotique de nature protéique avec une masse moléculaire de 34.9KDa (mûre) et 39.6KDa (pré-protéine), mais à partir les études qui fait par Rodriguez-Valera et Perey : La masse moléculaire est de 30à33.5KDa (Shand et O'Connor, 2002). L'activité d'halocine H4 est produite en phase stationnaire (Messuger et Rodriguez –valera, 1985 ; Cheung *et al*, 1997).

L'halocine H4 est caractérisée par :

\* sensibilité aux protéases et à la chaleur, la duré de conservation du halocine H4 concentré est 115-159jours à 48°C, bien que il y a aucun perte d'activité à 51°C après 24h d'incubation, mais elle est perdu complètement à 60°C après 24h.

\* L'activité a été également perdu quand la concentration de sel est réduite en dessous de 5%(Shand et O'Connor, 2002)

#### **2.1.2. b.4.Halocine HA3**

HA3 est un macro-halocine avec une poids moléculaire de 13KDa par l'analyse MALDI-TOF (Ms/ Ms), produit par la souche Haloferax qui peuvent se développer de façon optimale dans le milieu qui contient 15% de NaCl, à pH 7.2, 42°C dans les conditions aérobies. Bien que ce type d'halocine n'a suggéré aucun homologie avec les halocines connues, il est caractériser par :

\*Il est stable à 80°C à pH2, 10, à dissolvants organiques, cependant l'activité de ce dernier à été complètement réduite en présence de la protéinase.K et de la trypsine. Sensible à l'acide biliaire (Vijay et Santosh, 2017).

**Tableau N°01:** les différentes caractéristiques d'halocine les plus connues (Shand et O'connor, 2002).

<b>Halocin</b>	<b>Producer (source)</b>	<b>Size (kDa)</b>	<b>Thermal stability</b>	<b>Salt - dependent</b>	<b>Activity spectrum</b>	<b>Mechanism</b>	<b>Refs.</b>
<b>S8</b>	Strain S8a ( Great Salt Lake, UT)	33.9 ( preprotein ) 3.6( mature )	≥ 24 h at boiling	No	Broad Sulfolobus spp.	ND	[ 17,48,56 ] (O'Connor Eand R Shand, unpublished) [ 17,47,56 ]
<b>A4</b>	Strain TuA4 ( solar saltern, Tunisia )	<5	≥1 week at boiling	No	Broad Sulfolobus spp.	ND	[ 17 ] (Kemper S and R Shand, unpublished) [ 59]
<b>R1</b>	Halobacterium strain GN101( solar saltern, Mexico)	3.8	60°C	No	Broad Sulfolobus spp. M. thermophila	ND	[ 17,48,56 ] (O'Connor Eand R Shand, unpublished) [ 17,47,56 ]
<b>H1</b>	Hfx. mediterranei Xai3( solar saltern, Spain )	31	<50°C	Yes	Broad	Membrane permeability ND	[ 44,45,52 ]
<b>H4</b>	Hfx. mediterranei R4( solar saltern, Spain )	39.6( preprotein ) 34.9( mature )	<60°C	Partially	Narrow	Proton flux?	[ 8,33,34,36,43,52,56 ]
<b>H6/H7</b>	[ 8,33,34,36,43,52,56 ] ( solar saltern, Spain )	32	≤90°C	No	Narrow	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter inhibitor	[ 1,36,52,63 ]

### **2.1.3. Voie de synthèse d'halocine**

Les antibiotiques peptidiques peuvent être synthétisés par deux manières différentes : ribosomale, des transcriptions (gène codé), ou par étape de synthèse qui utilise des complexes de multi-enzyme ou séquentiel réactions enzymiques (Shand et O'Connor, 2002).

### **2.1.4. Mode d'action d'halocine**

Les membres d'halophiles de domaine Archaea est produisent des antibiotiques protéiques extériorisé dans leurs environnement, où ils tuent ou empêchent l'autres halo-archaea (Price et Shand, 2000). Ce type de bactériocines détruit les membranes cellulaires ou inhibe la transcription, la traduction et l'activité nucléasique (ADN et ARN)(Kharroub, 2007).

### **2.1.5. Spectre d'activité**

L'activité de halocine est d'abord décelable dans des supernatants de culture au début de la transition dans la phase stationnaire, pour une induction du gène de structure (Shand et O'Connor, 2002).

### **2.1.6. Production des halocines**

En prenant un exemple de la production de l'halocine H4, l'activité de ce dernier est apparu d'abord dans la culture à la phase stationnaire. Il est important que les surnageants de culture soient récupérés, quant l'activité est la plus élevée.

En outre, il peut être avantageux d'optimiser les conditions de croissance telle que la température, la concentration en sel et aussi la source de nutriments. La plupart des halocines connues ont été obtenues par fermentation liquide et aucune extraction ou production n'a été faite à partir d'un milieu solide jusqu'à aujourd'hui (Meknaci, 2015).

### **2.1.7. Différence entre halocine et sulfolobine**

Tandis que l'activité inhibitrice affectez un grand choix de genre haloarchaeal( royaume Euryarchaeota),ils existe également la toxicité protéique de croix-royaume, empêchant ou tuant des espèces de sulfolobus (royaume crenarchaeota).En conclusion les archéocines également sont produits par les hyperthermophiles (pranchvili *et al*, 2000 ; Shand et O'Connor, 2002 ; Ellen *et al*, 2011).

Les archéocines produit par les sulfolobus sont entièrement différents de halocine ; puisque leurs activité est principalement associée à la cellule et pas le surnageant. Prangishvili et autre, étaient le premier pour isoler et caractériser ces toxines protéiques, qui appelés « sulfolobine » (Shand et O'Connor, 2002).

Les sulfolobocines empêchent *salinarum* ou *E.coli*, ces dernières sont caractérisées par :

\*libération d'activité dans le milieu à la phase exponentielle.

\*l'élevage des cellules n'est pas induit par le choc UV et froid (80-258°C), PH choquer (PH3-7).

Ces antibiotiques de la protéine 20KDa, ne sont pas excrétés dans l'environnement, mais sont lié à de petites particules a apparemment dérivé de la couche de la cellule (Shand et O'Connor ,2002).

### **2.1.8. Intérêt écologique et biotechnologique des halocines**

Les microorganismes halophiles ont trouvées un certain nombre d'application intéressantes dan la biotechnologie (Galinski et Tindall, 1992). Par exemple les halophiles de domaine *Archaea* sont caractérisés par leur structure et leur fonction et aussi caractérisés par production des substances inhibitrices qui jouent un rôle dans la biotechnologie. Les halocines sont un groupe d'antibiotiques potentiellement intéressant qui inhibent les halo-archaea phylogénétiquement liées, ceci est donc une caractéristique universelle des souches haloarchaéenes (Litchfied, 2011).

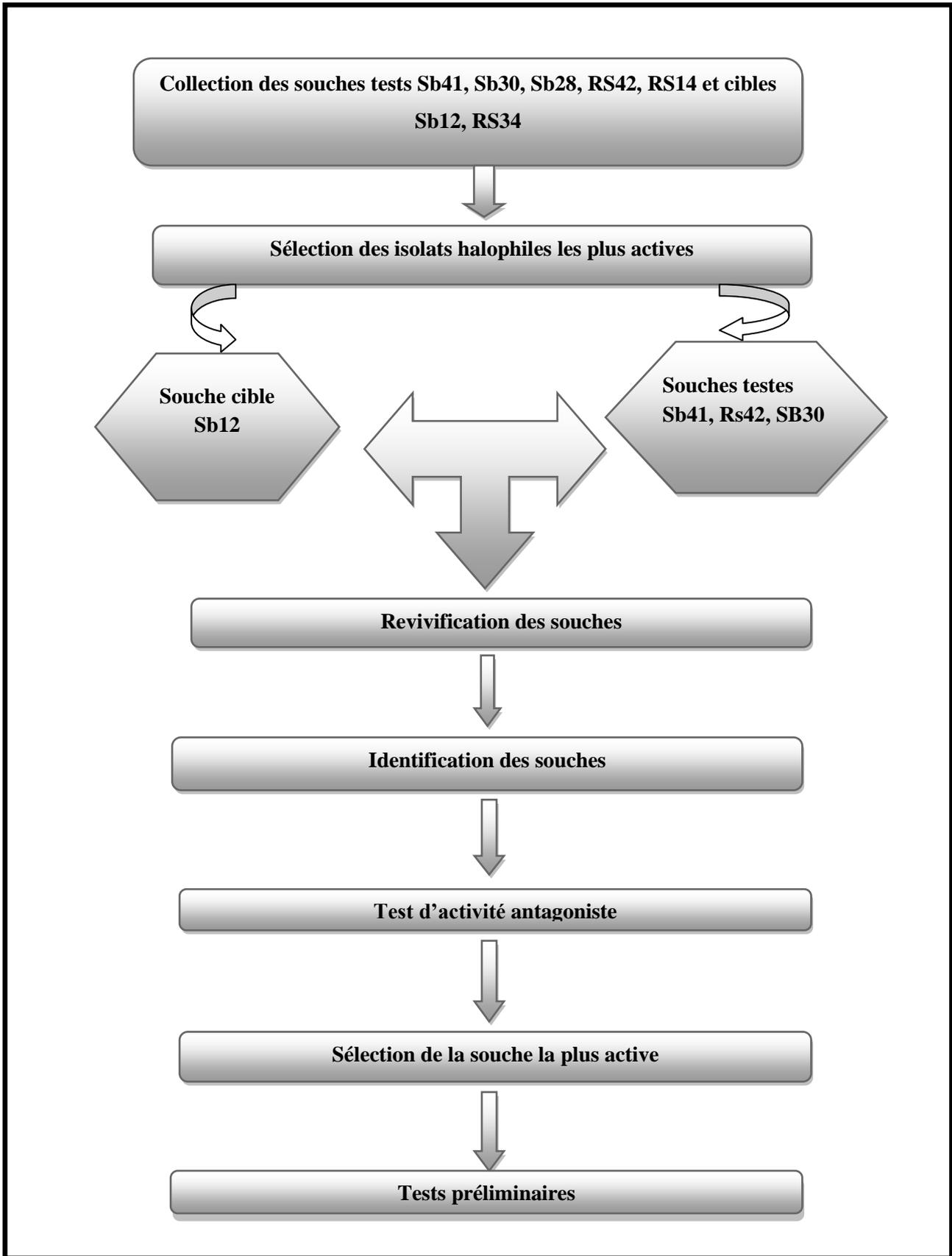
Entant que protéines stables, les halocines peuvent rester long temps dans leurs environnements pour réduire la concurrence au cours des phases de flux d'éléments nutritifs. La stabilité des halocines peut donc aider à expliquer pourquoi il y'a une faible diversité des espèces dans les environnements hyper-salés (Riley et *al*, 2002).

Les Halocines sont généralement produites dans la phase stationnaire, la production de ces dernière peut être une avantage, puisque les études montre que au moins 15 types différents des halocines avec différents spectre d'activité .Ainsi un rôle possible pour les halocines peut être fait la concurrence avec le croix- phylum (Oren, 2000).

Du plus, à partir ces diversité on peut utiliser les halocine en biotechnologie par exemple : les deux peptides de Hal R1 et Hal S8 sont irréversibles, puisqu'ils doivent être doivent être responsables des différences dans le spectre d'activité et la résistance thermique car : H8 a quatre cystéines, tandis que R1à seulement une cystéine, étant donnée que les deux halocines ne sont pas cationique comme les bactériocines et les eucaryocines. Il sera intéressant pour découvrir leurs mécanismes d'action (Shand et O'Connor, 2002).

L'halocine H7 c'est le première inhibiteur physiologique spécifique à été décrit qui inhibe la pompe  $\text{Na}^+\text{H}^+$  chez les halobactéries et chez un modèle de mammifères (Meseguer

*et al*, 1995), aussi l'halocine HA3 est peut-être applicable pour le contrôle de haloarchaea en environnements et nourritures salées (Vijay et Santosh, 2017).



**Figure N° 02 :** Organigramme général du travail.

Le présent travail à été réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie de faculté des sciences de la nature et de la vie à l'université Ziane -Achour de Djelfa ; durant cinq mois de l'année universitaire 2016\_2017 et dans laboratoire de C.A.C.Q.A.

Ce travail vise essentiellement la mise en évidence la production et la caractérisation partielle de substances antibactériennes « Halocines » produites par des souches bactériennes extrêmement halophiles isolées à partir de deux milieux hyper-salins à savoir le Rocher de Sel et la Sebka de Zahrez chergui dans la wilaya de Djelfa.

Ce travail fait suite à la recherche entrure effectuées sur les deux hyper-salées, pour fait une étude approfondie pour obtenir des nouveaux résultats ; qui donne une valeur pour la recherche scientifique.

### **I-Matériel**

#### **I.1.Situation géographique des zones d'études**

##### **1.1. Rocher de sel (Hadjer Elmelh)**

Le Rocher de sel se situe à 25Km au Nord de la ville de Djelfa, dans la commune de Ain-Maabad, entre les cordonnées géographiques latitude : 34°.77' 39.04" Nord et longitude : 3°17' 37.89" Est, et s'élève sur une altitude de 1083m. Le nom de Rocher de Sel est usuel, il n'est pas une traduction exacte du nom indigène qui est Khanguet-el-Melah littéralement : le "défilé du sel". Pourtant les deux noms ont été certainement suggérés l'un et l'autre par les falaises et les canyons de sel gemme nu. Autres noms utilisés par les gens de Djelfa, le plus connu est le nom de HADJER EL-MELH, l'origine du nom arabe est inspirée à partir de sa nature de sel gemme (Gauttier, 1914). (**Figure N°03**)

##### **1.2. Zerhez el chergui (sebka)**

Le Chott Zehrez Chergui est situé dans la frange méridionale des hautes plaines steppiques algériennes à 50 km au Nord-Est du chef lieu de la Wilaya de Djelfa, à 11 km au Sud de la Commune de Hassi-El-Euch et à 25 km au Sud de la Commune de Had-Sahary. Le chott est séparé de Zehrez Gharbi par la route nationale Une (RN1) à une distance de 50 km (**FigureN° 04**) (Minister de l'agriculture et du développement rural, 2003 ; Derradjin.N *et al*, 2013).

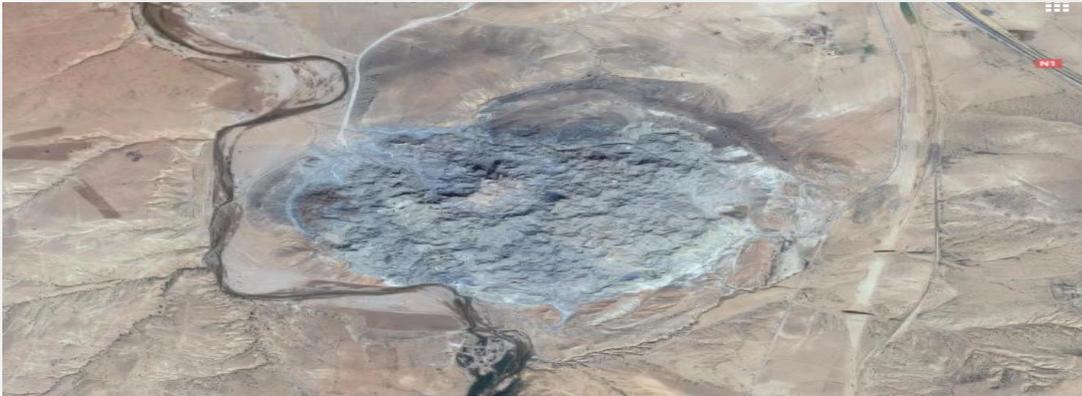


Figure N° 03 : Situation géographique de rocher de sel (Google Earth).

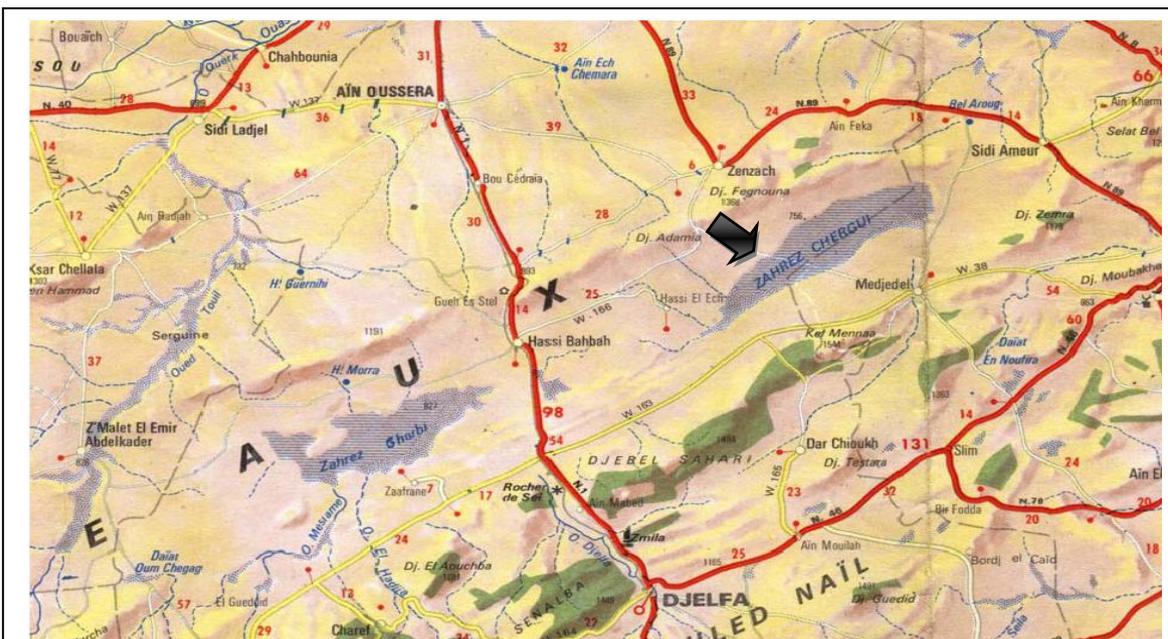


Figure N° 04 : Situation géographique de Zerhez el chergui (Minister de l'agriculture et du développement rural, 2003).

## **I-2. Matériels biologiques**

### **I-2.1.Souches Tests**

Les souches étudiées sont des isolats halophiles extrêmes, isolées au Rocher de Sel (Benhamida et Yousfi, 2015) et qui portent les initiales RS pour Rocher de Sel et celles isolées à partir du chott de Zahrez Chergui (Bakria et Ramdani, 2015) et qui sont codées par Sb pour désigner sebkha.

En se basant sur les résultats des travaux de Lhoul et Kihoul, (2016), trois isolats ont été choisis pour cette étude à savoir Sb41, Sb30 et RS42, ces isolats ont montré une meilleure production de l'activité halocine (Lahoul et Kihoul, 2016).

### **I.2.2.Souches cibles**

La souche Sb12 a été sélectionnée pour l'étude de l'activité halocine intra-spécifique (entre archaea). Cependant les souches de références, *Staphylococcus aureus* (ATTC : 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATTC : 27853) et *Escherichia coli* (ATTC : 25922) ont été utilisées comme souches cibles afin de déterminer le spectre d'action de l'halocine ou bien l'activité interspécifique. Ces dernières ont été choisies car elles ont une croissance rapide (moins de 24 heures) à 37°C.

## **I-3. Milieux de cultures utilisées**

Il est connu que les bactéries hyper-halophiles ont des exigences nutritionnelles Variables et leur étude nécessite l'utilisation de plus d'un milieu de culture (Oren *et al*, 1997). Parmi Ces milieux ; le MSH qui convient le plus utilisé pour les souches étudiées, car contiennent des sels minéraux, une source organique complexe (extrait de levure) (Kharoub, 2007). Aussi le pH doit être ajusté à 7 (Hacène *et al*, 2004).

La composition du milieu MSH en g/l est donnée dans le tableau suivant :

**Tableau 02 :** Composition du milieu MSH.

<b>Le produit chimique</b>	<b>Quantité en (g)</b>
<b>NaCl</b>	200
<b>MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O</b>	50
<b>MgCl<sub>2</sub>6H<sub>2</sub>O</b>	32
<b>KCl</b>	05
<b>CaCl<sub>2</sub>2H<sub>2</sub>O</b>	0.8
<b>NaBr</b>	0. 6
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	0.16
<b>Extrait de levure</b>	05 g

Le milieu solide est obtenu par l'ajout de 20 g/l d'Agar. Cependant le milieu semi solide en contient uniquement 15 g/l. Le milieu liquide est bien entendu dépourvu d'Agar.

## **II-Méthodes**

### **II. 1.Revivification des souches**

Fait de revenir à la vie, La revivification des souches ce fait sur un milieu spécifique pour l'obtention d'une culture jeune (Benhammou et Bekkara, 2009).

Cette étape est fait afin de prendre notre souches étudiées ( Sb41,Sb30, RS42et Sb12) de phase de endurance vers la phase d'activation . Par les étapes suivantes :

Tout d'abord on fait sortir les souches, conservées dans la gélose inclinée, du réfrigérateur et qu'on laisse pendent 2heures pour prendre la température ambiante. Après cette période fait l'ensemencement des souches sur les boites de Pétri ; qui déjà gélosé par MSH solide sont étiquetées on mentionnant le code de la souche, la date d'ensemencement et les nomes des binômes. L'ensemencement se fait par la méthode de trois quadrants (méthode d'épuisement)

#### **Mode opératoire :**

A l'aide d'une anse en platine on prélève un inoculum du tube incliné contenant la souche cible (bien sur après avoir flambé la anse), puis on ensemence en stries séries unidirectionnelles par la méthode de trois quadrants, ensuite met le para film sur les apprennes des boites, mettre les boîtes préparées dans un sachet étanche contenant du papier humidifié afin d'empêcher la dessiccation de la gélose et les placer retournées (couvercle vers le bas) à l'étuve à température de 40°C pendent 21jours.

