



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 البيولوجية

Département des Sciences Biologiques

## Projet de fin d'étude

En vue de l'obtention du Diplôme de Master 2

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

## Thème

# Analyse d'un travail expérimentale sur une activité halocine produite par la souche halophile P3

Présenté par: - Djaballah Meriem

- Tiabi Safaa

Déposé le : 29/09/2020.

Devant le jury composé de :

Président :	BELMAHDLM	MAA	SNV univ Djelfa
Promoteur :	BOUTAIBS.S	MCA	SNV univ Djelfa
Examineur :	CHENOUF .N. S	MAA	SNV univ Djelfa
Examineur :	KHREISAT .N	MAA	SNV univ Djelfa

2019/2020

## *Dédicaces*

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

*Je dédie ce mémoire à...*

*Mes très chers parents*

*À ma très chère mère*

*Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurais point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force*

*pour affronter les différents obstacles.*

*À me très cher frère Mohamed et mes belles sœurs*

*Souad et Nawal et abir*

*Puisse Dieu vous donner santé, bonheur, courage et surtout réussite.*

*À tous les membres de la famille*

*À mon binôme Safaa*

*À tous mes amis, surtout: Khadija et Mekki et Abdou*

*Ainsi tous les étudiants de microbiologie appliquée 2019*

**MERJEM**

## Dédicaces

*Avant tout, je remercie ALLAH, le miséricordieux, le tout puissant et le plus clément qui m'aide et me donne le courage de tout faire.*

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

*Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour,*

*Le respect, la reconnaissance...?*

*Ainsi, c'est tout simplement que*

*Je dédie ce mémoire :*

*A mes très chers parents, les prunelles de mes yeux.*

*A ma mère qui n'a jamais cessé de ménager ses efforts pour que j'atteigne ce niveau .Ni*

*sacrifices, ni privatisations ne l'ont empêché d'accomplir son devoir de mère soucieuse de l'avenir de ces enfants.*

*A mon cher papa qui a su se montrer patient, compréhensif et encourageant, sa chaleur paternelle a été et sera toujours pour moi d'un grand réconfort.*

*Veillez trouver ici, le témoignage de mon amour éternel.*

*Que dieu vous procure santé, prospérité et bonheur...*

*A mon frère Oussama, que dieu vous garde et vous protège que votre chemin soit plein succès.*

*A toute ma famille*

*A mes sœurs Hiba, Aya et Waad , pour leur aide et leur soutien que dieu vous protège et vous préserve.*

*A Narimane une personne qui a une place spéciale dans mon cœur, une grande sœur, une amie Qui a été a mes cotés tous au long de cette année qui a partagé avec moi beaucoup de choses.*

*Taïbí Safaa*

## REMERCIEMENTS

*En premier lieu, nous tenons 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 Boutaïba**, chef de spécialité de microbiologie Appliquée, Qui m'a supervisé dans une note de projet d'études de Licence, et Actuellement Promoteur dans le projet de master, il nous a consenti beaucoup de son temps et n'a ménagé aucun effort pour nous guider et pour sa disponibilité*

*Nos remerciements vont aussi à tous les membres du jury **M.BELMAHDI, M<sup>elle</sup>CHENOUF** et **M<sup>elle</sup>HREISAT** pour l'honneur qu'ils auront fait en acceptant de juger ce travail*

*Nous tenons aussi à remercier chaleureusement tous nos enseignants de l'université, qui nous ont suivis le long de nos études*

*Ainsi que toutes les personnes ayant participées de près ou de loin à la réalisation de ce travail qu'ils acceptent notre grand et sincère remerciements.*