**Lecture des résultats :** après l'incubation ; l'observation de résultat se fait par l'apparition des colonies sur la gélose.

## **II.2. Conservation des souches**

La conservation des souches se fait dans des tubes inclinés contenant le milieu MSH solide, on ensemence les souches en strie sur la surface des tubes. Après incubation à température 40°C pendant sept jours puis on les conserve à température +4°C dans le réfrigérateur.

## **II.3. Identification des souches d'intérêts**

Pour identifier les souches, nous utilisons les tests proposés par Oren et al. (1997). Pour la description de nouveau taxon dans l'ordre des Halobacteriales. Les tests d'identification des souches est fait l'année passée par Wahiba Houache et Djamilia Sakhri, mais nous allons faire des tests importants afin d'obtenir des résultats qui donnent une valeur à nos travaux.

### **II.3. 1. Caractérisation morphologique**

#### ➤ **Étude macroscopique :**

L'aspect macroscopique des colonies (forme, taille, couleur) est déterminé après incubation à 40°C sur gélose MSH (solide) à 20% de NaCl pendant 7 jours par l'observation à l'aide d'une loupe de type Motic.

#### ➤ **Étude microscopique :**

Cet examen a été effectué pour déterminer la forme et la mobilité des cellules. On prend des colonies bien isolées à partir des cultures jeunes et on dépose sur lame avec une goutte de solution saline 15‰ pour l'obtenir un frottis, on dépose la lamelle tout doucement pour éviter les bulles d'air, ensuite on fait l'observation à l'aide d'un microscope optique de type (Motic BA300) sous un grossissement 4x ; 40x ; on passe à un grossissement 100x par l'ajout d'une goutte de huile d'immersion.

#### ➤ **La coloration de Gram :**

Par contre aux bactéries, la coloration de Gram pour les haloarchées est modifiée par l'utilisation de solution saline 15‰ afin d'obtenir un frottis, on laisse à l'air sec ensuite on utilise les étapes de coloration de Gram simple :

\*Sur la lame inclinée on dépose une goutte de violet de gentiane, on laisse pendre 30 sec à 1 min, puis on rince la lame à l'eau distillée, après on ajoute une goutte de lugol pendant 30 sec à 1 min, on rince avec l'eau distillée.

\*une étape de décoloration (rapide) à l'aide de l'alcool+acétone ; on dépose sur la lame inclinée pendant 10 sec, après on la rince avec l'eau distillée.

\*Dernièrement une étape de recoloration avec la fushine (pendent 1min), lavez doucement avec l'eau distillée.

\*Séchez la lame et fait l'observation à l'aide d'une goutte de huile à immersion (grossissement x100) (Dussault, 1995).

\*La lecture de résultat se fait par l'apparition des colonies rose qui indique notre souches est (Gram -) ou bien violet qui indique que notre souche est (Gram +) après observation par microscope optique.

### ➤ **La coloration de Gram par KOH :**

La méthode a été initialement décrite par **Ryu (1940)** et réintroduite par Gregersen (1978), elle est basée sur l'utilisation de solution KOH 3% qui permet, d'une part de distinguer entre la bactérie Gram – et Gram + et d'autre part, libérer l'ADN de la cellule, par la lyse cellulaire (George et al, 1982 ; Colwell et Grygovora, 1987).

On prenant une colonie et déposer Sur un lame avec une goutte de solution KOH 3% et en effectuant un mouvement circulaire pendent quelques secondes et on tire le mélange vers le haut; si un filament former entre la lame et la pipette pasteur. On dit la bactérie est Gram négatifs, si absent la bactérie est Gram positif.

### ➤ **Test d'antibiose :**

Ce test est fait à fin de testez la résistance des souches tests (Sb41, Sb30, RS42, SB12) avec la présence des antibiotiques sur des milieux différents selon l'antibiotique soit liquide ou sous forme des disques.

**-Test en milieu liquide :** Préparer un milieu liquide complet stérile et à l'aide d'une micropipette ajoutez l'ampicilline (100µl/200ml) puis versez dans des tubes à vice etensemencées par les souches étudiées et mesuré la Do initial, ensuite transférés dans un incubateur agité avec une vitesse de 100tour/min et à température de 40°C pendent Cinq jours.

La croissance des souches est déterminée par la mesure de la différence entre la Do initiale et la Do final.

### **- Test en milieu solide (diffusion en disque)**

La diffusion en disque se référé à la diffusion d'un agent antimicrobien d'une concentration spécifique à partir de disques, dans le milieu de culture solide, qui a étéensemencé avec l'inoculum (Manuel terrestre de l'OIE, 2008). Ce test est très simple consiste àensemencées les souches sur un MSH semi-solide et déposer les disques d'antibiotique, dans ce

test nous allons choisir quatre antibiotiques ‘bacitracine, pénicilline; l’ampicilline et amoxicilline, le test se fait comme suivant :

Dans un tube à vice qui contient 3 ml de solution salin 15°/o met des colonies de souche étudiée pour obtient une suspension bactérienne (couleur rose) .versez ce dernier sur milieu semi solide (ensemencement par inondation) ; laissez la boîte pendent 2 heures.

Déposer tous doucement les disques fermement à la surface de la gélose inoculée et séchée. Le contact avec la surface doit être étroit, il est préférable de ne pas mettre plus de 6 disques sur une boîte de 90mm, ansai doivent être espacé de 24mm. Les disques une fois déposés ne peuvent être déplacés car la diffusion des antibiotiques est très rapide (Amhis *et al*, 2005;Bonnet *et al*, 2017).

Le nombre de disques déposés par boîte est limité du fait du chevauchement des zones d’inhibition et pour limiter les interférences entre les antibiotiques. Il est important que les diamètres des zones d’inhibition soient mesurables, ensuite incubés à 40°C pendent5 jour (Bonnet *et al*, 2017).

La méthode de diffusion en disque est basée sur la détermination d’une zone d’inhibition proportionnelle à la sensibilité bactérienne vis-à-vis de l’antibiotique imprégnant le disque.

### **II.4.Cinétique de croissance**

On prépare, des flacons stériles sont été préparés contenant 50 ml de milieu de culture liquide, inoculés par les souches actives sélectionnées ; les flacons ensuite sont met dans un incubateur sous l’agitation à 40°C avec une vitesse de 150 tour/min pendant 7 jours.

Chaque jour stérilement prendre des prélèvements pour mesurer la densité optique avec un spectrophotomètre à 680 nm.

### **II.5.Tests d’antagonisme**

Les méthodes utilisées pour évaluer l’activité antimicrobienne *in vitro* sont nombreuses et donnent parfois des résultats différents selon les conditions expérimentales adoptées par chaque manipulateur (Suhr et Nielsen, 2003), les plus utilisées sont la méthode de diffusion sur l’agar et la méthode des puits.

#### **II.5.1.Antagonisme sur MSH solide (disque d’agar)**

Ce type de production d’agent antibactérienne ce fait par la méthode de disque d’agar (Tortorano *et al*, 1979), le principe est basé sur la diffusion d’agent antibactérienne sur « MSH semi-solide »ensemencée par souche cible.

Dans notre étude les souches « Sb12, Sb41, Sb30 »sont testées contre une souche cible (Sb12). En prélever un inoculum du Sb12 et met dans un tube à vice contient 3ml de solution salin (15%)

et agiter à l'aide d'un vortex jusqu'à ce qu'il devienne une couleur rose et on mesure la DO de cette solution, il faut garder la DO entre 0.2-0.5nm.

A l'aide d'une micropipette prélever stérilement 1 ml de cette suspension bactériennes et étaler sur la boîtes gélosée (**méthode d'ensemencement par inondation**), laisser la boîte sécher et tester les trois souches sur une seule souche cible au même temps sur la même boîte par prendre un disque d'agar de chacune de souche testé et déposer préalablement sur la gélose, la boîte est mise dans un sac en plastique et incubé dans l'étuve à 40°C pendant 6 jours.

L'activité antibactérienne est observée par des zones d'inhibition apparait autour des dépôts de disque et mesurez leurs diamètre (**Figure N°06**).

### II.5.2. Antagonisme sur MSH liquide (test des puits)

L'étude de présence d'activité antibactérienne sécrétés par les souches tests contre une souche cible se fait par le test des puits. Ce test se fait par deux étapes :

#### a-Préparation de souche cible :

À l'aide d'un râtelier prendre des colonies bien séparés de souche cible Sb12 et mettre dans un tube à essai qui contient 3 ml de solution saline 15‰ et agiter par un vortex. Ensuite prendre 1 ml de suspension bactérienne et étaler sur les boîtes de Pétri qui sont déjà gélosées par MSH Semi Solide.

Laissez les boîtes sous la hotte pour sécher pendant un heure et tracer les puits par pipette pasteur stérile.

#### b- préparation des souches tests

On utilise des flacons 250 ml contenant chacune 50ml du MSH liquide stérile inoculées par les souches testées (Sb41, Sb30 et RS42), agiter bien par un vortex et mesure la DO du jour de préparation ( $t_0$ ), après incubé dans un incubateur –agité (type Stuart-SI500) avec une vitesse de 150 tours à 40°C pendant 7 jours.

En suivent quotidiennement la croissance bactérienne par prendre 2ml, l'un met dans une cuvette pour mesure la DO par spectrophotométrie type BECKMAN à 680 nm jusqu'à où la croissance est arrêtée, et l'autre pour conserver dans des tubes eppendorfs. Ces derniers sont centrifugés à 5000 rpm (SIGMA320) pendant 20 min à 4 °C et on récupère le surnageant de chaque souche test.

On prend 200µl de chaque surnageant du (jour 0 jusqu'à le jour 7) et déposé dans les puits à la surface des boîtes ; laissées à température ambiante pendant 2 h sous hotte (pour permettre

la diffusion d'agent antibactérienne sur la gélose). Les boîtes ensuite sont mises dans des sacs en plastique et incubées à 40°C pendant 7 jours.

L'activité inhibitrice est observée uniquement où la présence d'une zone d'inhibition (Figure N°05).

## **II.6. Cinétique de croissance et de production d'halocine**

La cinétique de croissance et la production de substance inhibitrice est étudiée afin de déterminer la phase maximale de production, à cause de ce fait une série de tests ; qui sont basés sur la mesure de la densité optique des cultures liquides et le diamètre de zone d'inhibition en fonction du temps d'incubation (Mecnaci, 2015). Le test se fait comme suit :

On utilise des flacons de 250ml contenant chacun 50ml du MSH liquide stérile inoculés par les souches tests, agités par un vortex et mesure de la Do au jour de préparation ( $t_0$ ), après incubation dans un incubateur – agité avec une vitesse de 150 tours/min à 40°C pendant 7 jours. quotidiennement la croissance bactérienne est suivie par la mesure à l'aide d'un spectrophotomètre Do à une longueur d'onde de 680 nm jusqu'à où la croissance est arrêtée ; on prend 1 ml de chaque culture bactérienne conservée dans des micro-tubes eppendorfs et centrifugé à 5000 rpm pendant 20min à 4°C pour séparer le culot et le surnageant ; les deux sont conservés à -20°C afin d'être utilisés pour les autres tests.

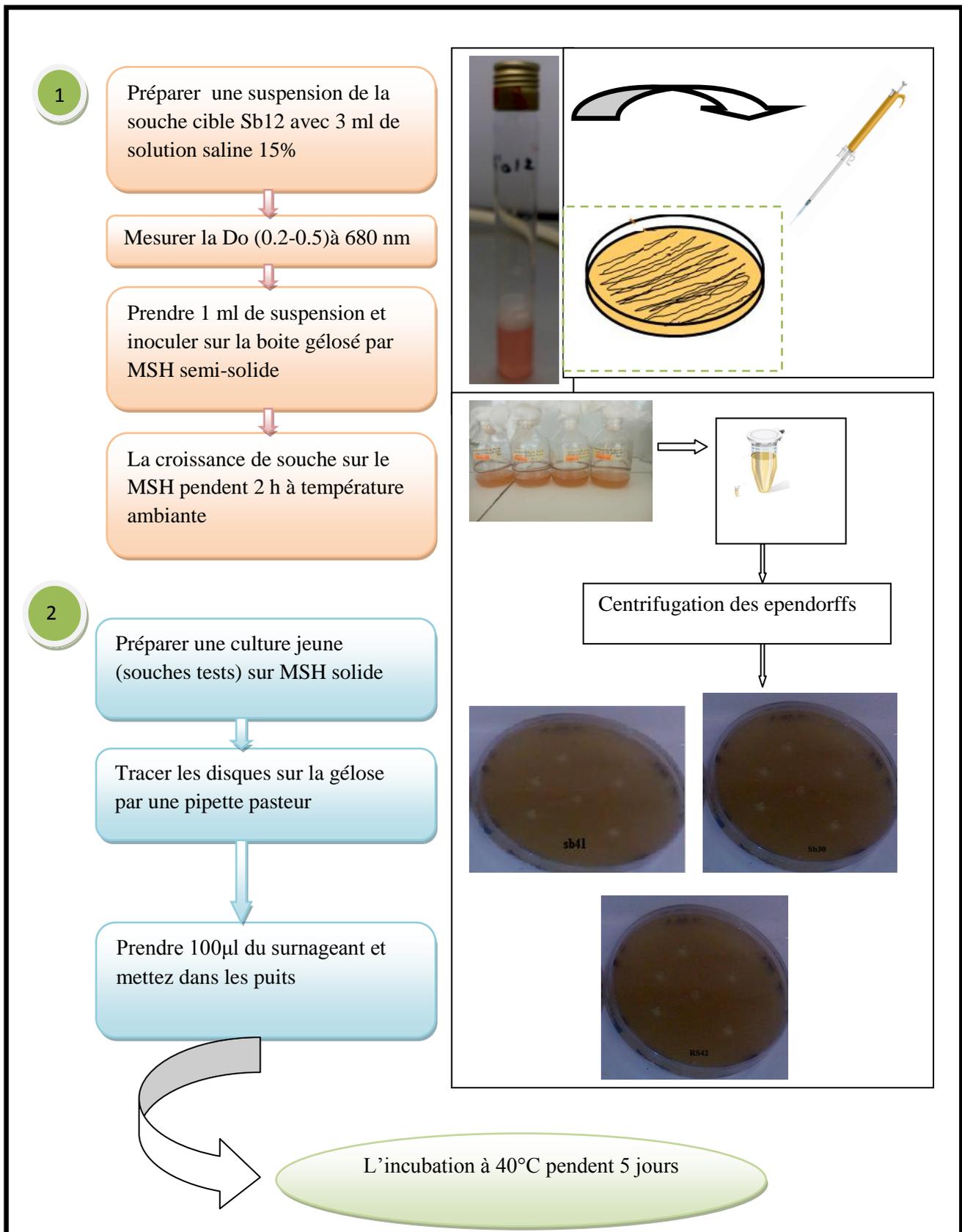


Figure N°05 : Méthode d'antibiogramme (technique des puits).

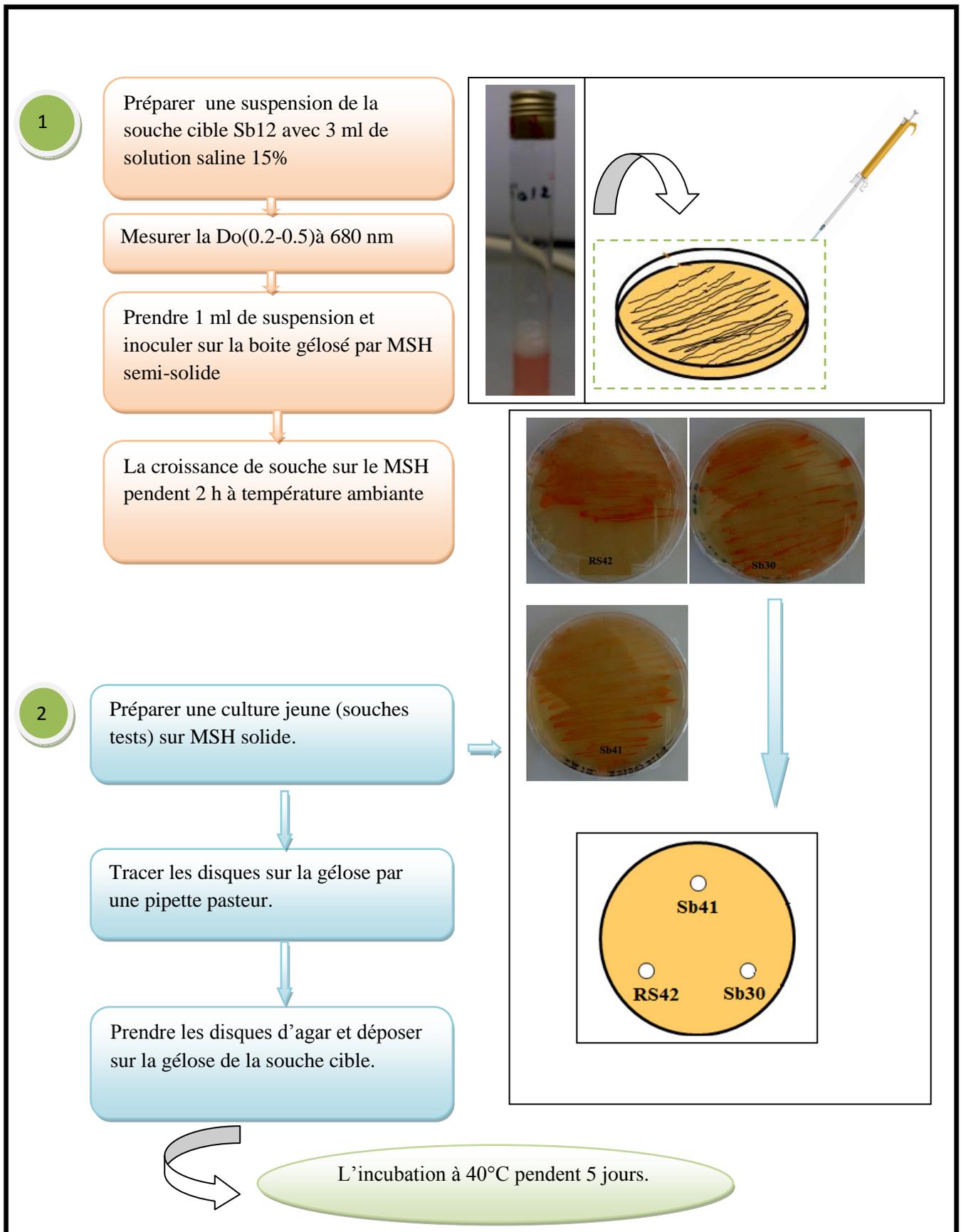


Figure N°06 : Méthode d'antibiogramme (technique de disque d'agar)

## **II.7. Production d'agent anti-archéenne 'Halocine'**

### **II.7.1. Comparaison de la production des substances inhibitrice en milieu liquide et en milieu solide**

A partir de testé l'activité de production d'agent antibactérien sur les deux milieux, on sélection la culture liquide pour la production, a cause d'obtenir un grand volume de suspension bactérien qui passé a la suite pour la production d'halocine .

### **II.7.2. Culture sur milieu liquide**

Après sélectionner la souche la plus active de production de substance inhibitrice. On prépare un volume de 500ml culture liquide inoculées par Sb41divéser sur des flacons de 500 ml à condition chaque flacon contient 1/5 de culture liquide totale et il faut garder la Do initiale =0.028 nm ,les flacons ont ensuite met dans un incubateur sous agitation à40°C avec une vitesse de 150 tour/min pendant 5 jours jusqu'à où la colure de milieu est change fait la centrifugation à 9000rpm pendant 30 min à +4°C ,afin de séparer le culot et le surnageant ; le culot est lysé par l'ajoute d'eau désilée stérile(la lyse cellulaire) et conservé à -20°C par contre le surnageant est conserver à 4°C a raison de testé les deux fractions par suite contre la souche cible Sb12, nous avons avoir dans le protocole détaillé dans la **FigureN°07**.

## **II.8. Caractérisation préliminaire de l'activité antagoniste**

Après la production d'halocine à partir la souche Sb41.nous appliquons des tests tel que le (pH, température, la salinité ...), afin de caractérisé notre archéocine.

### **II.8.1. Localisation de l'activité d'halocine**

A travers les deux fractions, nous voulons de rechercher à la fois dans le culot et le surnageant où l'activité d'halocine est localisé .pour avoir cette activité si extra ou intracellulaire. On utilise le surnageant qui déjà obtenir par la centrifugation et testé contre une souche cible inoculé sur un MSH semi-solide par prendre un volume de 100 µl de surnageant et remplé le puits .Le témoin dans se cas est MSH liquide stérile sans inoculum.

Puisque le culot sous forme des cellules bactériennes, fait la lyse cellulaire par l'ajoute un volume de12 ml d'eau distillée et conservé à -20°C pendent 24 h .le lysat ensuite met dans un bain-marie à 92 °C pendent 30 min jusqu'a devient liquide (choc thermique), après centrifugation à 9000 tour/min à 4°C pendent 30min récupéré le100µl de surnageant pour le test d'activité contre la souche cible.

### **II.8.2. Concentration de l'activité halocine**

Un volume de 150 ml de surnageant, à été précipité (jusqu'à la saturation) par 40 g de sulfate d'ammonium. Ensuite fait la centrifugation à 9000 tour/min à 4° C pendant 30 min .Testé les deux fractions (surnageant, précipitât) contre la souche cible.

### **II.8.3. Effet de sel sur l'activité d' halocine (Test de salinité)**

#### **II.8.3.1 Effet de concentration de sel sur l'activité**

Pour déterminer l'effet de sel sur l'activité. Il faut éliminer le sel par la dialyse. En effet deux membranes de dialyse de cut-off 3et14KDa on été utilisées. La dialyse a été faite contre l'eau distillée à 4°C pendant 48H afin d'éliminer tout le sel dissout. Les dialysats sont ensuite répartie dans des tubes Eppendorff (on verse un volume de 500µl de dialysa) et du NaCl a été additionné et agités tous doucement pour avoir les concentrations molaires suivantes : 0M ,0.5M, 1M, 1.5M, 2M, 2.5M, 3M, 3.5M, 4M, 4.5M, 5M.

L'activité a été recherchée selon la méthode des puits de diffusion sur gélose MSH. La concentration optimale du NaCl correspond à l'halo d'inhibition le plus élevée.

**Remarque : il est important de vérifier la membrane de dialyse pour évité la perte de surnageant et il faut changer l'eau 2à3 fois dans chaque jour.**

#### **II.8.3.2 Cinétique de dialyse**

Ce test à été effectué a pour déterminé est ce que l'activité d'halocine est liée avec le sel ou non .a cause de sa nous allons suivons l'activité d'halocine avec le temps de dialyse par :

Préparer la membrane de dialyse (12cm), puis il est immergée dans l'eau distillée pendant 30 min, ce qui a pour remplié avec 8 ml de surnageant .Des prélèvements stérilement sont effectuées par prendre 500µl de ce dernier après : 5 min, 10min ,20min, 30min ,60min et 90 min .Les eppendorfs ensuite sont utilisé pour testé contre la souche cible.

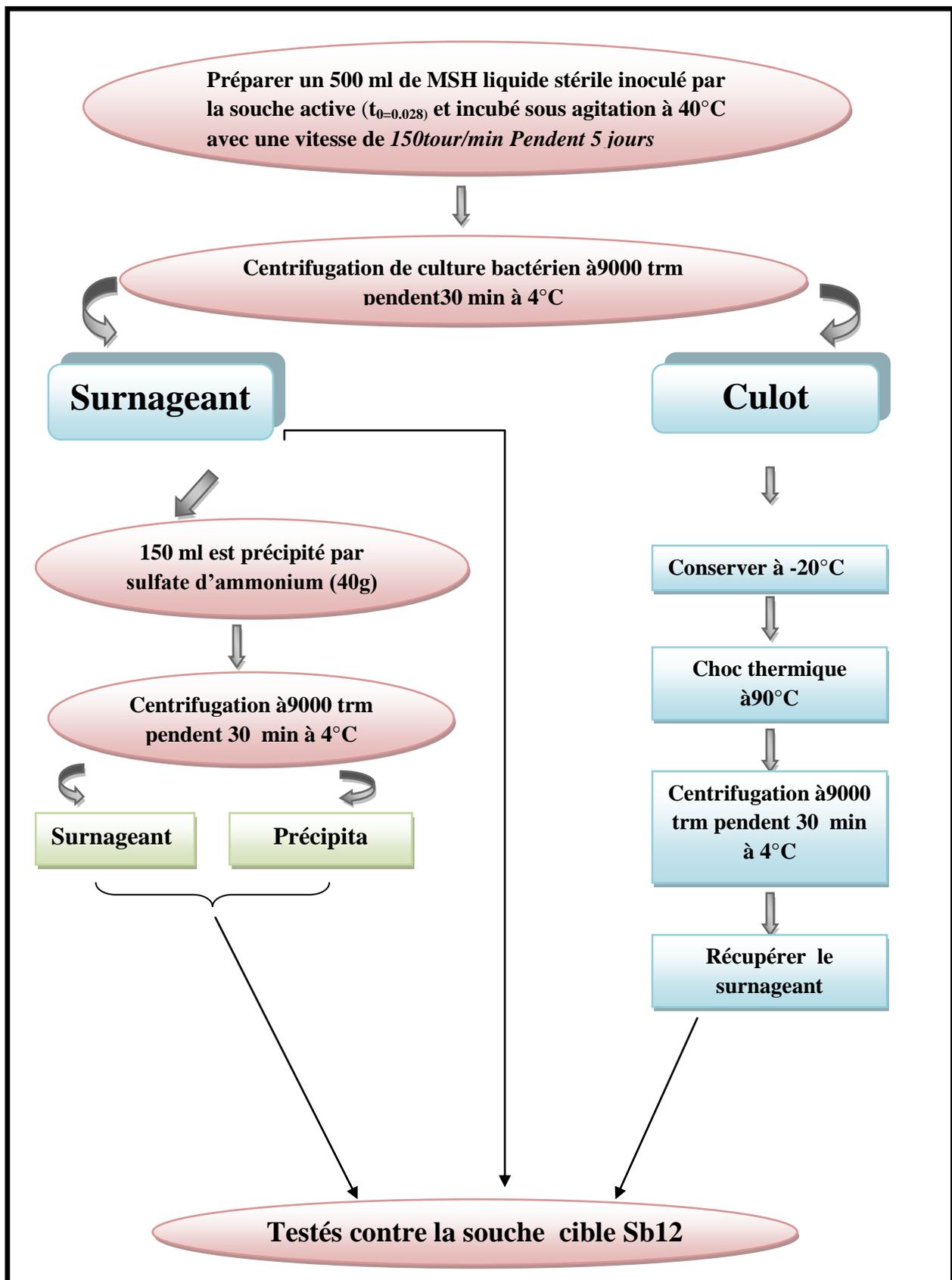


Figure N°07: Diagramme résume les étapes de la production d'halocine.

#### **II.8.4. Effet de température sur l'activité**

Une fois l'optimum de salinité a été déterminé, l'optimum de température a été recherché en utilisant une gamme de température allant de 20°C jusqu'à à ébullition à 100°C, ce test est effectué afin de détecter la stabilité d'halocine, grâce a traité un volume de 10ml surnageant active dans différents température. Le témoin positif correspond le surnageant non traité (c'est-à-dire le surnageant produit par la souche Sb41 à 40°C).

L'activité a été recherchée selon la méthode des puits des diffusions sur gélose. La température optimal correspond à l'halo d'inhibition le plus élevé.

#### **II. 8.5. Thermo-stabilité**

La thermo-stabilité d'une molécule est un critère important pour sa production à l'échelle industrielle. Pour cela nous avons étudié la thermo-stabilité de l'halocine en incubant à la température pour la quelle l'halocine a perdu la moitié de son activité résiduaire et ceci pendant des intervalles de temps allant de 10 jusqu'à 200minutes. L'activité est mesurée par la méthode des puits de diffusion pour être exprimée en pourcentage de l'activité résiduelle.

#### **II.8.6. Effet de pH sur l'activité**

La stabilité de l'activité inhibitrice est testé dans différents PH à savoir ; un volume de 10 ml de surnageant actif dans des tubes coniques ont été ajusté par des solutions NaOH 1N et HCL 1N à PH 1 jusqu'à PH 14 et on parallèle préparé des tubes coniques qui contient l'eau distillé qui ajusté dans différent PH, a pour de confirmer les résultats obtenu. L'activité a été mesurée par la méthode des puits. L'optimum du pH correspond à l'halo d'inhibition le plus élevé.

#### **II.8.7. Traitement d'activité par la chaleur**

Le bute principale de ce test à pour déterminer la nature de l'activité inhibitrice est ce que protéique ou non. En prenant un tube à essai qui contient 3 ml de surnageant actif, ce dernier est par la chaleur (sur Bec -benzène) pendant 6 min jusqu'à l'ébullition, la nature de l'activité inhibitrice est détecter par prendre 100µl de surnageant traité ensuite testé contre automatiquement la souche cible. Le témoin est le surnageant actif.

### **II.8.8. Analyse par infrarouge de l'halocine**

La technique de la spectroscopie d'absorption d'infrarouge permet de déceler la nature des groupements moléculaires qui différencient une halocine par rapport à une autre, et permet de clarifier sa structure.

Les spectres obtenus pour le surnageant produits par les souches Sb41 regroupé dans la Figure N°31. La composition moléculaire d'halocine analysée par IR a révélé la présence de plusieurs bandes attribuées à différents groupes fonctionnels. A l'aide d'une micropipette prendre une goutte de surnageant produit par la souche Sb41 et met dans l'appareil de l'IR et cliquer sur l'appareil pour l'obtention de spectre d'IR de notre produit, après un moment l'appareil donne un spectre pour notre produit et donne aussi un autre spectre qui représente le produit le plus proche de notre produit, qui sera analysée par l'appareil infrarouge de type (IR Affinity-1. SHIMADZU).

Les pics sont filtrés puis comparés à ceux de la base de données pour enfin caractériser les différents groupements fonctionnels.

### **II.8.9. Effet antibactérien de l'halocine**

Ce test a été effectué selon la méthode des puits de diffusion en utilisant les bactéries pathogènes cibles suivantes : (*Staphylococcus (aureus)*, *E. coli* et *P.aeroginosa*).

## **II.9.purification et conservation des souches**

### **II.9.1. purification des souches sur milieu liquide**

Préparez un volume de MSH liquide stérile qui contient l'ampicilline (100µl d'ampicilline dans 200ml de MSH liquide), dans un flacon de 250ml on met 50ml du MSH liquide + ampicilline et on ajoute des colonies bien isolées jusqu'à obtention d'une D.O. entre 0.2 et 0.5 (sur une longueur d'onde de 680nm) puis on l'incube les flacons dans un incubateur/agitateur à 40 °C pendant 5jrs; jusqu'à changement de la couleur du liquide (rose, orange, ...), puis on procède à la centrifugation de contenant des flacons à 9000tour/min pendant 30min pour séparées le surnageant et le culot (les cellules).

Dans des tubes conique stériles bien étiquetés met notre cellules (couleur orange foncée) et ajouté 2 ml de milieu (surnageant) et 0.7 ml de glycérol agité préalablement et laissez pendant un heur après met les tubes dans le réfrigérateur à -20°C (**Figure N°9**).

### **II.9.2. La purification des souches sur milieu solide**

Sur un milieu gélosé solide qui déjà contient l'ampicilline (pour inhibiez toute activité que notre souches) on aensemencées notre souches et incubée à 40°C pendant 6 jours ; après l'apparition des colonies on fait le repiquage des souches sur d'autres boites gélosées et incubée aussi à 40°C jusqu'à l'apparition des colonies bien isolées.

La conservation des souches dans les tubes inclinées se fait par prendre des colonies à l'aide d'une anse stérile et met des stries sur la gélose des tubes à vice. (N'oublie pas d'ouvrir les tubes un ¼ de tour) et incubés dans l'étuve à 40°C pendant 6 jours où l'apparition des colonies dans les tubes inclinées .et on conservées à 4 °C pour les autres études de recherches, le protocole de purification et conservation des souches est détaillé dans la **Figure N°8**.

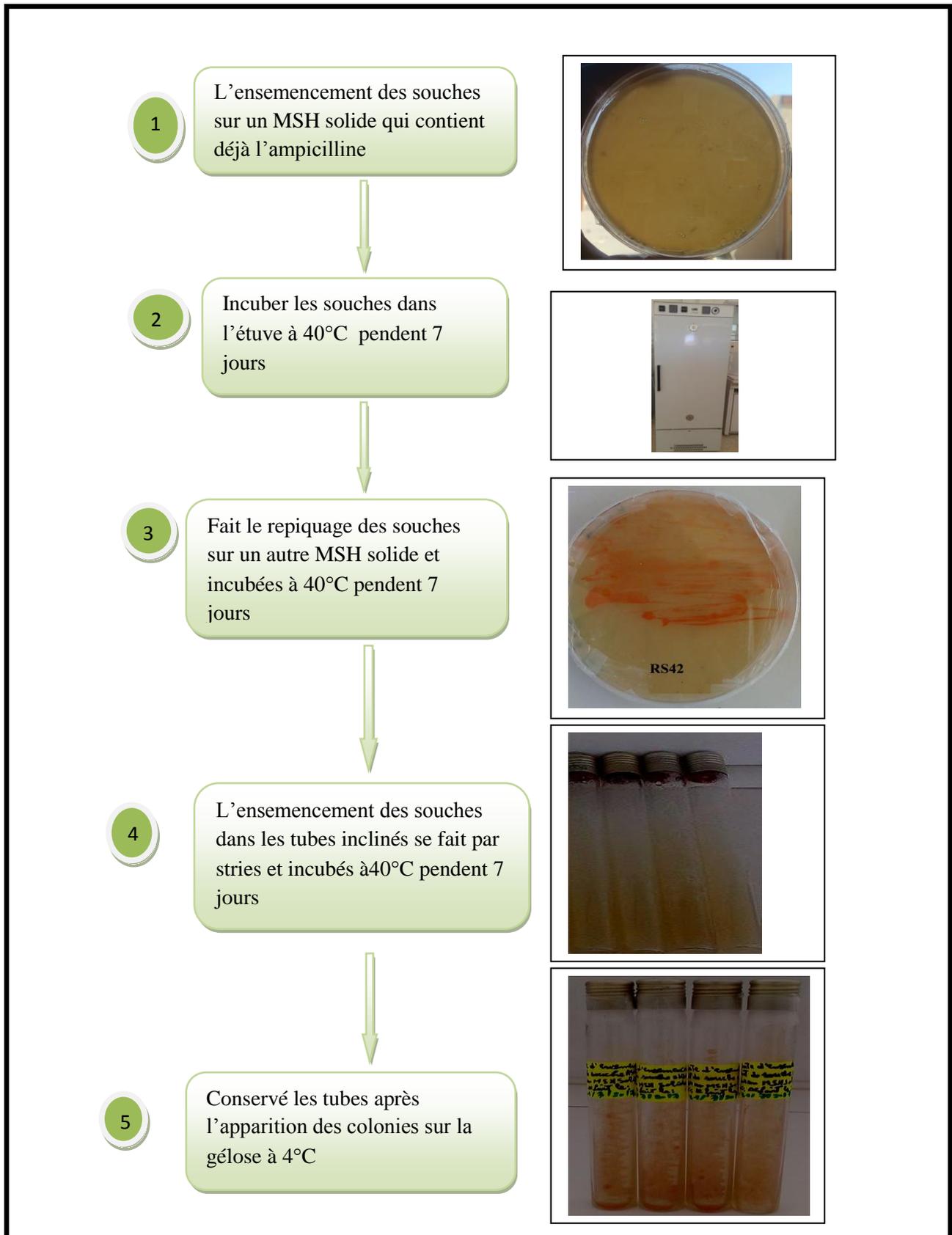


Figure N°08 : La purification et la conservation sur MSH solide

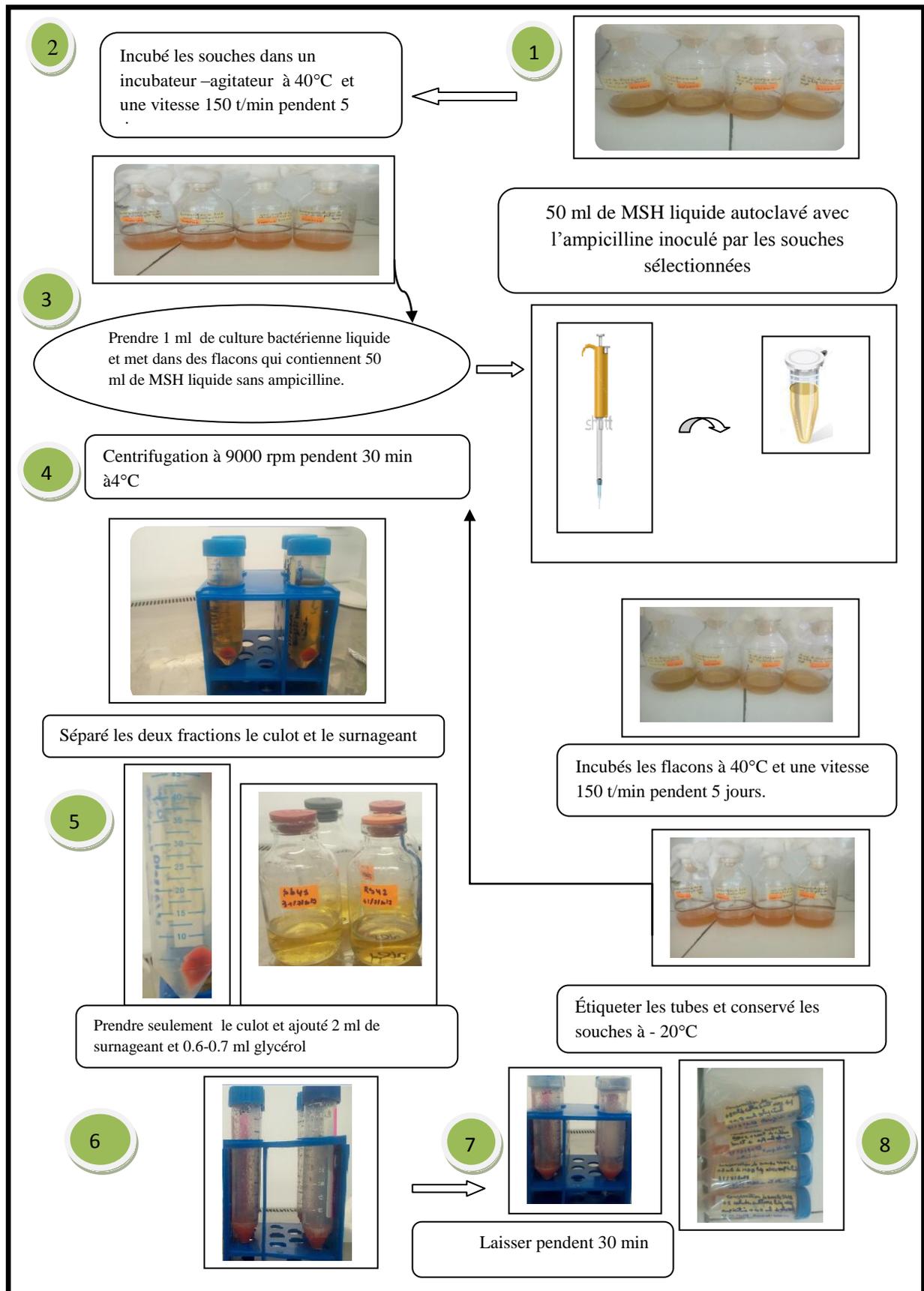


Figure N°09 : La purification et la conservation sur MSH liquide

### 1. Revivification des souches

Après 7 jours d'incubation, on a remarqué l'apparition des colonies, après 21 jours, les souches sont apparues sur la totalité des boîtes.

La croissance des souches signifie que le milieu MSH est un milieu qui rassemble beaucoup les milieux des halophiles, car il contient les constituants nécessaires pour la croissance bactériennes, comme NaCl, MgSO<sub>4</sub>, KCl (Hacène *et al*, 2004) et la température d'incubation 40°C sont très appropriés pour la croissance des souches halophiles. (**Figure N°10**).

### 2. Conservation des souches

Selon la **Figure N°11**, on remarque l'apparition des colonies dans les tubes inclinés, ce qui indique les conditions d'incubation sont parfaites pour garder les souches et dans le réfrigérateur pour servir à la suite du travail.

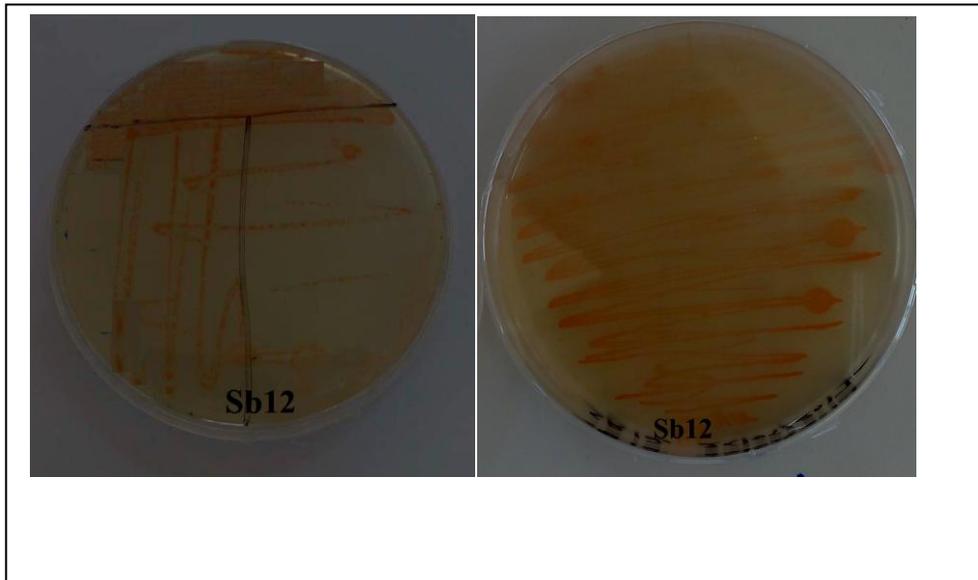
### 3. Caractères morphologiques

#### **3.1.étude macroscopique**

Les résultats de l'examen macroscopique des souches sélectionnées à partir de la rocher de sel et sebkha de Zahrez El Chegui sont résumés dans le tableau N°02.