## Liste des abréviations

ARN : acide ribonucléique

ATCC : American Type Culture Collection

DO : Densité Optique

GN : gélose nutritif

Hal : Halocine

HCl : Chlorure d'hydrogène

IR : Infrarouge

KCl : Chlorure de potassium

kDa : Kilos Dalton

KOH : Hydroxyde de potassium

MH : Mueller Hinton

MSH : Milieu Spécifique Halophile

NaBr : Bromure de sodium

NaCl: chlorure de sodium

NaOH : Hydroxyde de sodium

Nm : Nanomètre

P/V : Poids/volume

P/V: poids par volume

pH : potentiel d'hydrogène

Rpm: Rotation par minute

UV : Ultraviolet

## Liste des figures

<b>Figure01</b> : Mouvement des ions à travers la membrane cellulaire des haloarchaeas.....	<b>05</b>
<b>Figure 02</b> : Arbre phylogénétique de la vie, basé sur la séquence de gènes d'ADNr.....	<b>06</b>
<b>Figure03</b> : Effet de l'halocine H6 sur la morphologie cellulaire d' <i>Halobacterium</i> observé en microscopie électronique.....	<b>17</b>
<b>Figure04</b> : Images de microscopie électronique de cellules d' <i>Halorubrum saccharovorum</i> traitées avec l'halocine C.....	<b>18</b>
<b>Figure 05</b> : Organigramme général du travail.....	<b>19</b>
<b>Figure 06</b> : Etapes de concentration et de purification de l'halocine BP3.....	<b>21</b>
<b>Figure 07</b> : Activité sur milieu solide selon la méthode des disques d'agar.....	<b>23</b>
<b>Figure 08</b> : Activité dans le milieu liquide selon la méthode des puits de diffusion sur gélose...	<b>23</b>
<b>Figure 09</b> :Profil d'élution du composé BP3 après chromatographie sur gel de séphadex G-75....	<b>25</b>
<b>Figure 10</b> : Profil électro phorétique de l'halocine BP3.....	<b>26</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Les principales différences entre les trois domaines de la vie.....	<b>07</b>
<b>Tableau 2</b> : Propriétés biochimiques d'halocines produites par différentes espèces d'haloarchaea.....	<b>09</b>
<b>Tableau 3</b> : Degré de pureté du composé BP3 durant les étapes de purification.....	<b>25</b>
<b>Tableau 4</b> :Caractérisation partielle de l'halocine BP3.....	<b>27</b>

## SOMMAIRE

Liste des abréviations .....	
Liste des tableaux.....	
Liste des figures.....	
<b>Introduction.....</b>	<b>01</b>
<b>CHAPITER I: Synthèse bibliographique</b>	
1 Généralités sur les haloarchaea.....	03
1.1 Caractéristiques des haloarchaea.....	03
1.2 Facteurs influençant la croissance des haloarchaea.....	05
1.3 Adaptation des haloarchaeas en milieux hypersalins.....	05
1.4 Diversité des archaea halophiles .....	06
2 Halocines .....	08
2.1 Généralités.....	08
2.2 Description de quelques molécules d'halocines.....	08
2.2.1 Halocine H4.....	08
2.2.2 Halocine H1.....	10
2.2.3 Halocine H6.....	10
2.2.4 Halocine SH10 .....	11
2.2.5 Halocine S8 .....	11
2.2.6 Halocine R1 .....	12
2.2.7 Halocine C8.....	12
2.2.8 Halocine A4 .....	13
2.2.9 Halocine Sech7a.....	13
2.2.10 Halocine KPS1 .....	13
2.2.11 Halocine HA1 et HA3 .....	14
2.3 Applications des halocines.....	14
3. Rôle écologique des halocines .....	15
3.1. rôle des halocines dans l'environnement .....	15
4. Mécanismes d'action des halocines .....	16
5. Spectre d'activité.....	18
6. Production des halocines .....	18
<b>CHAPITER II: Analyse d'un travail expérimental</b>	
1- Introduction.....	19
2 Principales étapes du travail expérimental.....	20
2.1 Souches utilisées.....	20
2.2 Mise en évidence de l'activité halocine.....	20
2.3 Production de l'halocine BP3.....	20
2.4 Concentration et Purification de l'halocine BP3.....	20
2.5 Caractérisation partielle de l'halocine BP3.....	21
<b>CHAPITER III: Analyse des principaux résultats</b>	
1 Nature de l'agent antibactérien.....	22
2 Mise en évidence de l'activité halocine.....	22
3 Purification de l'halocine BP3.....	24
4 Caractérisation partielle de l'halocine BP3 .....	27
<b>Conclusion .....</b>	<b>28</b>
<b>Références</b>	