**Tableau N°03:** Résultats de l'aspect macroscopique des souches.

Aspect des colonies						
Souche	Forme	contour	couleur	consistance	surface	
<b>Sb12</b>	Cocci	Régulier	Orange	Muqueuse	Lisse	et brillant
<b>Sb41</b>	Cocci	Régulier	Orange	Muqueuse	Lisse	et brillant
<b>Sb30</b>	Cocci	Régulier	Orange	Muqueuse	Lisse	et brillant
<b>RS42</b>	Cocci	Régulier	Orange	Muqueuse	Lisse	et brillant



**A**

**B**

**Figure N°10** :A. La revivification de la souche Sb12 par la méthode de trois quadrants **B.** le repiquage de la souche Sb12 sur le MSH solide.



**Figure N°11** : Conservation des souches dans les tubes inclinés par MSH solide.

### 3.2.étude microscopique

L'observation des souches à l'état frais à l'aide microscope photonique à grossissement 100x, indique que les cellules des souches Sb14, Sb30, Sb12 et RS42 sous forme cocci et elles sont immobiles (**Figure N°12**).

La coloration de Gram modifiée à été faite pour mettre en évidence la nature de la paroi cellulaire, qui est un critère important pour la taxonomie des bactéries. Après la coloration, les souches sont apparait en coulure rose ; ce qui indique la paroi est composée de moins de peptidoglycane, ainsi les cellules immobiles, sous forme cocci isolée, en paire et en chaînette. Alors les résultats montrent que toutes les cellules étaient colorées en rose indiquant qu'elles sont Gram négatifs (**Figure N°12.A**).

Pour confirmer les résultats de la coloration de Gram, les cellules ont été traitées par KOH (Gram par KOH). Cette méthode est rapide et permet de distinguer entre bactéries Gram négatif et positif. (**Figure N°12.B**).

Les résultats ont montrés la formation d'un filament visqueuse entre la pipette pasteur et la lame et ceci pour toutes les souches indiquant ainsi qu'elles sont Gram négatifs (Lucia, 2008 ; Abeb, 2017).

Ces résultats viennent conforter celui de la coloration de Gram. Il est admis que la plupart des *Achaea* halophiles ont une paroi de nature Gram négatifs (Oren *et al*, 1997). Ce qui indique que les isolats étudiées pourraient êtres classés dans le domaine des *Archaea* halophiles.

### 3.3. Tests d'antibiose

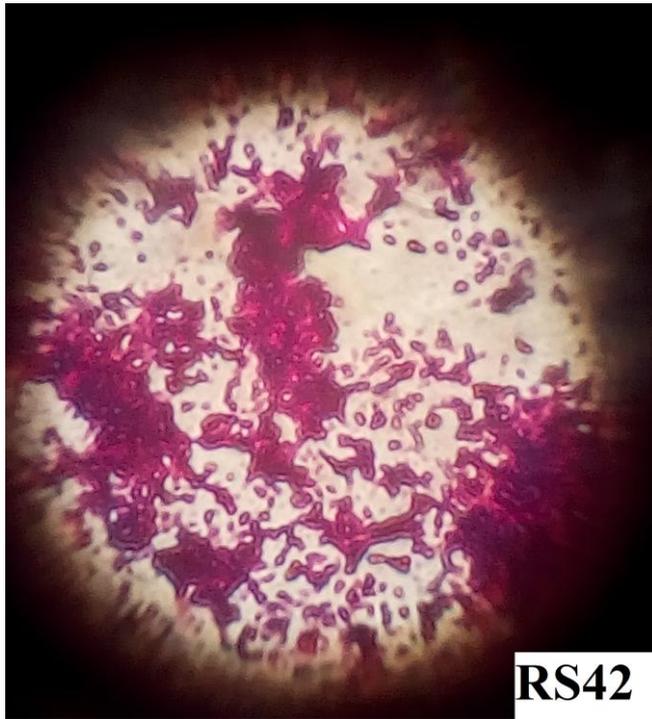
#### 3.3.1. En milieu liquide

Après l'incubation des souches étudiées dans un milieu MSH complet liquide avec l'ampicilline (100µl /200ml) à 40°C pendant 5 jours, nous avons remarqué :

\* un virage de la couleur du milieu de culture vers l'orange foncé indiquant une croissance de la souche test à la présence de l'Ampicilline.

\* La mesure de la densité optique à 680nm du 5<sup>ème</sup> jour d'incubation pour les quatre souches, montre que les souches sont développées car la Do est augment jusqu'à 2 nm.

Les résultats indiquent donc que les souches étudiées sont résistantes à l'Ampicilline, ce qui renforce l'hypothèse de leur classification parmi les *Archaea* halophiles. En effet la paroi des *Archaea* est dépourvue de muréine qui est la cible des antibiotiques de la famille des B-lactamines notamment l'Ampicilline. Ceci explique la résistance des *archaea* à l'ampicilline. (Bonelo *et al*, 1984).(**Figure N°13.A**)



A



B

**Figure N°12 :** A. Résultats d'observations microscopiques après la coloration de Gram (observation par microscope optique G×100 a immersion) B. Résultat de Gram KOH.

### 3.3.2. En milieu solide

Trois antibiotiques ont été testés sur milieu MSH semi solide en utilisant la méthode de diffusion sur gélose.

A partir ce test, on peut déterminer la sensibilité des archées à la bacitracine ,nous remarquons une zone d'inhibition entre 10 et 11mm autour des dépôts de disque de bacitracine pour toutes les souches (**Figure N°13.B**), une autre zone d'inhibition autour le disque de pinicilline de 11 mm et aucune zone d'inhibition pour les disques ampicilline et amoxiciline .

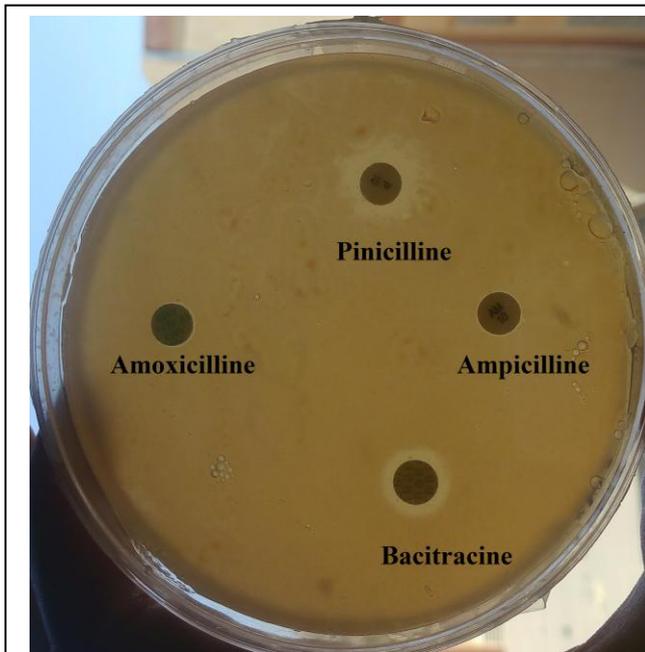
Les résultats montrent que toutes les souches sont résistantes à l'Ampicilline et à l'Amoxicilline traduits par l'absence d'halo d'inhibition autour des disques d'antibiotiques. Cependant pour la Bacitracine on note la présence des halos d'inhibition, indiquant que celles-ci sont sensibles à cet antibiotique (**Figure N°13.B**).lorsque la Bacitracine inhibe la formation des glycoprotéines de la paroi cellulaire (Oren, 2006b) ; car il est dû à une rupture de structure de la membrane résultant de l'interaction de la bacétracine avec la membrane fonctionnel et alors inhibe la formation des lipides à l'intérieur de la cellule (Haavik, 1976). Les résultats de l'antibiogramme sont en accord avec ceux trouvés pour les Archaea, suggérant encore une fois que les isolats pourraient êtres classés parmi les Archaea (Oren, 2006b) .

### 4. Cinétique de croissance

Les courbes de cinétique de croissance, est apparait dans la **Figure N°14**, Nous remarquons notre souches sont développées presque de même allure, la croissance bactérien est maximale au 4<sup>ème</sup> jour (phase exponentiel), au 5<sup>ème</sup> jour est ralentie à la fin de phase stationnaire, Le jour 6<sup>ème</sup> les bactéries sont entrent dans la phase décroissance.



A



B

Figure N°13 : A. Résultat de Test d'antibiose sur milieux liquide .B. Résultat de test d'antibiose sur milieux semi solide.

## **5. Activité antagoniste**

### **5.1. Sur milieu semi solide (disque d'agar)**

Pour déterminer l'activité antagoniste des souches tests contre la souche cible, nous avons utilisé la technique des disques d'agar. Les résultats de cette étude sont illustrés dans la **Figure N° 15**.

On note l'apparition d'une zone d'inhibition autour des disques d'agar, signifiant que les souches tests produisent une molécule inhibitrice qui est l'halocine.

Les deux souches tests RS42 et SB30 donnent presque la même activité avec un diamètre d'inhibition de 9 mm. Cependant la souche SB41, donne une activité plus importante avec un diamètre de 10.39 mm.

### **5.2. Sur milieu liquide (Test de puits)**

L'activité d'halocine a été recherchée en milieu liquide en utilisant de méthode des puits de diffusion sur gélose. Les résultats sont illustrés dans les **Figures N°16, 17, 18**.

La mesure des diamètres d'inhibition autour des puits a montré que le surnageant de culture de la SB41 présente un halo de 19.39 mm de diamètre, alors que pour les autres souches les diamètres étaient compris entre 6 et 18 mm.

Les résultats montrent que les trois souches testées contre les souches cibles Sb12 produisent cette substance inhibitrice, concernant la souche Sb41 est caractérisée par une activité importante. D'après les résultats d'antagonismes révélés sur milieux solides et liquide, il apparaît clairement que la souche SB 41 est la plus active de production en milieu liquide que milieu solide et par conséquent elle a été sélectionnée pour la production et la caractérisation partielle de son activité halocine.

Les zones d'inhibitions observées après les tests d'activité restent intactes, même après des jours d'incubation. Ces résultats s'expliqueraient, d'après Haseltine *et al*(2001) par l'effet inhibitrice exercé par le surnageant de culture des souches testées contre la souche cible Sb12. La caractérisation de l'agent antibactérien suggère que celui-ci soit une halocine (Bouktit *et al*, 2003).

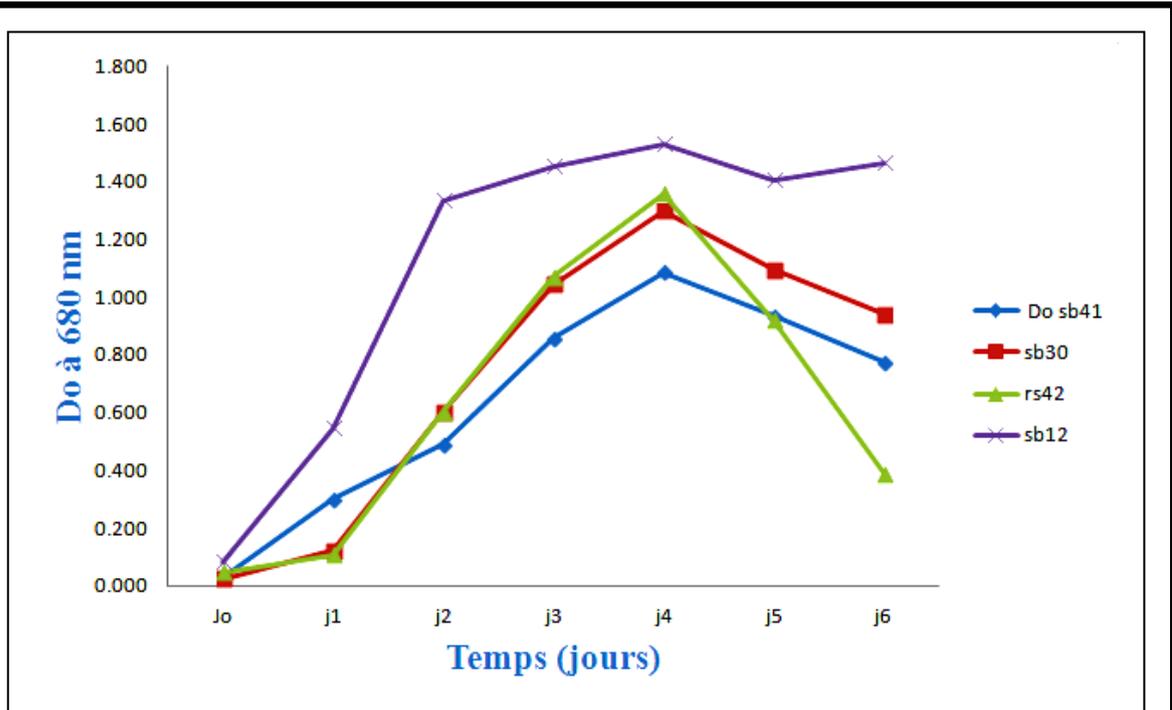


Figure N°14 : Cinétique de croissance pour les souches étudiées.

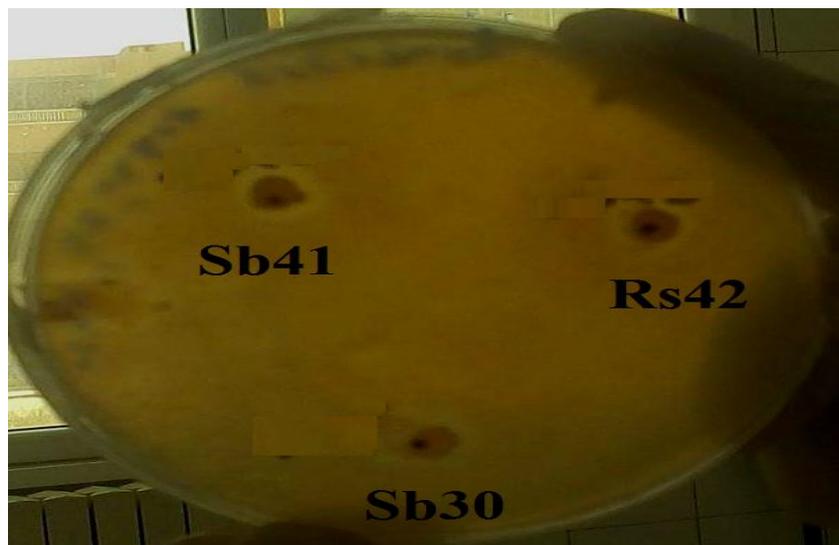
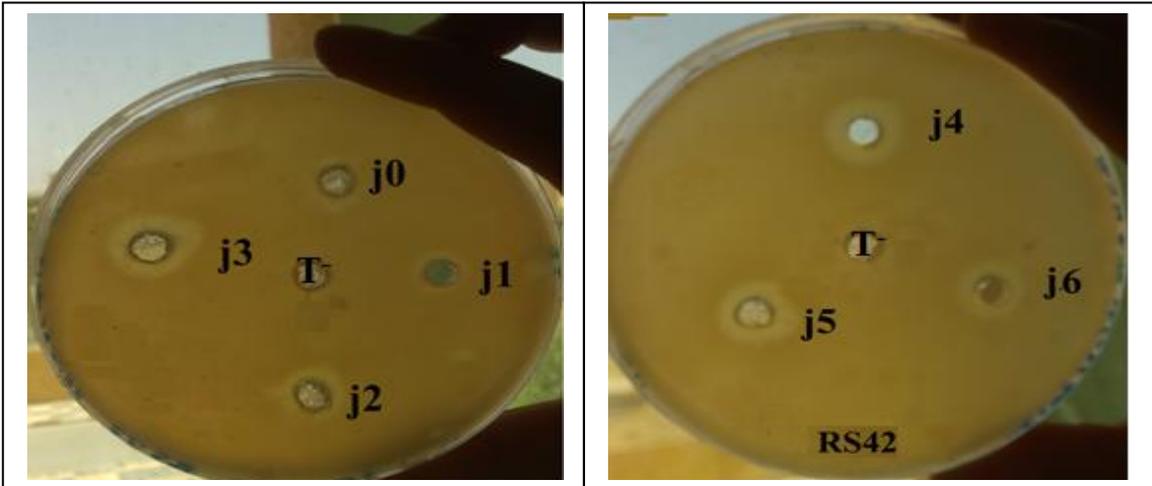
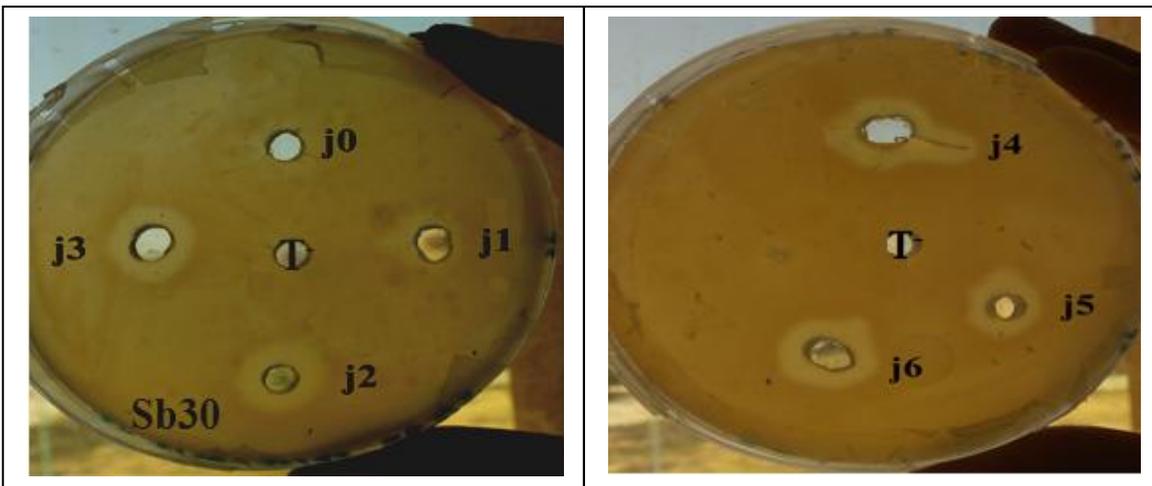


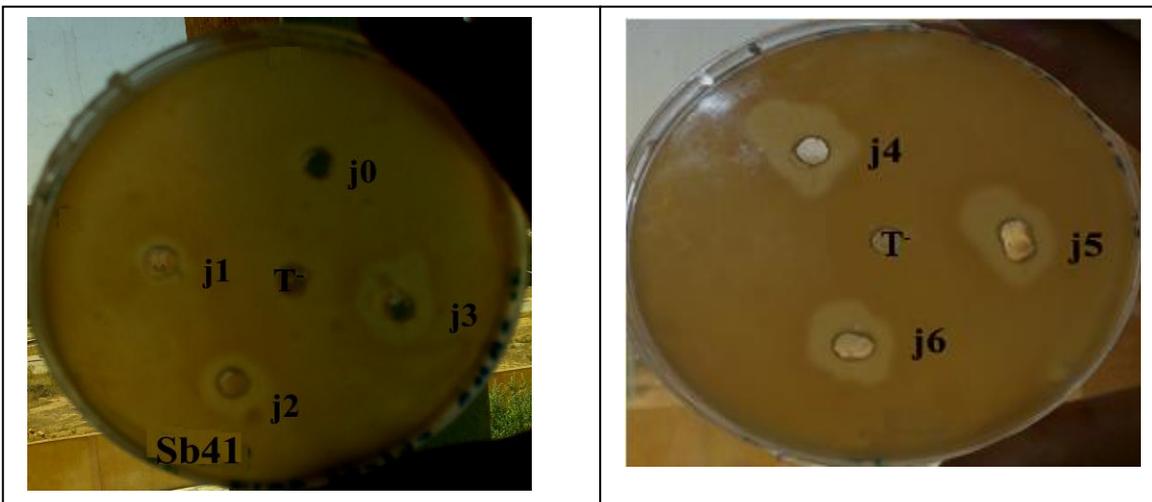
Figure N°15 : Résultat de l'activité (disque d'agar) sur milieu semi solide.



**Figure N°16:** Résultat de Test d'activité sur MSH liquide (test des puits) souche RS42.



**Figure N°17 :** Résultat de test d'activité sur milieu liquide (test des puits ) souche SB30.



**Figure N°18 :** Résultat de Test d'activité sur MSH liquide (test des puits) souche Sb41.

### **6. Cinétique de croissance et la production d'halocine**

Afin de déterminer la relation entre la production d'halocine et la cinétique de croissance, nous avons tracé une courbe qui rassemble les jours de production d'halocine sur milieu liquide avec la DO des souches étudiées. Nous avons choisis la production d'halocine sur milieu liquide pour l'obtention d'un grand volume pour faire nos tests préliminaires. L'activité a été estimée par la méthode des puits de diffusion sur gélose en mesurant le diamètre des halos d'inhibition autour des puits.

Les résultats sont illustrés dans les **Figures N°19, 20 et 21**.

Pour les souches SB30, RS42, l'activité halocine est produite en phase exponentielle. Elle commence dès les premières 24 heures avec un halo d'inhibition compris entre 6 et 10 mm pour atteindre son maximum le 4<sup>ème</sup> jour avec un diamètre d'inhibition de 14 à 18 mm. Dépassé le quatrième jour, la production de l'halocine commence à diminuer légèrement pour atteindre au 6<sup>ème</sup> jour un diamètre d'inhibition compris entre 10 et 15 mm.

Concernant la souche Sb41 est différent aux deux autres souches, car leur activité antagoniste est commencée au 1<sup>er</sup> jour et augmente jusqu'à atteindre leur maximum au 5<sup>ème</sup> jour. Après en voir une chute faible au 6<sup>ème</sup> jour. Des études similaires sur une halocine H1 ont été effectuées par certains auteurs et qui ont trouvé que l'activité est produite en phase exponentielle (Redriguez-Valera *et al*, 1982 ; Platas *et al*, 2002).

Ces résultats suggèrent que la molécule d'halocine est un métabolite primaire jouant un rôle important dans la croissance et la survie du microorganisme producteur.

On conclure : La production d'une substance inhibitrice par les souches étudiées est suivie de la cinétique de croissance, pour les trois souches l'activité débute à la phase de croissance ce qui indique que cette substance inhibitrice est un métabolite primaire.

### **7. Production d'agent anti-archéenne 'Halocine'**

La souche Sb41 a été sélectionnée pour cette étude en raison de sa forte activité comparée aux autres souches. La production de l'halocine a été effectuée sur milieu liquide avec un volume total de 300 ml. La **Figure N°22** mentionne :

\*Le changement de couleur de la culture après 5 jours d'incubation, signifie que la souche SB41 s'est développée dans ce milieu.\*La culture âgée de 5 jours a été centrifugée et les deux fractions (culot et surnageant) ont été testées contre la souche cible (Mecnaci, 2015).

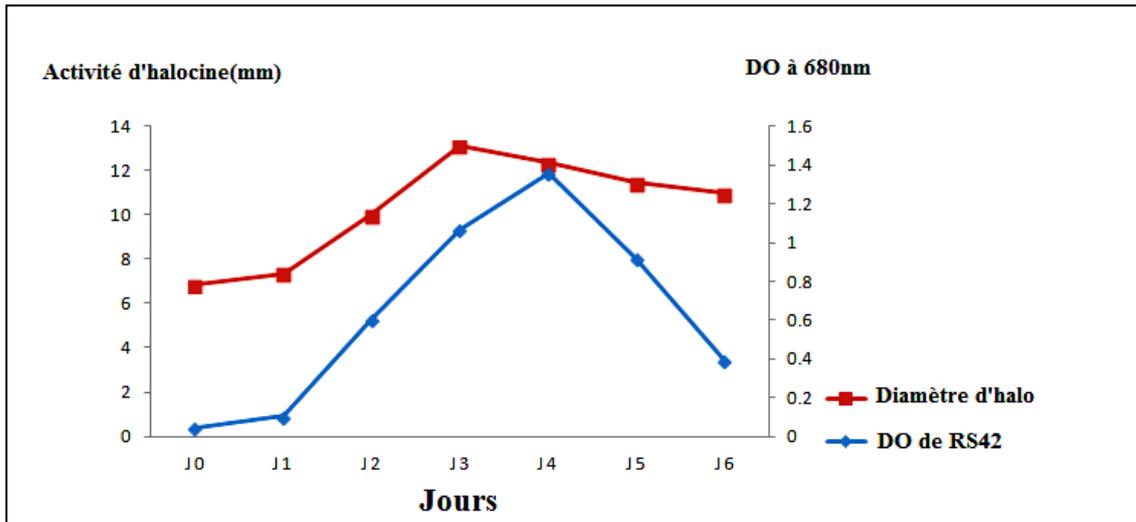


Figure N°19 : Cinétique de croissance et de production de composé actif par la souche RS42.

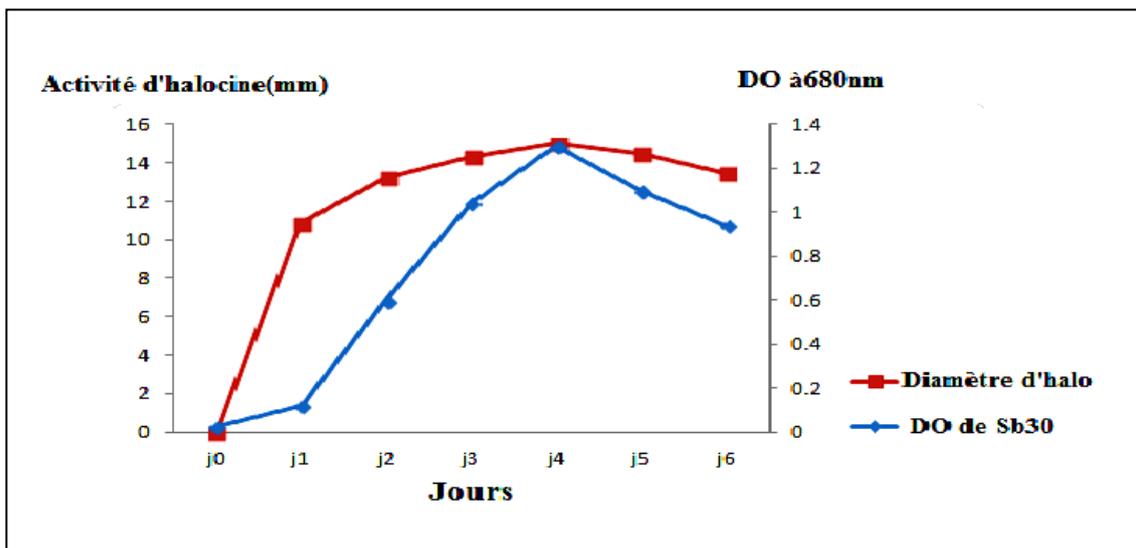


Figure N°20 : Cinétique de croissance et de production de composé actif par la souche Sb30.

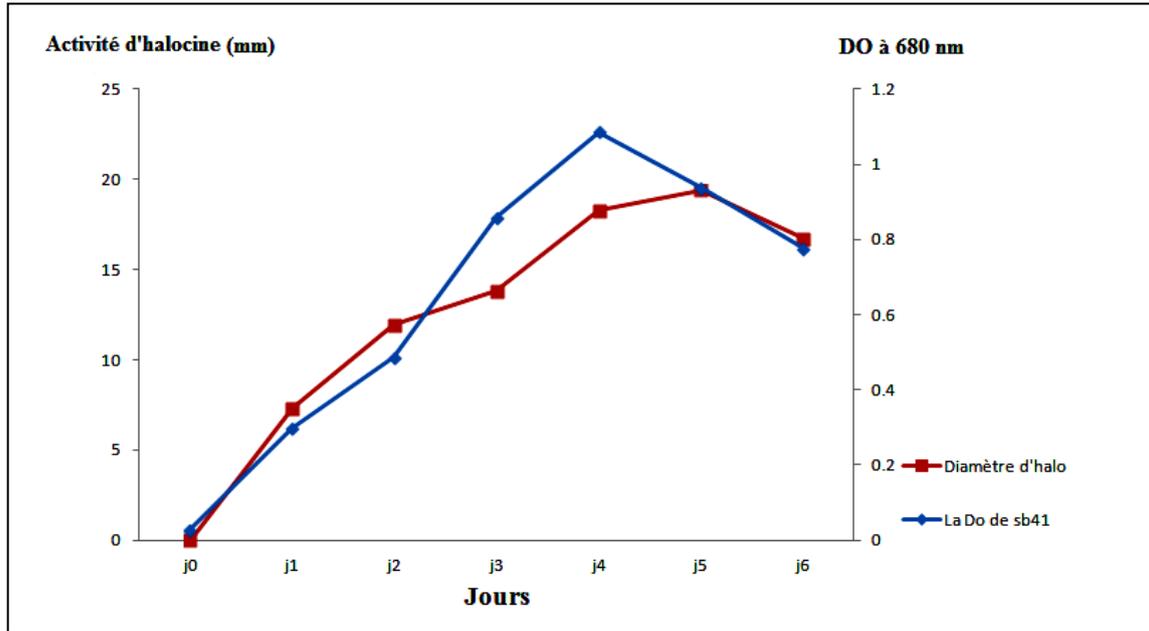


Figure N°21 : Cinétique de croissance et de production de composé actif par la souche Sb41.

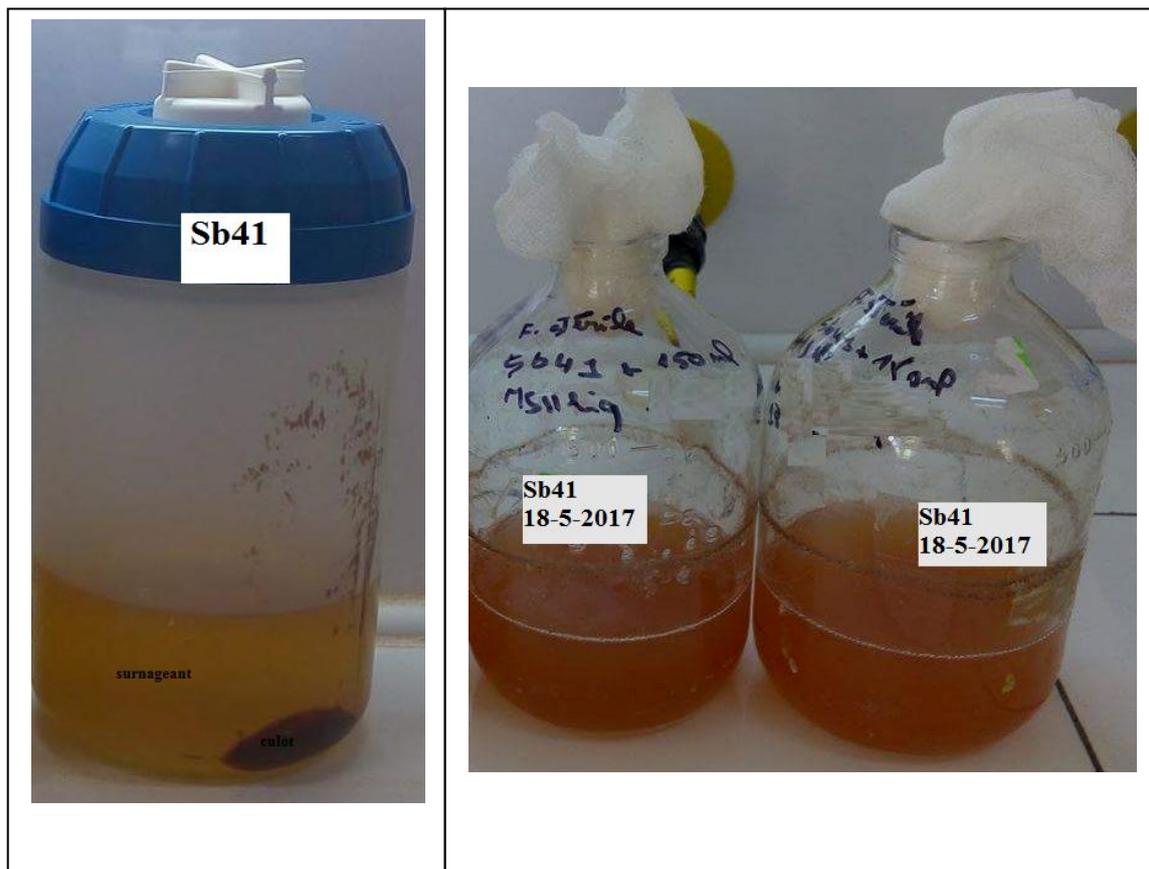


Figure N°22 : Résultat de production d'agent anti-archéenne par la souche Sb41.

## **8. Caractérisation préliminaire de l'activité antagoniste**

### **8.1. Localisation de l'activité d'halocine**

La **Figure N°23** Présente :

L'activité halocine produite par la souche SB 41 a été recherchée dans le surnageant et le culot cellulaire.

L'absence d'une zone d'inhibition dans le témoin MSH liquide. Cependant la zone d'inhibition remarquer autour de puits de surnageant ; signifier que l'activité antagoniste est contenant dans le surnageant.

L'apparition d'une zone d'inhibition de 10.36mm dans le puits de surnageant et l'absence complètement d'une activité dans le puits de culot, indique que l'activité antagoniste est localisé uniquement dans le surnageant, c'est-à-dire extracellulaire. Lorsque les halocines sont habituellement produites dans le surnageant de culture au début de la transition vers la phase stationnaire de croissance (Shand et O'Connor, 2002 ; Sun *et al*, 2005).

Ce résultat est comparable à celui trouvé par de O'Connor et Shand (2002). Qui suggèrent que les archeocines produits par les halobactéries sont localisées dans le surnageant (Shand et O'Connor, 2002 ; Sun *et al*, 2005).

### **8.2. Concentration de l'activité d'halocine**

Dans le but de concentrer l'activité halocine nous avons précipité la molécule par le sulfate d'ammonium jusqu'à saturation. Le résultat de ce test est illustré dans la **Figure N° 24**.

L'activité halocine est partagée entre les deux fractions avec un diamètre d'inhibition de 15,68 mm dans le précipitât et de 12,91mm dans le surnageant.

Ce résultat indique que malgré la saturation du milieu, la molécule d'halocine n'a que partiellement précipité suggérant que la molécule est très soluble. Ce caractère a été reporté pour les protéines des halophiles qui semblent défier les lois conventionnelle de la biochimie, présentent une grand solubilité dans les milieux saturée en raison de leur composition riche en acide aminé acides.

En plus de la grande solubilité de la molécule, il est à supposer aussi que cette molécule soit de poids moléculaire faible et fort probable de nature peptidique. Cette hypothèse est réconfortée par le nombre important d'halocines de nature peptidique (a un très faible poids moléculaire).

### 8.3. Effet de sel sur l'activité d' halocine (Test de salinité)

#### 8.3.1. Effet de concentration de sel sur l'activité d'halocine

Dans le but d'éliminer le sel contenu dans le surnageant, nous avons procédé à une dialyse contre l'eau distillée à 4°C pendant 48H en utilisant une membrane de cut-off 3 KDa, afin de chercher un critère physiologiques de classification des halobactéries( l'optimum de concentration de sel).

Les résultats de ce test sont illustrés dans les **Figures N° 25 et 26**.

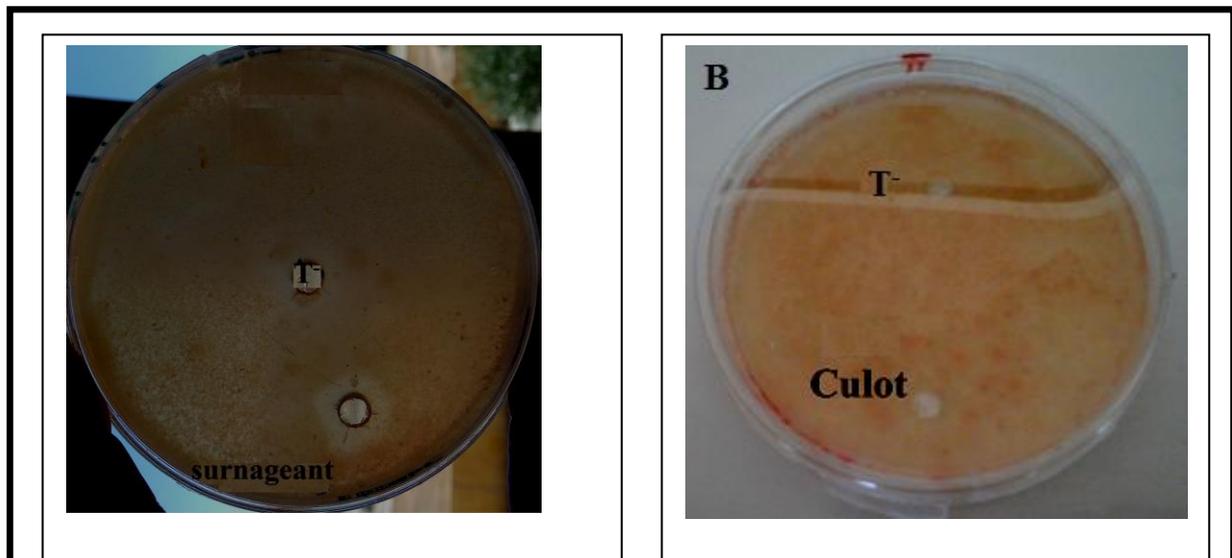
La couleur jaune de surnageant dans la membrane de dialyse est changer en couleur transparent après 48 H de dialyse, indique que notre surnageant est pauvre de sel.

Aucune activité halocine n'a été détectée en absence du NaCl (0M de NaCl). Cependant l'activité réapparaît à 1M de NaCl avec un halo d'inhibition d'environ 5.98mm et ne cesse d'augmenter avec la concentration du NaCl pour atteindre son maximum à 3M de NaCl avec un diamètre d'inhibition de 12.54mm. Au-delà de la concentration 3M de NaCl, l'activité a commencé à chuter pour atteindre 8mm à 5M de NaCl.

Ces résultats montrent clairement le caractère halophile de l'activité halocine et qu'elle est NaCl dépendante du faite qu'elle s'annule en son absence. La réapparition de l'activité qu'on ajoute le sel que la dénaturation de la molécule est réversible.

De plus .Nos résultats sont comparables à ceux trouvés par Haseltine et *al* (2001) qui rapportent que l'ajout du chlorure de potassium (KCl) avec une concentration précise dans les dialysats, renforce l'activité, ce qui signifie que notre halocine utilise un mécanisme sel-dépendant.

L'étude de l'effet du NaCl sur l'activité halocine nous laisse suggérer que cette activité est de nature protéique et plus précisément peptidique et qu'elle exige le sel pour son activité et donc pour sa structure tridimensionnelle fonctionnelle du faite qu'elle se dénature et perd toute son activité en absence du NaCl. Cette dénaturation est réversible et l'halocine redevient active en présence du NaCl. Plusieurs auteurs ont rapporté le caractère halophile et NaCl dépendant de certaines halocines produites par des archaea halophiles (Madigan *et al*, 2013 ; Meknaci, 2015)



**Figure N°23** : Localisation de l'activité inhibitrice si intra ou extracellulaire. **A** : Surnageant **B** : Culot.



**Figure N°24** : Résultat de précipitation du surnageant par la sulfate d'ammonium.

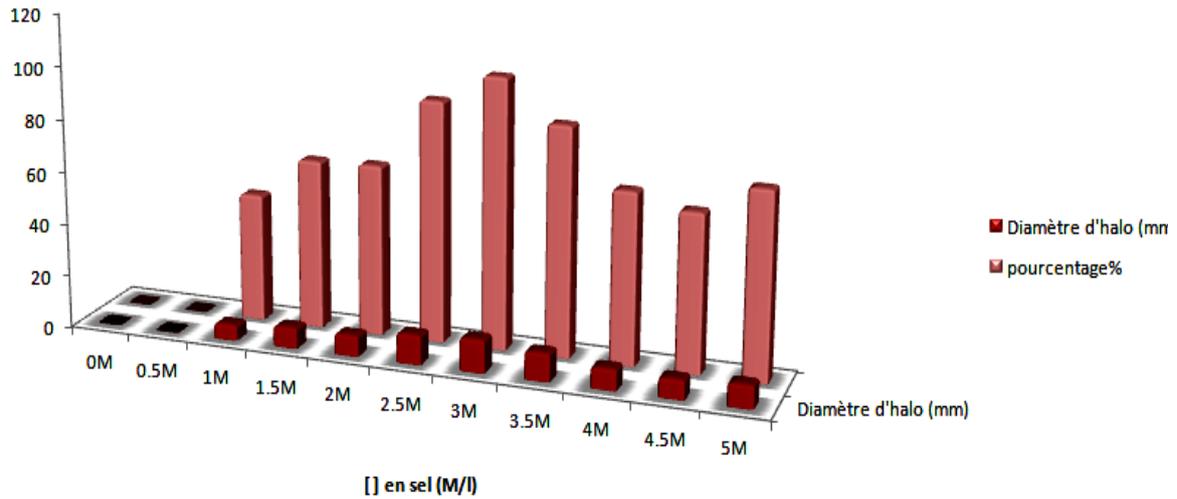


Figure N°25 : Résultat de l'effet de concentration de sel sur l'activité anti-archéenne.

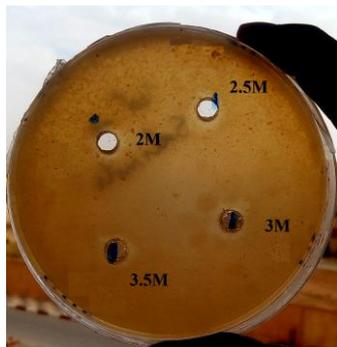


Figure N°26 : A. Surnageant avant la dialyse .B. surnageant après la dialyse.

### 8.3.2. Cinétique de dialyse

Le résultat de ce test illustré dans la **Figure N°27**.

L'apparition d'une activité inhibitrice de 10.36mm à 0 min, c'est-à-dire avant la dialyse, au cours du temps l'activité est diminuée.

On peut conclure que notre halocine est dépendant de sel .car l'activité est maximale avant la dialyse, mais à la diminution de sel l'activité est diminuée. Ce qui montre que notre souche étudiée rattacher au groupes des halobactéries, car la cellule de ce groupe exige les ions de  $\text{Na}^{+2}$  pour le maintien de l'intégrité pariétale (Madigan *et al*, 2013).

### 8.4. Effet de température sur l'activité d'halocine

La **Figure N°28** présente le résultat du traitement du surnageant par la température.

L'allure de la courbe est cloche caractéristique. On note une absence de l'activité anti-archéenne à 20°C, mais à 30°C, l'activité est de diamètre de 9 mm. L'activité est maximale à 40°C avec un halo d'inhibition d'environ 14 mm. L'activité persiste à 80°C avec un halo de 7 mm puis s'annule à 90°C.

On peut dire que la production de substance inhibitrice par la souche Sb41 est maximale à 40 °C, ce qui montre que cette température est la plus favorable pour l'activité .Donc notre halocine est thermostable, car l'activité est présente dans l'intervalle de température compris entre 30°C et 80°C.

Selon Montalvo –Rodriguez *et al*, 2000 ; la plupart des molécules produites par les *Archaeas* de la famille des *Halobacteriaceae* sont thermo- tolérantes.