# **Introduction**

### Introduction :

Les microorganismes sont présents partout dans la nature, mais les halophiles ou amoureux du sel existent dans des environnements salins. Ces environnements sont omniprésents et se propagent principalement en raison de l'irrigation, des précipitations et de la sur utilisation de l'eau. Les micro-organismes halophiles peuvent appartenir à des procaryotes ou à des eucaryotes. Parmi les procaryotes, les bactéries halophiles nécessitant généralement 3 à 15% de NaCl, alors que les archées halophiles (haloarchaea) nécessitent une salinité plus élevée (> 12% de NaCl). Le besoin de la concentration de sel pour une croissance optimale varie entre les différents micro-organismes halophiles (**OREN, 2002**).

Plusieurs classifications ont été proposées pour ces halophiles dont la plus importante est celle proposée par KUSHNER et KAMEKURA en 1998. Sur la base de l'exigence en NaCl pour leur croissance, les micro-organismes halophiles sont divisés en trois catégories: légèrement halophiles (1 - 3%), modérément halophiles (3 - 15%) et halophiles extrêmes qui exigent entre 15 et 30% de NaCl pour leur bonne croissance. Les non-halophiles sont ceux qui poussent en absence de NaCl, mais qui peuvent tolérer des concentrations élevées en sel et sont nommés halotolérants.

Cependant les haloarchaea font partie d'un autre domaine les Archaea. La plupart de ses membres contiennent des pigments dérivés d'isoprénoïdes au niveau de leurs membranes cellulaires conduisant à diverses pigmentations caractéristiques telles que l'orange et le rouge et quelles les fournissent à leur milieux de croissance. (**OREN et RODRIGUEZ-VALERA, 2001**).

Les formes des cellules d'haloarchaea sont diverses, telles que les bâtonnets et les cocci mais parfois sont inhabituelles, en forme triangulaires, cylindriques et carrés. Ils sont donc pléomorphes, en particulier lorsqu'ils sont cultivés dans des conditions non optimales. (**DASSARMA et ARORA *al*, 2001 ; HEZAYEN et *al.*, 2001**).

Les Archaea halophiles extrêmes produisent des substances protéiques 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'halocines 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

## Introduction

---

soit: H4, H6 et H1. Toutefois les deux micro-halocines restantes s'avèrent de petit poids moléculaires 3 KDa pour S8 et moins de 2.5KDa pour l'halocine R1(**BOUKTIT, 2003**).

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

- S'il est possible de la produire 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.

Le présent travail est une synthèse bibliographique qui met l'accent sur l'intérêt des haloarchaea pour la production de molécules biologiquement actives en particulier les halocines.

Le travail est subdivisé en deux parties:

La première partie représente une revue bibliographique non exhaustive comprenant des généralités sur les haloarchaea et sur les halocines qu'elles produisent.

La deuxième partie consiste en une analyse d'un travail expérimental sur les halocines.

# Chapitre I :

# Synthèse bibliographique

*Mer Morte, lac Assal, lac Rose, marais salants: dans ces milieux où la concentration en sel dépasse souvent dix fois celle de l'eau de mer prolifèrent des colonies entières de bactéries*

*Or on a appris Qu'une cellule « normale » plongée dans un milieu trop salé perd son eau et finit par mourir de déshydratation.*

*Chez les bactéries « halophiles », cette règle semble inversée: elles meurent si la concentration en sel n'est pas suffisante.*

*Quel est leur secret ?*

### 1. Généralités sur les haloarchaea

#### 1.1 .Caractéristiques des haloarchaea

Les caractéristiques morphologiques des haloarchaea sont fortement affectées par les conditions de croissance en comparaison avec les bactéries. Les membres des haloarchaea varient selon la taille et la forme des cellules (0,8-13  $\mu\text{m}$ ) et qui ont généralement des formes pléomorphes telles que la forme allongée, ronde, disque et trapèze. La forme et la taille de la cellule dépendent de la disponibilité des nutriments, du niveau de la salinité et de la force ionique dans les environnements hyper salins. Les haloarchaea sont généralement considérés comme des Gram négatifs, sauf halococci. Les membres du genre *Natronococcus* ont un Gram variable caractéristique. La plupart des espèces d'*Haloferax* et d'*Haloarcula* sont généralement de nature pléomorphe (OREN et al., 2009). La majorité des haloarchaea sont aérobies strictes, mais peu sont également capables de survivre dans des conditions anaérobies en utilisant la nitrate, l'arginine, le sulfure de diméthyle (DMSO), etc. présents dans leur environnement (ENACHE et al., 2007; BONETE et al., 2015).