### 8.5. Thermo-stabilité

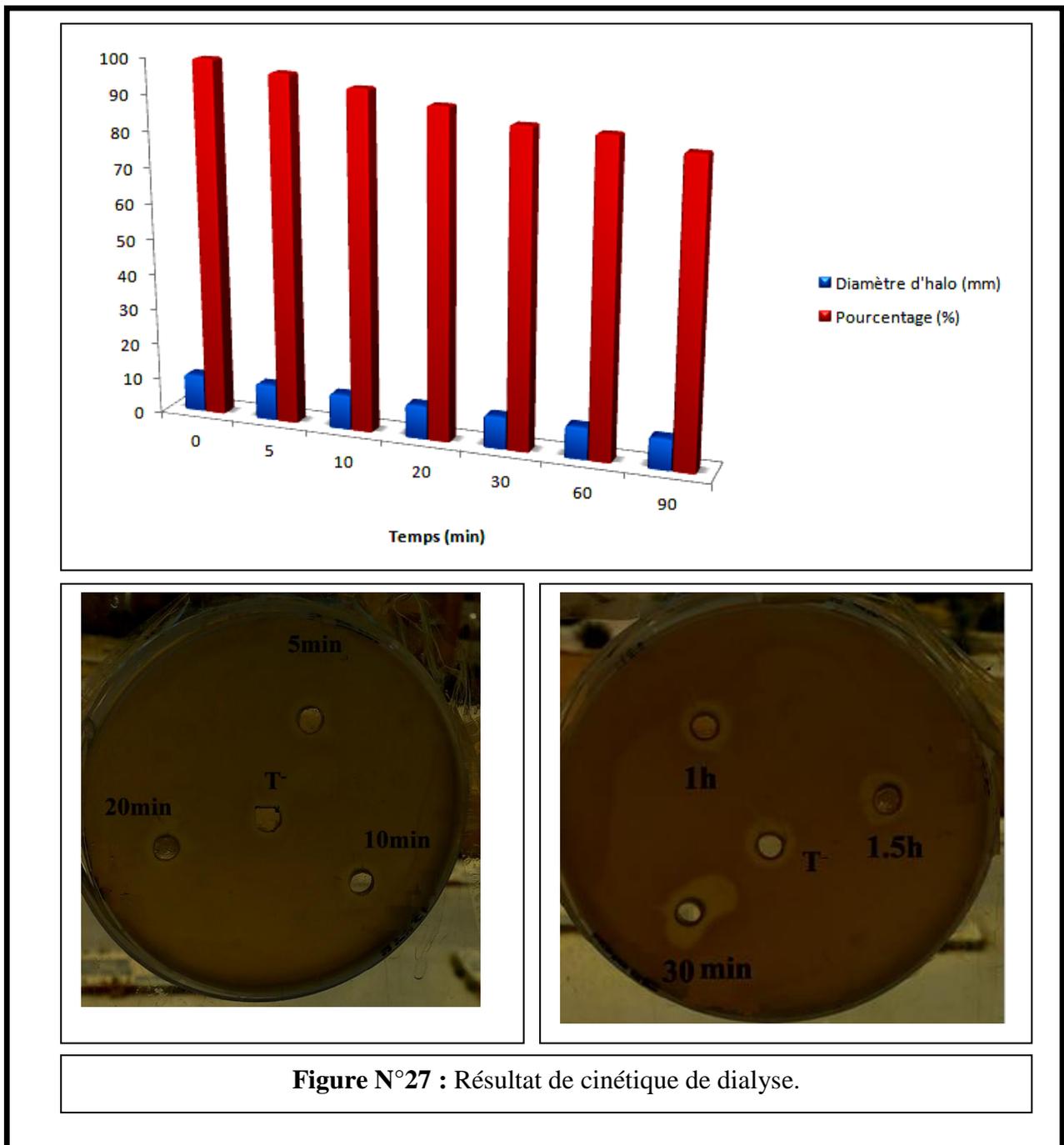
Nous avons testé la stabilité de notre halocine aux températures 70°C et 80°C ; les résultats sont illustrés dans les **Figure N°29**.

\*à 70 °C, nous remarquons :

L'activité halocine est maintenue maximale durant 140 minutes avec un halo d'inhibition d'environ 12.5. A la 150<sup>ème</sup> minute l'activité s'annule brutalement laissant supposer que l'activité est moyennement stable aux températures dépassant les 70°C. Ce résultat est confirmé par l'étude de la thermolabilité de notre halocine à 80°C, nous remarquons : L'activité d'halocine est maximal au témoin avec une zone d'inhibition de 10.98mm, c'est –à –dire, les

surnageant sans traitement à 80°C. En effet l'activité chute rapidement pour atteindre 8 mm après 10min, après cette durée, l'activité s'annule complètement.

Donc on peut dire que notre agent anti-archéen produit par la souche Sb41 est thermostable à 70°C et à 80°.



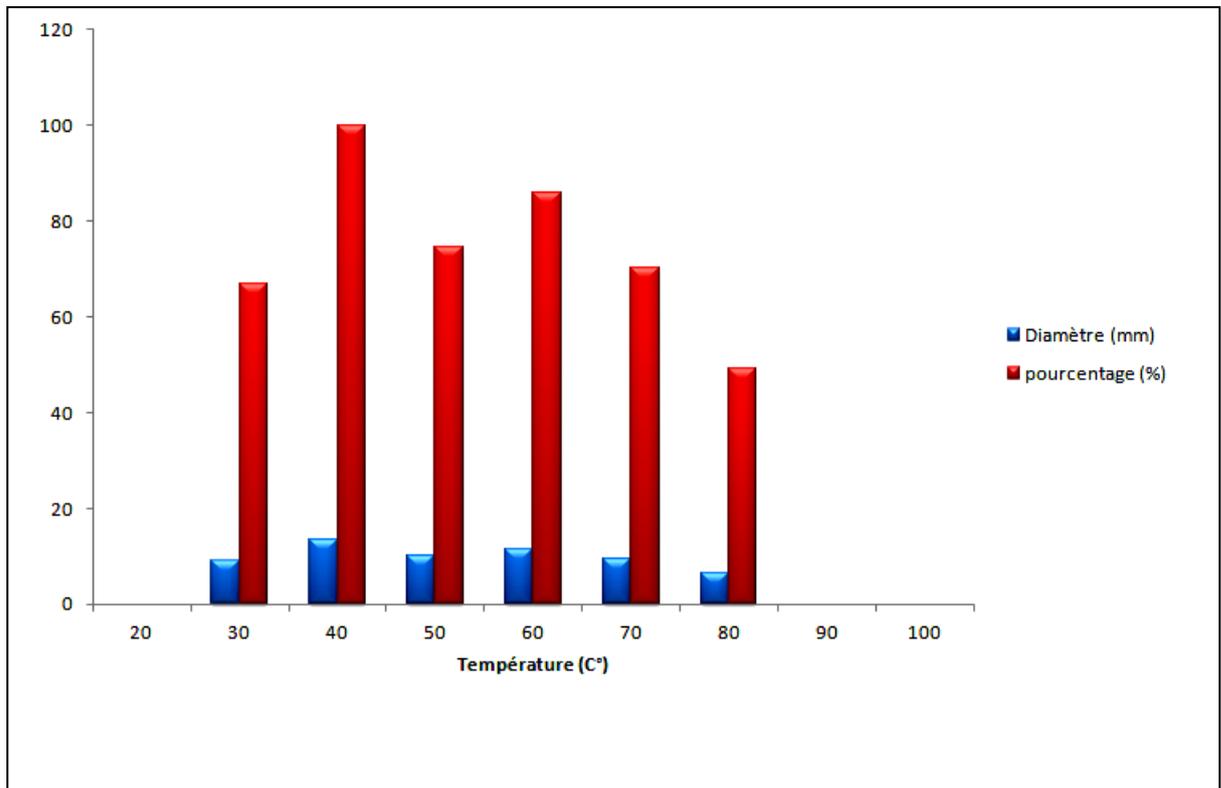
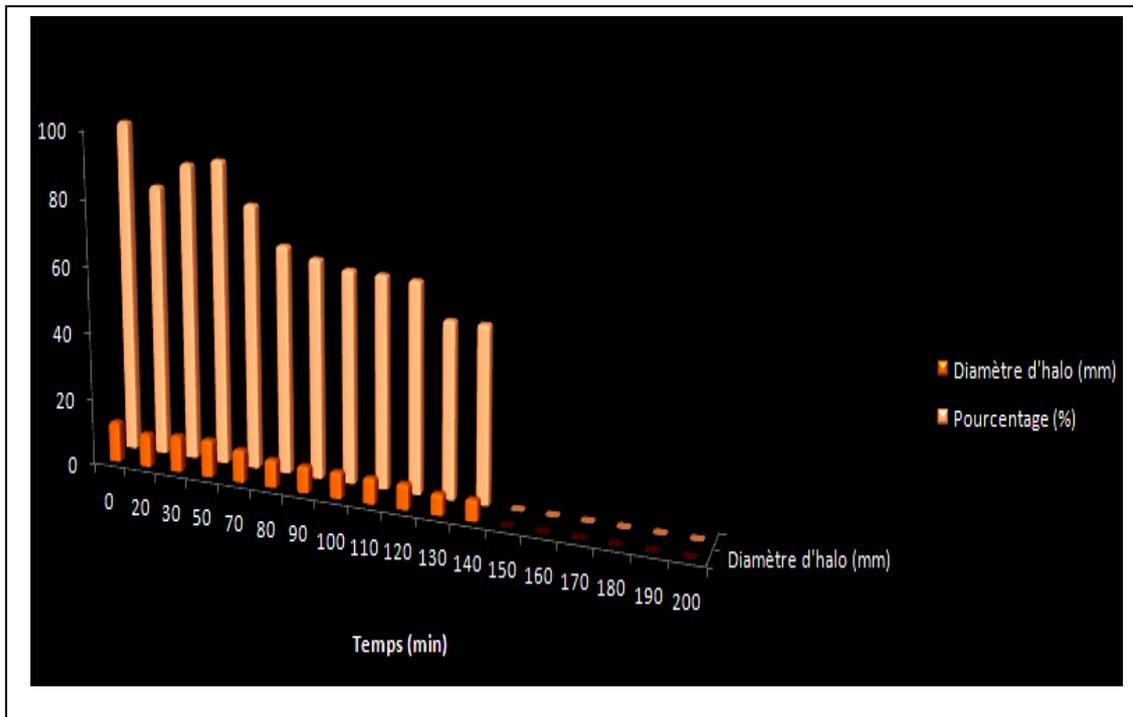
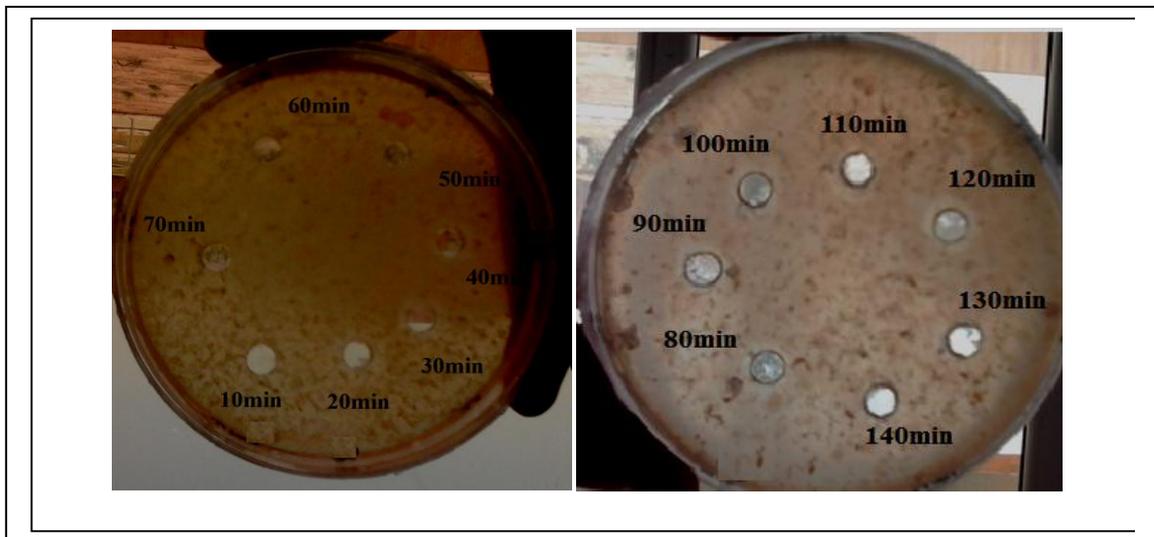


Figure N°28: Effet de la température sur l'activité d'halocine.



A

Figure N°29 : A. Thermo-stabilité de l'activité d'halocine à 70°C.



B

Figure N°29 : B. Image qui représente les zones d'inhibitions à 70°C dépend du temps.

### 8.6. Effet de PH sur 'activité inhibitrice

Le résultat de cette étude est illustré dans la **Figure N°30**

On note une activité de 7 mm de diamètre à pH 3, puis augmente pour atteindre son maximum à pH 7 avec un halo d'inhibition d'environ 10.77 mm. L'activité antagoniste persiste jusqu'à PH 11 avec un halo de 7.5 mm, puis s'annule à pH 12.

Ces résultats montrent la grande stabilité de notre halocine sur une large gamme de pH. Ce caractère est très recherché en Bio-industrie. L'optimum de l'activité à PH 7, ce qui signifie que notre souche productrice d'halocine est l'un des souches neutrophiles.

### 8.7. Traitement du surnageant par la chaleur

L'agent anti-archéenne est localiser dans le surnageant, ce dernier est traité par la chaleur jusqu'à bouillonnement, ensuite tester contre souche cible. Le résultat obtenu est représenté dans la **Figure N°31**.

L'apparition d'une zone d'inhibition autour de surnageant non traité indique que l'activité antagoniste est localisée dans le surnageant, par contre l'absence d'une zone inhibitrice autour de la surnageant traité par la chaleur ; montre que notre surnageant est dénaturé complètement par la chaleur ; et alors l'absence d'une activité.

On conclut que la souche Sb41 produit une halocine de nature protéique nommée Archéocine (Rodriguez –valera *et al*, 1982,1983).

### 8.8. Analyse Infrarouge de halocine

Le résultat de test d'infrarouge est illustré dans la **Figure N°32**.

À partir du spectre d'IR, notre produit est pur, car les bandes sont très visibles. Il y a une bande large entre 2500 et 3300  $\text{cm}^{-1}$ , signifiant la présence d'une fonction OH de la fonction acide COOH, ainsi l'apparition d'une bande entre 1000 et 1600  $\text{cm}^{-1}$ , indique la présence d'une fonction NH de la fonction amine.

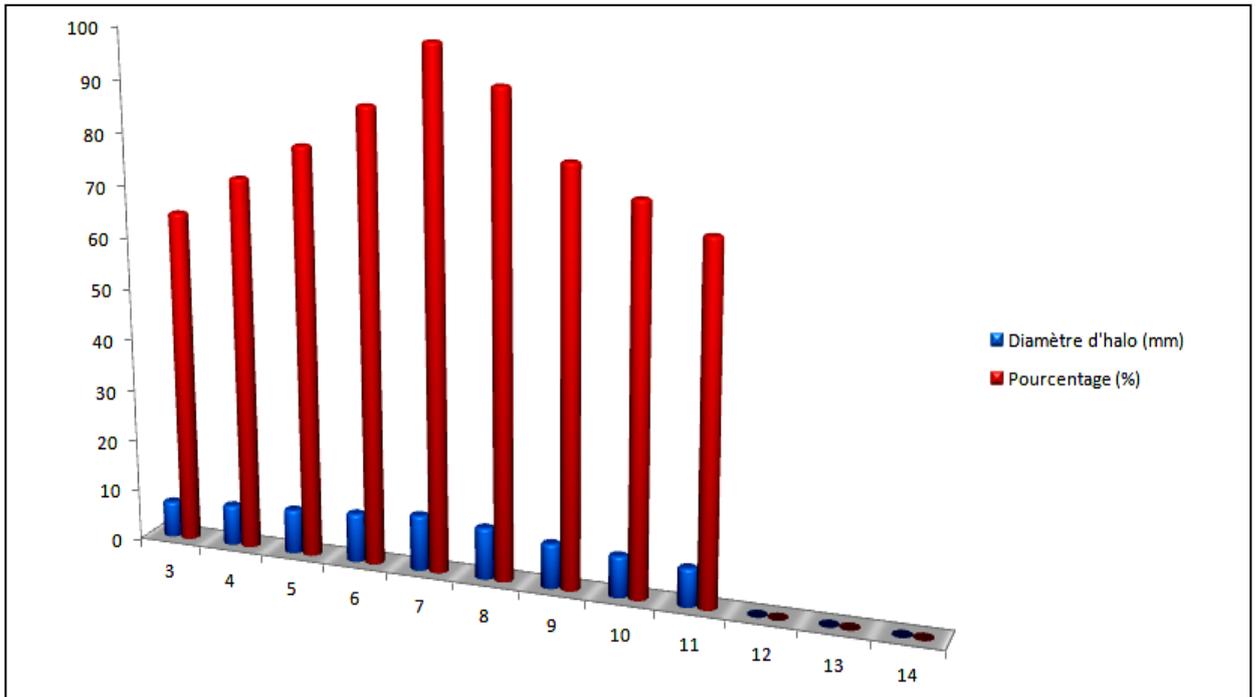
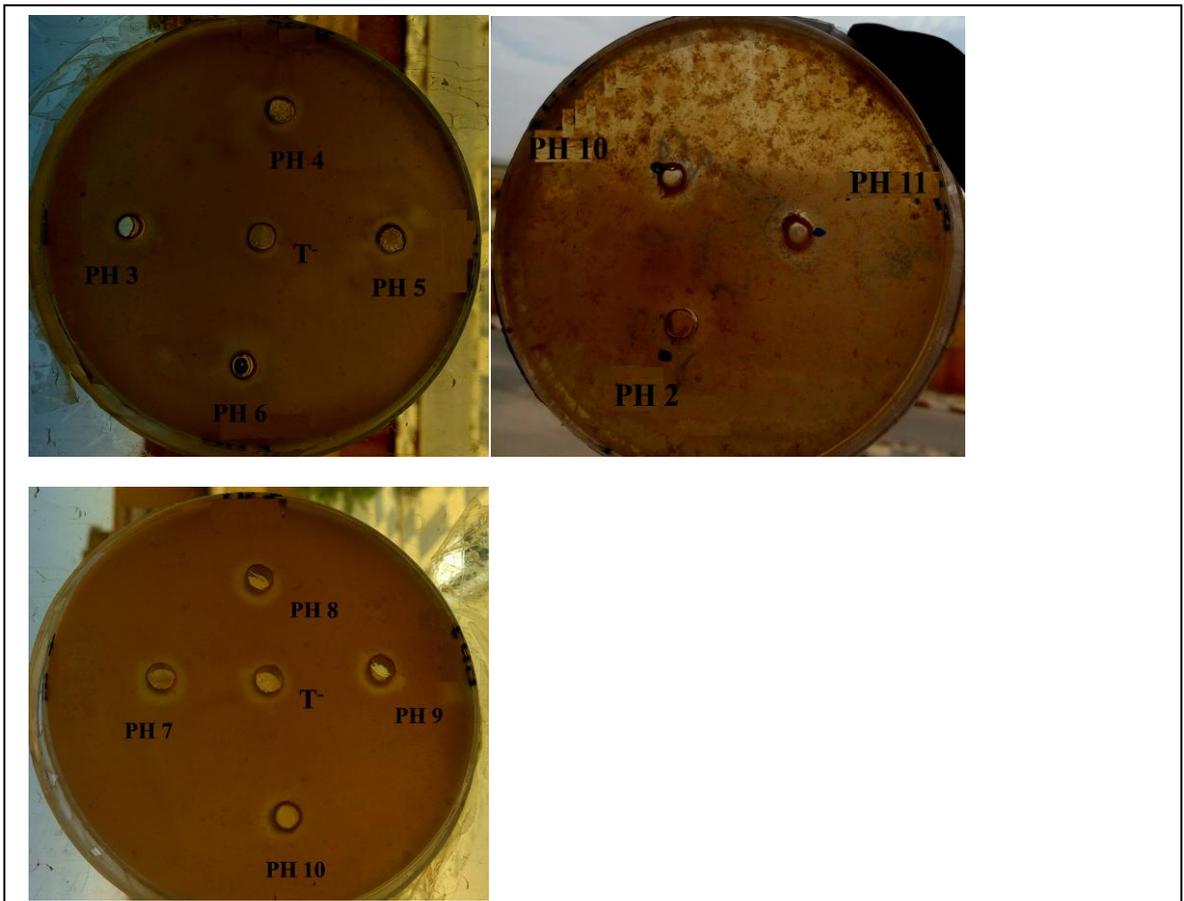
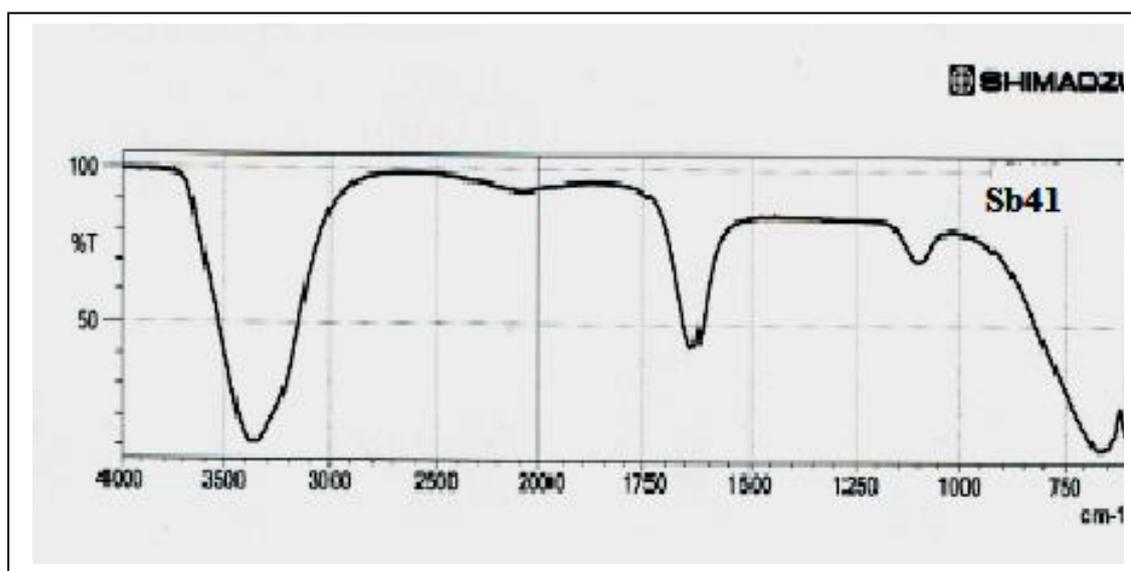


Figure N°30 : Effet de PH sur l'activité d'halocine.





**Figure N°31 : Résultat de traitement du surnageant par la chaleur.**



**Figure N°32 : Résultat d'analyse du surnageant par l'IR.**

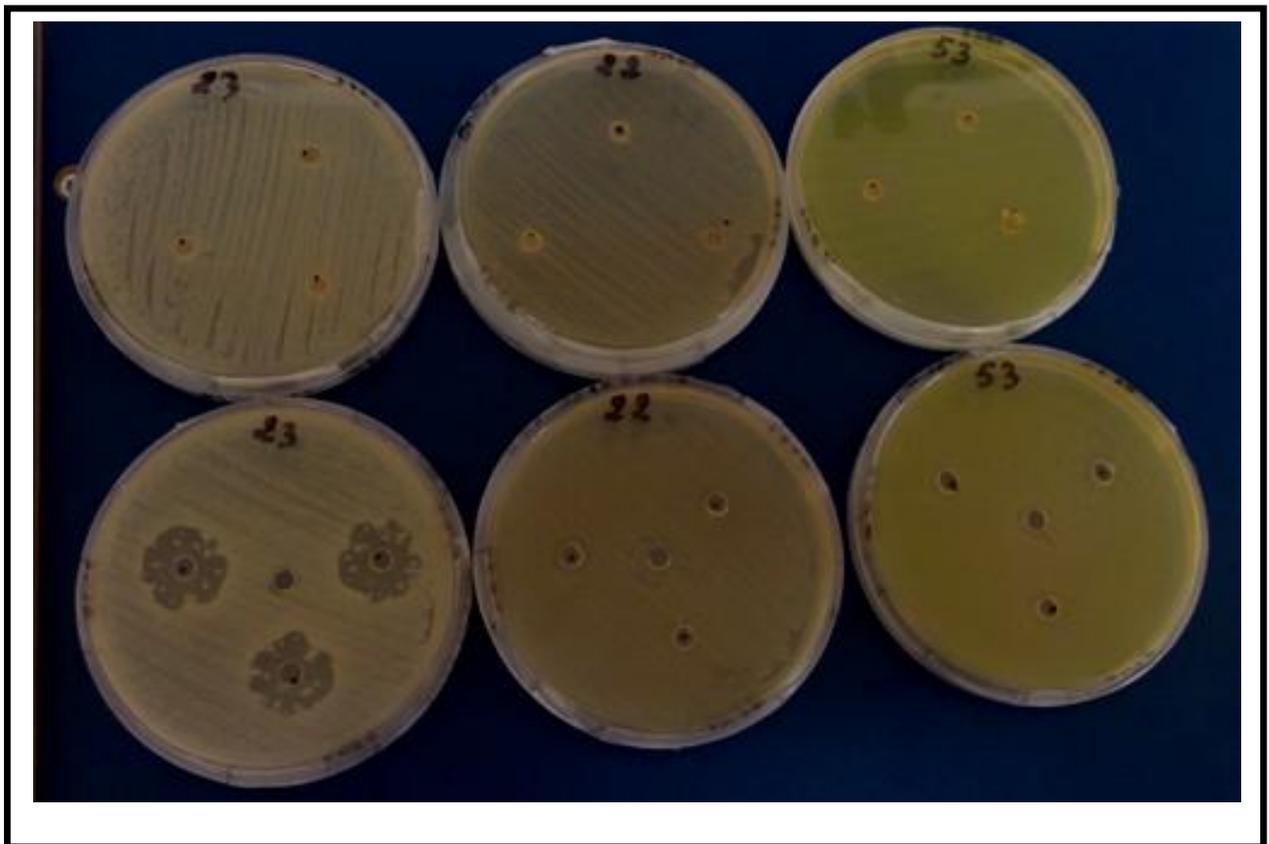
### 8.9. Effet antibactérienne de l'halocine

Après avoir mis en évidence l'activité intra spécifique (anti-Archea), il été jugé nécessaire de déterminer le spectre d'action de l'halocine produite par la souche Sb41 en étudiant son activité antibactérienne selon les deux méthodes de puits et de diffusion sur gélose.

Les résultats sont illustrés dans la **Figure N°33**.

On note une absence d'activité contre *E. coli* et *Pseudomonas aeruginosa* qui sont des bactéries Gram-. Cependant l'halocine est active sur la bactérie Gram+ *Staphilococcus aureus* avec une zone d'inhibition de 18 mm. Ce résultat suggère que notre halocine présente une activité spécifique contre les bactéries Gram+. Ceci pourrait être expliqué par la présence de récepteurs ou de molécules cibles sur la paroi Gram+. Ces cibles sont bien évidemment absentes sur la paroi Gram- .

Donc l'archéocine est provoqué une activité antagoniste contre les archeas et aussi contre les bactéries Gram<sup>+</sup>.



**Figure N° 33:** Résultat d'effet antibactérien d'halocine.

Enfin de ce travail, nous allons identifier les souches Sb41, Sb30, Sb12 et RS42, isolés de deux zones salées de la wilaya de Djelfa. Ainsi fait un criblage sur deux milieux liquide et solide. Nous allons confirmer que la souche Sb41 c'est la souche la plus active de production d'agent inhibiteur. Ce dernier est caractérisé par une activité extra cellulaire, probablement de nature peptidique, sel-dépendant, réversible, thermorésistant et stable à différents gamme de pH. Bien que cette activité soit dirigée contre les Haloarceae, et aussi contre une bactérie *Staphylococcus aureus*.

Dans cette étude, l'objectif est de mettre en évidence la production et la caractérisation des nouvelles bactériocines à partir des microorganismes de groupe Halobacteries de domaine Archaea vivant dans des milieux hypersalins.

Pour ce la ; des expériences effectuées dans des milieux de culture solide et liquide contre une souche cible Sb12, pour cribler la souche la plus active Sb41 de production des substances inhibitrices (19 mm), afin d'extraire, caractériser et de purifier un agent inhibiteur; des tests préliminaires sont intéressés (salinité, température,pH...).

Les résultats de caractérisation obtenues .ils révèlent que notre substance inhibitrice est une micro-halocine de nature protéique, leur activité est maximale à 3 M de NaCl, c'est -à-dire sel-dépendent, thermostable à 70 °C pendant 140min et à 80 °C pendant 10min, aussi stable à pH2 jusqu'à 11, son activité est devenu maximale à pH7. Ce type d'agent est extracellulaires car il est localisé dans le surnageant de culture.

Bien que cette activité soit dirigée contre les archées ainsi contre un autre type des bactéries comme *Staphylococcus aureus*. Ces résultats concordent avec la définition d'une archéiocines (S8) produite par souche archaea halophile S8anotre halocine est comparable avec l'halocine S8.

Avec la diversité métabolique a été trouvée dans les micro-organismes halophiles. Les constituants cellulaire et les biomolécules secréter (substances inhibitrices) par les halo-archaea sont caractérisé par une stabilité fonctionnelle tout à fait exceptionnelle; qui jouent un rôle biotechnologique important par exemple : l'halocine est peu utiliser comme un agent chimio-thérapeutique contre des agents pathogènes.

### A

**Abed H., 2017-** *épistage et utilisation des rhizobactéries antagonistes (Pseudomonas et Bacillus) dans la lutte biologique contre la fusariose du pois chiche induite par Fusarium oxysporum f.sp. ciceris. Thèse de Doctorat, Université Ferhat Abbas Sétif 1 Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie département de microbiologie, Sétif-Alger. P1-97.*

**Amhis., Ammari H., Assaous F., Bekkhoucha., 2005-** Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine, A l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS. **4 : 8/94.**

**Auguet J.C and Casamayor E.O., 2008 -**A hotspot for cold crenarchaeota in the neuston of high mountain lakes. *Environmental Microbiology*, **10**: 1080-1086.

### B

**Benhammou N., Bekkara F.A., 2007-** Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* L. de deux stations de la région de Tlemcen (Algérie), *Laboratoire de Produits Naturels, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Aboubekr Belkaid, BP119, Imama, Tlemcen, ALGÉRIE.* p281-285.

**Bernard O., 2004-** Biodiversity of prokaryotic microflora in El Golea Salt lake, Algerian Sahara, *Laboratory of Microbiology, IRD, University of Provence, Slot 925, 163, Avenue de Luminy, 13288, Marseille, France, Journal of Arid Environments.* **58** : 273–284.

**Bonelo G., Ventosa A., Megias M. and Ruiz-Berraquero F., 1984-** The sensitivity of halobacteria to antibiotics (Halobacteria; *Haloarcula*; antibiotics sensitivity; MIC; resistant mutants), *Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, University of Sevilla, Sevilla, Spain.* **41** : 341-345.

**Bonnet R., Jean-Pierre B., François C., Christin C., 2017-** Comité de l'antibiogramme de la société, *Francois Universitaires de Strasbourg,* **1** :5-107.

**Bouktil N., Benallaoua S., Idres N et Boulila A., 2003 -** Extraction et Caractérisation d'un Agent Antibactérien de type Halocine Produit par une Souche Bactérienne Hyperhalophile. *Sciences & Technologie, C – N°20* pp. 39-43.

**Boutaiba S., Bhatnagar T., Hacene H., Mitchell D.A. and Baratti J.C., 2006-** Preliminary characterization of a lipolytic activity from an extremely halophilic archaeon, *Natronococcus* sp. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,* **41**: 21–26.

**Boutaiba S., Hacène H., Bidle K.A., Maupin-Furlow J.A., 2011-** Microbial diversity of the domain barrier , *Institute of Biotechnology and Department of Biosciences, University of Helsinki, Viikinkaari 5, PO Box 56, 00014 Helsinki, Finland*,p. 811-823.

### C

**Cheung J., Danna K.J., O'Connor E.M., Price L.B. and Shand R.F., 1997-**Isolation, sequence, and expression of the gene encoding halocin H4, a bacteriocin from the halophilic archaeon *Hloferax mediterranei* R4. *J. Bacteriol.*, **179** :548-551.

**Colwell R.R., Grygovora R., 1987-** Methods in microbiology volume 19 (current methods for classification and identification of microorganisms, *Acadymic Press Limited New York*.p137-151.

**Costenaro L., 2001-** *Interactions faibles protéine–protéine en solution: La malate déshydrogénase halophile*, Thèse préparée au Laboratoire de Biophysique Moléculaire Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel (CEA–CNRS–UJF), Grenoble: 16p.

### D

**Denis Roy., 2001-** *Production et caractérisation d'une bactériocine produite par lactococcus lactis ssp. Lactis mccls*. Thèse de doctorat, Université laval –France, pp3-5.

**Derradji N., Bouchelouche D. and Moulai R., 2013-**Place des oiseaux d'eau dans le fonctionnement de deux zones humides continentales, Zehrez Chergui et Zehrez Gharbi (wilaya de Djelfa), *International Congress of the Populations & Animal Communities "Dynamics & Biodiversity of the terrestrial & aquatic Ecosystems""CIPCA4"TAGHIT (Bechar) – ALGERIA*. p399-409.

**Dussault H.P. (1955).** An improved technique for staining red halophilic bacteria. *Journal Of Bacteriology*. **70** :485-486.

### E

**Ebel C., Madern D., et Zaccai G. (2004).** Molecular adaptation of halophilic proteins. *Extremophiles* **2**:1-7.

**Edgerton M.E. and Brimblecombe P., 1981-** Thermodynamics of halobacterial environments, *Cardiovascular Research Institute, University of California, Sarl Francisco, CA, U.S.A. 9414*. *Can. J. Microbiol.* **27**:899-909.

**Ellen A.F., Rohulya O.V., Fusetti F., Wagner M., Albers S.V. and Driessen A.J., 2011-** The sulfolobacin genes of *Sulfolobus acidocaldarius* encode novel antimicrobial proteins. *J. Bacterol.*, **193** : 4380-4387.

### F

**Fiche descriptive sur les zones humides Ramsar Le Chott de Zehrez Chergui., 2003,** *Ministere de l'agriculture et du devel oppment rural direction generale des forets*. p1-17.

### G

**Galinski ., Tindall., 1992-** Chapitre 11 Biotechnological Applications and Potentials Of Halophilic Microorganisms. P357-358.

**Gautier E.F., 1914-** Le rocher de sel de Djelfa, In: *Annales de Géographie*, t. 23, n°129, **1914** :245-260.

**George M.,Carlone., Manuel J., Valaez. And John M.P., 1983-**Methods for Distinguishing Gram-Positive from Gram- Negative Bacteria, *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, Copyright,American Society for Microbiology.**16** : 1157-1159.

**Gratia A. and Frederiq P., 1950-** Rapports Entre Colicines etBacteriophages Du Groupe. T.<sub>1</sub> -- T. 7. (*Institut de Bact&iologie de l'Universit6 de Lidge*), p .120.

**GregersenT., 1978-** Rapid Method for Distinction of Gram-Negative from Gram-Positive Bacteria, *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **5** :123-127.

**Gutiérrez M. C., Castillo A. M., Kamekura M., Xue Y., Ma Y., Cowan D. A., Jones B. E., Grant W. D. and Ventosa A., 2007-** *Halopiger xanaduensis* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from saline Lake Shangmatala in Inner Mongolia, China, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.*, 57: 1402-1407.

### H

**Haavik H.I., 1976-On the Role of Bacitracin Peptides in Trace Metal Transport** Halophilic and Halotolerant Micro-Organisms from Soils, *Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of Sevilla,41012 Sevilla, Spain*. P87-115.

**Haseltine C., Hill T., Montalvo-Rodriguez R., Kemper S.K., Shand R.F. and Blum P., 2001.** Secreted euryarchaeal microhalocins Kill hyperthermophilic crenarchaea. *J. Bacteriol.*, **183** :287-291.

**Hocine H., Rafa F., Chebhouni N., Boutaiba S., Bhatnagar T., Jacques C. Baratti. and Jerome J.P., James T.S., Stephen L., 2004-** Microbiologie, cour et question de révision, Sinauer Associates, Inc, Inc.p865.

### J

**Joyce C., Kathleen J., Danna., Elizabeth M. O'connor., Lance B., Price. and Shand R.F., 1997-** Isolation, Sequence, and Expression of the Gene Encoding Halocin H4, a Bacteriocin from the Halophilic Archaeon *Haloferax mediterranei* R4. *Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, Flagstaff, Arizona 86011-5640.*, **179** : 548-551.

### K

**Kharroub K., 2007-** *Identification et étude moléculaire des bactéries et des archéobactéries aérobies halophiles de la sebkha Ezzemoul (Ain M'Lila). Thèse de doctorat, Université- Alger, pp 24-26.*

**Klaenhammer T.R., 1988-** Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, **70** : 337-349.

**Kristjansson J.K. et Hreggvidsson G.O., 1995 -** Ecology and habitats of extremophiles. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*; 11:17-25.

### L

**Li Y., Xuan H., Liu X., Zhou M., et Tan H., 2003 -** Purification and biological characterization of halocin C8, a novel peptide antibiotic from *Halobacterium* strain AS7092, *Extremophiles*, **7**: 401-407.

**Litchfield C. D. and Oren A., 2001-** Polar lipids and pigments as biomarkers for the study of the microbial community structure of solar salterns. *Hydrobiologia*, **466** : 81-89.

**Litchfield C. D., 1998 -** Survival strategies for microorganisms in hypersaline environments and their relevance to life on early Mars. Department of Biology, George Mason University, Fairfax, Virginia 22030, USA. *Meteoritics & Planetary Science*, **33**, 813-819.

**Lucia C., 2008-** microbial limit and bioburden tests validation approaches and global requirement, *CRC press new york* . p14/311.

### M

**Madalin E., Takashi L., Masahiro K., Gabriela T. and Lucia D., 2007-** *Haloferax prahovense* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a Romanian salt

**Madigan., Michael T., John M., Martinko., David A., Stahl., David P., Clark., 2013-** *Microorganisms and Microbiology, Pearson Education, Inc.* p.2-23.

**Manuel terrestre de l'OIE., 2008-** Chapitre 1.1.6. Méthodes de laboratoire utilisées pour les essais d'antibiorésistance. p61-71.

**Mei S., Sun S., Liu X., Lu Q., Cai L., Li Y. and Xiang H., 2008-** The helix-loop-helix motif at the N terminus of Hal I is essential for its immunity function against halocin C8. *J. Bacteriol.*, **190** : 6501-6508.

**Meknaci-Menad R., 2015 -** *Production et caractérisation de substances antimicrobiennes chez des souches de Halobactéries.* Thèse de Doctorat, Université des sciences et de la technologie Houari Boumediène-Alger, pp 12-47.

**Meknaci-Menad R., Philippe L., Claudine S., Jean-Pierre L., Jean-pierre A., Hocine H. and Jamal O., 2014-** Agar-supported cultivation of *Hlorubrun* sp. SSR, and production of halocin C8 in the Scale-up prototype platotex. *Extremophiles, Springer.*, **18** :1049-1055.

**Meral B., and Selda E., 2005-** Prevention of halobacterial damage on hide caused by lipolytic halophilic archaea with halocins, *Department of Biology, Science and Arts Faculty, Marmara University, 34722 Göztepe, İstanbul, Turkey*, p. 1-8.

**Meseguer I., Rodriguez –Valera F. and Ventosa A., 1985-** Antagonistic interactions among halobacteria due to halocin production. *FEMS. Microbiol. Lett.*, **36** :177-182.

**Meseguer I., Torreblanca M. and Konishi T., 1995-** Specific inhibition of the halobacterial Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter by halocin H6. *J. Biol. Chem.*, **270** :6450-6455.

**Montalvo-Rodriguez R., Lopez-Garriga J., Russell H., Vreeland, Oren A., Ventosa A. and Masahiro K., 2000-** *Haloterrigena thermotolerans* sp. nov. à halophilic archaeon from Puerto Rico, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* **50** :1065–1071.

### N

**Nina S., Atanasova., Maija K., Pietila. and Hanna M. Oksanen., 2012-** Diverse antimicrobial interactions of halophilic archaea and bacteria extend over geographical distances and cross the domain barrier, *Microbiology Open*. 2(5) :811-825.

### O

**O'connor E.M. et Shand R.F., 2002** - Halocins and Sulfolobocins: The emerging story of archaeal protein and peptide antibiotics. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*, 28:23-31.

**Oren A., 2006** - Life at High Salt Concentrations. *Prokaryotes*2:263-282.

**Oren A., Robert M., Berman., Angela C., Amit A., Dan., George R., Heninger., Dennis S., Charney. and John H.K., 2000-** Antidepressant Effects of Ketamine in Depressed Patients. BRIEF REPORTS, *Biol Psychiatry.*, 47:351–354.

**Oren A., Ventosa, A. and Grant G., 1997-** Proposed Minimal Standards for Description of New Taxa in the Order *Halobacteriales*, *International Union of Microbiological Societies*.47 : 233-238.

### P

**Paul Blum .,2008-** New Models For Prokaryotic Biology. *Caister Academic Press Norfolk, UK* 233-234.

**Paul S., Sumit K.B., Sabyasachi D., Eric T H. and Chitra D., 2008-** Molecular signature of hypersaline adaptation: insights from genome and proteome composition of halophilic prokaryotes, *Genome Biology.*, 9 : R70.

**Peduzzi R., Tonolla M., Boucher-Rodoni R., 2006** - Milieux extrêmes: Conditions de vie en milieu alpin et milieu marin, *Actes et contributions scientifiques*: 9p.

**Platas G., Meseguer I. and Amils R., 1996-** Optimization of the production of a bacteriocin from *Haloferax mediterranei* Xia3. *Microbiologia*, 12 :75-84.

**Platas G., Meseguer I. and Amils R., 2002** - Purification and biological characterization of halocine H1 from *Haloferax mediterranei* M2a. *Int Microbiol.*, 5:15-19.

**Prangischvili D., Holz I., Stieger E., Nickell S., Kristgansson, J.K. and Zillig W., 2000-** Sulfolobicins, specific proteinaceous toxins produced by strains of the extremely thermophilic archaeal genus *Sulfolobus*. *J. Bacteriol.*, 182 : 2985-2988.

**Prescott.,Hatley., Klein., Wiley., Sherwood.,Woolverton., 2010-**Microbiologie, *De boeck* . 3 : 658/1088.

**Price L.B. and Shand R.F., 2000-** Halocin S8 : a 36-amino-acid microhalocin from the haloarchaea strain S8a. *J. Bacteriol.*, 182 :4951-4958.

### R

**Riley M.A. and Wertz J.E., 2002-** Bacteriocin diversity : ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie*, 84 :357-364.

**Riley M.A., 1998-** Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. *Annu. Rev. Genet.*32 :255-278.

**Rodriguez-Valera F., Juez g. and Kushner D.J., 1983-**Hlobacterium mediterranei spec. Nov, a novo carbohydrates –utilizin gextremes halophiles. *Syst. Appl .Microbial.* 4 :369-381.

**Rodriguez-Valera F., Juez G. et Kushner D.J., 1982 -** Halocins : Salt-dependantbacteriocins produced by extremely halophilic rods. *Canadian Journal of Microbiology*, 28: 151-154.

### S

**Shand R.F. and Levya K.J., 2007-** Peptide and protein antibiotics from the domain *Archaea* : *halocins and sulfolobicins*. In *Bacteriocins Ecology and Evolution*, M.A. Riley, and M.A.Chavan, eds. (New York : Springer) , p. 150.

**Shand R.F. and Levya K.J.,2008-** Archaeal antimicrobials : an undiscovered country. In *Archaea New Models for Procaryotic Biology*, P . Blum, ed. (Norfolk, UK : Caister Academic Press), P. 248.

**Suhr K.I. and Nielsen P.V., 2003-** Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi, *Mycology Group, Biocentrum-DTU, Technical University of Denmark, Kgs. Lyngby, Denmark.* 94 :665-674.

**Sun C., Li Y., Mei S., Lu Q., Zhou I. 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

**Tamar K.P., Oren A., 2000**- Halocins: are they involved in the competition between halobacteria in saltern ponds?. *Extremophiles, Springer-Verlag.*, **4** : 35-41.

**Torreblanca M., Meseguer I. and Rodriguez-Valera F., 1989**- Halocin H6, a bacteriocin from *Haloferax gibbonsii*. *J. Gen. Microbiol.*, **135** : 2655-2661.

**Torreblanca M., Meseguer I. and Ventosa A., 1994**- Production of halocin is a practically universal feature of archaeal halophilic rods. *Lett. Appl. Microbiol.*, **19** :201-205.

**Tortorano A.M., Cabrini E. and Viviana M.A. 1979**- Sensibilité in vitro des levures à cinq antibiotiques. Comparason de deux méthodes C.M.I. en gélose et méthode des disques. *Bull. Soc. Fr. Myc. Med.*, **8** :69-74.

### V

**Ventosa A., Mellado E., Sanchez-Porro C. and Carmen Marquez M., 2008**- Chapter 5- Halophilic and Halotolerant Micro-Organisms from Soils. *Microbiology of extreme Soils Soil Biology*, **13**:87-115.

**Vijay K ., Santosh K.T., 2017**- Activity-guided separation and characterization of new halocin HA3 from fermented broth of *Haloferax larsenii* HA3, *Extremophiles*.

### W

**Woese C. R., and Fox G.E., 1977**. Phylogenetic structure of the *prokaryotic domain: the primary Kingdoms*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**:5088-5090.

**Woese C. R., Magrum L. J. et Fox G. E., 1978**- *Archaeobacteria*. *Journal of Molecular Evolution*, **11**: 245-251.

**Woese C.R., Kandler O. and Wheelis M. L., 1990-** Towards a natural system of organisms : Proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **.87** :4576-4579.

## *Annexe 01*

### Matériel utilisé :

- Microscope optique
- Spectromètre
- Incubateur à 40°C
- Incubateur- agitateur
- Autoclave 120°C
- Etuve
- pH mètre combiné thermomètre
- Bain marie
- Centrifugeuse
- Agitateur plaque chauffante
- Vortex
- Balance analytique
- Balance de paillasse
- Hotte
- Loupe
- Chauffe ballon
- Réfrigérateur
- Bec Benzène
- Portoirs de tubes
- Tubes à essai (20ml)
- Tubes coniques (50ml)
- Boîtes Pétri
- Erlenmayer (500ml ;1l)
- Becher
- Fiole graduée
- Eprouvette graduée
- Flacons (125ml ;250ml ;500ml)
- Seringues (5ml)
- Pipettes Pasteur
- Micropipettes (200µl)
- Micropipettes (1ml)
- Embouts jaunes
- Embouts bleus
- Micro-tubes 1 ml Eppendorfs
- Anse de platine
- Spatule
- Lames
- Lamelles
- Papier aluminium
- Para –film
- Sacs en plastique
- Seringues
- Pied-à-coulisse

### Produits utilisés :

- Chlorure d'hydrogène (HCl) (1N)
- Hydroxyde de sodium (NaOH) (1N)
- Acide acétique (2%)
- Ethanol (70%)
- Fuchsine
- Violet de gentiane
- Hydroxyde de potassium (KOH)
- Glycérol
- Extrait de levure
- Agar
- Mac farlon

## *Annexe 02*

### **Les différentes étapes de préparation de MSH solide**

Pour préparé 1L de ce milieu on suivant les étapes suivants :

- \*.Mettez 700 ml d'eau distillée dans une RLN Mayer
- \*.Met l'RLN Mayer sur un agitateur 1400trm et une température 200 °C
- \*Ajouter les 8 constituants (laissez le NaCl en dernier) pour évité la précipitation de sel;et laissez le mélange agitée jusqu'à devient limpide.
- \*. Ajoutez 20 g d'agar et agité bien pour obtienne un milieu très homogène .
- \*.Met le mélange préparé dans un éprouvette (1L) pour ajustez ;par l'ajout d'eau distillée jusqu'à 1000ml.
- \*. dans des flacon de 250ml met préalablement notre milieu .
- \*.Met les flacon dans un autoclave pendant 20 min (n'oublie pas d'ouvrir les flacons un ¼ de tour)
- \*.coulez 20 ml de notre milieu dans les boites de Pétri( sous hotte)
- \* laissez les boites refroidir.

#### ***Remarque :***

Pendant la préparation de milieu.

Il faut couvrir le couvercle de RLN Mayer par un papier aluminium pour évité l'évaporation de milieu.



### *Annexe 03*

**Tableau :** représente la comparaison entre les 3 domaines du vivants Archaea ,Eubactéries et Eucaryotes(In Briffotiaux, 2008).

	<b>Archaea</b>	<b>Bacteria</b>	<b>Eucarya</b>
Taille typique	1 à 4 µm	1 à 4 µm	Supérieure à 5 µm
Caractéristiques physiologiques	Aérobie et anaérobie	Aérobie et anaérobie, chlorophyllienne	Très largement aérobie, chlorophyllienne
Matériel génétique	Petit chromosome circulaire, plasmides et virus ; génome associé avec des histones	Petit chromosome circulaire, plasmides et virus ; pas d'histones	Noyau complexe avec plus d'un chromosome linéaire, virus ; génome associé avec des histones
Différenciation	Généralement unicellulaire, différenciation cellulaire rare	Généralement unicellulaire, différenciation cellulaire rare	Unicellulaire et pluricellulaire, différenciation cellulaire fréquente
Paroi cellulaire	Protéine, glycoprotéine, pas de paroi mais une couche S (S-layer)	Peptidoglycane (muréine) et LPS, rarement formé de protéines, formes sans parois rares	Grande variété, absence de peptidoglycane
Membrane cytoplasmique	Ether de glycérol et d'isoprénoïdes, site de la biosynthèse d'énergie	Ester du glycérol et des acides gras, site de la biosynthèse de l'énergie	Esters du glycérol et des acides gras, cholestérol fréquent
Membranes intracytoplasmiques	Généralement absentes	Généralement absentes ; quand présentes, contiennent de grandes quantités de protéines	Fréquentes dans les organites comme les mitochondries et les chloroplastes, le noyau, l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique et les vacuoles ; site de la biosynthèse de l'énergie
Locomotion	Flagelle simple, plusieurs types de flagelline	Flagelle simple, glissement, un seul type de flagelline	Flagelles complexes, cils, pattes, nageoires, ailes

<b>Traduction</b>			
Synthèse protéique	Ribosome 70S, insensible au chloramphénicol et au cycloheximide, diphtamide présente dans le facteur d'élongation	Ribosome 70S, sensible au chloramphénicol, insensible au cycloheximide, diphtamide absente dans le facteur d'élongation	Ribosome 80S et 70S (organites), insensible au chloramphénicol (80S), sensible au cycloheximide (80S), diphtamide présente dans le facteur d'élongation
ARNr	5S, 16S, 23S	5S, 16S, 23S	5,8S, 18S, 28S
Séquence Shine Dalgarno	Présence	Présence	Absence
<b>Transcription</b>			
ARN polymérase	Complexe (1 type, 12 sous-unités)	Simple (1 type, 4 sous-unités)	Complexe (3 types, nombreuses sous-unités)
Mode de fixation de l'ARN Pol sur le promoteur	Protéine TBP (TATA binding protein) Promoteur : séquence TATA située à -25 pb du site d'initiation	Facteur $\sigma$ Promoteur : séquences situées à -35 pb et -10 pb du site d'initiation	Protéine TBP Promoteur : séquence TATA située à -25 pb du site d'initiation
<b>Réplication de l'ADN</b>			
Origine de réplication	Une ou plusieurs origines de réplication selon les espèces	Une seule origine de réplication <i>Ori C</i>	Plusieurs origines de réplication impliquant le complexe ORC
Hélicase	MCM (Minichromosome maintenance complexe)	DnaB	MCM (Minichromosome maintenance complexe)
ADN Polymérases	Famille B et D pour les <i>Euryarchaeota</i> , Famille B pour les <i>Crenarchaeota</i>	Pol I (famille A), Pol II (famille B), Pol III (famille C)	Principales ADN Pol : Pol $\alpha$ , Pol $\delta$ , Pol $\epsilon$ (famille B)
Facteur de processivité	PCNA	$\beta$ clamp	PCNA

## Annexe 04

\*Résultats de cinétique de croissance des souches productrices d'halocine.

Souche/jours	J0	J1	J2	J3	J4	J5	J6
<b>Sb41</b>	0.028	0.299	0.488	0.859	1.086	0.937	0.777
<b>Sb30</b>	0.024	0.120	0.600	1.045	1.299	1.097	0.940
<b>RS42</b>	0.047	0.106	0.604	1.070	1.358	0.920	0.390

\*Résultat de test d'antagoniste en milieu MSH semi-solide (méthode de disque d'agar)

Souche	<i>Sb41</i>	<i>Sb30</i>	<i>RS42</i>
<b>Diamètre d'halos</b>	d=10.39 mm	d= 9.20 mm	d=9.72 mm

\*Résultats de test d'activité d'halocine produit par les souches Sb41,Sb30,RS42 contre la souche cible Sb12 en milieu liquide.(méthode des puits.)

Souche cible	Souches tests			
	<b>Sb41</b>	<b>Sb30</b>	<b>RS42</b>	
<b>Sb12</b>	Jo	-	J0	6.84mm
	J1	7.30mm	J1	7.34mm
	J2	11.93mm	J2	10.02mm
	J3	13.81mm	J3	13.12mm
	J4	18.27mm	J4	12.35mm
	J5	19.39mm	J5	11.45mm
	J6	16.70mm	J6	10.97mm

\*résultats de l'effet de concentration sel sur l'activité

La concentration de NaCl	Diamètre d'halos en mm	L'activité résiduelle%
<b>0M</b>	0	0
<b>0.5M</b>	0	0
<b>1M</b>	5.98	57.72
<b>1.5M</b>	7.89	76.15
<b>2M</b>	7.96	76.83
<b>2.5M</b>	11.21	108.20
<b>3M</b>	12.54	121.04
<b>3.5M</b>	10.64	102.70
<b>4M</b>	7.98	77.03
<b>4.5M</b>	7.35	70.95
<b>5M</b>	8.68	83.78

Témoin :10.36mm

## Annexe 05

\*Effet de pH sur l'activité d'halocines

pH	Diamètre d'halos en mm	L'activité résiduelle%
pH 1	0	0
pH 2	9.30	86.35
pH 3	6.98	64.81
pH 4	7.80	72.42
pH 5	8.56	79.48
pH 6	9.45	87.74
pH 7	10.77	100
pH 8	10.00	92.85
pH 9	8.63	80.13
pH 10	8.02	74.47
pH 11	7.43	68.99
pH 12	0	0
pH 13	0	0
pH 14	0	0

Témoin : 10.77mm

\*Résultat de cinétique de dialyse

Temps	Diamètre d'halos en mm	L'activité résiduelle %
0 min	10.36	100
5min	10.07	97.20
10 min	9.78	94.40
20 min	9.44	91.12
30 min	9.06	87.45
1h	8.97	86.58
1h :30min	8.63	83.30

Témoin : 10.36mm

\*Test de la température sur l'activité d'halocine.

Température °C	Diamètre d'halos en mm	L'activité résiduelle %
20	0	0
30	8.98	66.72
40	13.46	100
50	10.03	74.52
60	11.55	85.81
70	9.43	70.06
80	6.61	49.11
90	0	0
100	0	0

Témoin : 13.46mm

## **Annexe 06**

\*Résultat de thermo-stabilité à 70°C sur l'activité d'halocine

<b>Temps(min)</b>	<b>Diamètre d'halos en mm</b>	<b>L'activité résiduelle %</b>
0min	12.25	100
10min	8.73	71.27
20min	10.01	81.71
30min	10.94	89.31
40min	7.52	61.39
50min	11.19	91.35
60min	9.09	74.21
70min	9.72	79.35
80min	8.37	68.33
90min	8.04	65.63
100min	7.97	63.59
110min	7.76	63.35
120min	7.07	62.86
130min	6.45	52.65
140min	6.47	52.82
150min	0	0
160min	0	0
170min	0	0
180min	0	0
190min	0	0
200min	0	0

Témoin :12.25

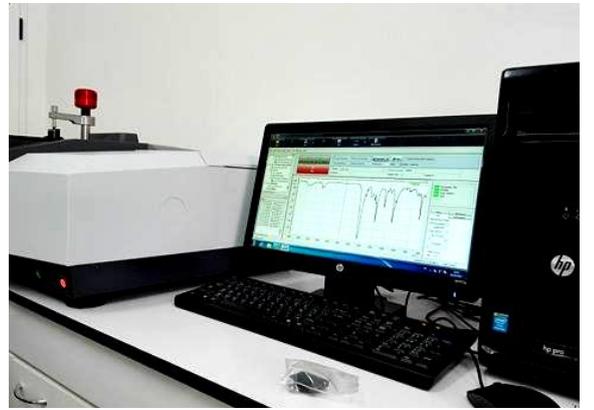
### **\* Préparation d'acide sulfurique**

Dans une éprouvette de 100 ml verser un volume de 99 ml d'eau distillée et à l'aide d'une micropipette ajouter 1 ml d'acide sulfurique.

## Annexe 07

### \* Les appareils utilisés

**Appareil infrarouge**



**Pied à coulisse**



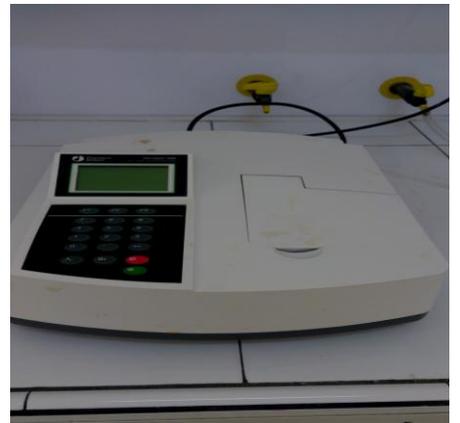
**Microscope optique**



**pH mètre**



**Spectrophotomètre**



**Autoclave**



**Vortex**



**Stérilisateur**



**Bain marie**



**Incubateur**



**Balance analytique**



**Incubateur**



**Bain marie**



**Incubateur-agité**



**Centrifugeuse**



## **GLOSSAIRE**

\***Aérobie** : Organisme qui croit en présence d'oxygène atmosphérique.

\***Aérobie strict (obligatoire)** : Organisme qui ne croit qu'en présence d'oxygène.

\***Agar ou gélose** : Polysaccharide sulfaté complexe, généralement extrait d'une algue rouge ; utilisé comme agent de solidification dans la préparation des milieux de culture.

\***Agent antimicrobien** : Agent qui tue les micro-organismes ou qui inhibe leur croissance.

\***Antibiotique** : Produit microbien, ou un dérivé, qui tue les micro-organismes sensibles ou inhibe leur croissance.

\***Archaea** : Domaine de procaryotes qui possèdent des lipides isoprénoides avec des diéthers de glycérol ou des tétraéthers de diglycérol dans leurs membranes et de l'ARNr archéen.

\***Autoclave** : Appareil qui stérilise les objets par de la vapeur sous-pression. Sa mise au point a très fortement stimulé le développement de la microbiologie.

\***Boîte de Pétri** : Boîte ronde, peu profonde, faite de deux moitiés (un fond et un couvercle) et utilisée pour la culture de micro-organismes sur des milieux solides. Le couvercle de la boîte est plus grand que le fond, afin d'éviter la contamination de la culture.

\***Colonie** : Ensemble de micro-organismes croissant sur une surface solide, comme celle d'un milieu de culture gélosé. Souvent visible à l'œil nu, mais peut aussi n'être visible qu'au microscope.

\***Halobactéries ou Halophiles extrêmes** : Groupe d'archées qui ont une dépendance absolue vis-à-vis de concentrations élevées en NaCl pour croître et ne survivent pas en dessous de 1.5M en NaCl.

\***Halophiles** : Micro-organisme qui requiert des concentrations élevées en NaCl pour sa croissance.

\***Métabolites secondaires** : Produits métaboliques synthétisés quand la croissance est achevée. On considère les antibiotiques comme des métabolites secondaires.

**\*Souche** : Population d'organismes qui descendent d'un seul organisme ou isolat d'une culture pure.

**\*Latitude** : C'est une coordonnée géographique représentée par une valeur angulaire, expression de la position d'un point sur Terre, au nord ou au sud de l'équateur qui est le plan de référence.

**\*Longitude** : C'est une coordonnée géographique représentée par une valeur angulaire, expression du positionnement est-ouest d'un point sur Terre. La longitude de référence sur Terre est le méridien de Greenwich.

**\*Taxonomie** : C'est la science qui a pour objet de décrire les organismes vivants et de les regrouper en entités appelées taxons afin de les identifier puis les nommer et enfin les classer.

### ملخص

في هذا العمل قمنا بدراسة إنتاج وخصائص المواد المضادة المنتجة من طرف سلالات ملحية تنتمي لميدان الاغكيا معزولة من حجر الملح و زاغز الشرفي في ولاية الجلفة. قمنا باختيار 3 سلالات تنتمي لعائلة الالوبكتيريا تتميز هذه الأخيرة بإنتاج مواد مثبطة تدعى الالوسين مدرجة ضد بكتيريا مستهدفة بغرض انتقاء السلالة الأكثر إنتاجا في كل من الوسطين السائل والصلب. Sb41 هي الأكثر إنتاجا لهذه المواد المثبطة بنشاط يقدر ب 18 مم وهذا النوع من الالوسين هو عبارة عن بيتيد قابل للتجدد بالملح. مقاوم للحرارة. يتمركز خارج الخلايا. يفرز أثناء مرحلة التطور إلى غاية أن يبلغ نشاطه الأعظم في المرحلة الثابتة. إضافة إلى هذا يمكن لهذا النشاط أن يثبط الاغكيا و أيضا نوع من البكتيريا إذن يمكننا القول ان هذا النوع من الالوسين مشابه للنوع S8.

### Résumé

Dans ce travail, nous allons étudier la production et la caractérisation des substances antimicrobiennes produites par des souches halophiles, représentants du domaine Archaea, isolées de la rocher de sel et zahrez el chergui dans la wilaya de Djelfa. Nous allons sélectionner 3 souches tests de la famille Halobacteriaceae, ces dernières caractérisées par la production des substances inhibitrice de types « Halocine », dirigé contre la souche cible Sb12 ; afin de sélectionner la souche la plus active de production en milieu solide et liquide.

La souche Sb41 c'est la souche la plus active de production de ces substances avec une zone d'inhibition de 19 mm. Notre halocine est un peptide (micro-halocine), réversible, sel-dépendant, thermorésistant (jusqu'à 70 °C), localisé dans le surnageant de culture sécrété à la phase exponentielle jusqu'à attendre leur optimum à la transition à phase stationnaire. De plus cette activité inhibitrice est inhibé les Haloarchaea et un type de bactéries *Staphylococcus aureus* avec une zone d'inhibition de (11.18 mm). On peut dire que notre Halocine produit par la souche Sb41 est similaire de S8.

**Mots clés :** Halophile, Halobacteriaceae, Halocine.

### Abstract

In this work ,we will study the production and the characterization of the antimicrobic substances produced by halophilous stocks ,representatives of the archaea field, isolate from the salt rock and will Zehrez el chergui in the wilaya of Djelfa. We go selected 3 stockstests of the Halobacteriaceae family ,these last characterized by the inhibiting production of the substances of types "Halocine", directed against the stock targets Sb12 ; in order to select the most active stok of production in solid medium and liquid.

The stok Sb41 it is the most active stock of production of these substances with a zone of inhibition of 18mm .Our halocine is a peptide (micro-halocine),reversible,salt-dépèndent ,heat-resisting (up to 70°C),localised in the supernatant of culture secreted with the exponontielle phase until waiting their optimum with the trasion to stationary phase.

More over this inhibiting activity east inhibits Haloarchaea and a kind of bacteria *Staphylococcus aureus* with a zone of inhibition of (11.18mm).One can say that our halocine produced