Les haloarchaea sont généralement résistants à la plupart des antibiotiques tels que la pénicilline, la kanamycine, l'érythromycine, l'ampicilline, etc. Cependant, ils sont généralement sensibles à la novobiocine, un puissant inhibiteur de l'ADN gyrase, et la bacitracine qui interfère avec la déphosphorylation du bactérioprénol, une molécule membranaire, et inhibe également la biosynthèse des lipides. Il est a noté que certains haloarchaeas, comme *Halococcus saccharolyticus*, sont résistants à la novobiocine.

Les haloarchaea non coccoïdes sont généralement lysés en présence des acides biliaire qui se lient aux glycoprotéines de la membrane cellulaire menant à la rupture de la membrane, et par conséquent, à la lyse des cellules. Les acides biliaires sont utilisés pour différencier les Archaeas halophiles des bactéries (OREN, 2002).

Plusieurs membres des haloarchaea sont pigmentés en raison de la présence de pigments caroténoïde dans leur membrane cellulaire. Les pigments caroténoïdes sont des biomolécules protéiques hydrophobes qui protègent la cellule contre les dommages causés par le rayonnement ultraviolet (RODRIGOBANOS et al., 2015). Les caroténoïdes sont divisés en carotène et en xanthophylles. (RIVERA et CANELA-GARAYOA, 2012).

La plupart des membres produisent du caroténoïde C50comme la bactériorubérine. D'autres pigments sont également produits tels que le lycopène et le phytoène (RODRIGO-BAÑOS et al., 2015). Le taux de salinité dans un environnement hypersalin affecte

la production des pigments. Les espèces d'*Haloferax*, par exemple, *Haloferax mediterranei*, deviennent plus pigmentées à une salinité de 15 %, alors qu'une salinité plus élevée (plus de 25 % de NaCl) réduisait la pigmentation en raison de la baisse de la production des pigments caroténoïdes (OREN, 2006).

Les membres des haloarchaea contiennent principalement quatre types de pigments rétiniens, il s'agit de la bactériorhodopsine, l'halorhodopsine et les rhodopsines sensorielles I et II localisés au niveau de la membrane plasmique. La bactériorhodopsine est une protéine transmembrane de 27 kDa qui capture la lumière verte (500–570 nm) et génère un gradient de protons en expulsant les H<sup>+</sup> hors de la cellule conduisant à l'énergie chimique avec la formation de molécules ATP.

Par conséquent, les haloarchaea contenant de la bactériorhodopsine sont capables de croître en présence de faibles quantités de nutriments dans leurs environnements en utilisant la lumière comme source d'énergie. Le deuxième pigment rétinien est l'halorhodopsine, qui est une protéine transmembranaire. Son absorption est maximale entre la lumière verte et jaune et permet l'influx des ions halogénures (Cl<sup>-</sup>) à l'intérieur de la cellule pour maintenir l'équilibre osmotique. La structure de l'halorhodopsine a été initialement élucidée à partir de *Halobacterium salinarum*. Elle présente des propriétés structurales similaires à ceux de la bactériorhodopsine (ESSEN, 2002). Deux rhodopsines sensorielles (I et II) responsables du phototaxi. Ce sont des protéines transmembranaires elles ont été étudiées chez *Halobacterium salinarum* et *Natronomonas pharaonis*. le type I absorbe dans vert, tandis que le type II absorbe la lumière bleue et régule le mouvement des flagelles (SPUDICH et LUECKE, 2002; KLARE et al., 2008).

Plusieurs membres des haloarchaea contiennent des flagelles qui sont fonctionnellement similaires et structurellement différents des flagelles bactériens. Ils sont composés de sous-unité de protéine connue sous le nom de flagelline (SYUTKIN et al., 2014). *Halobacterium salinarum* et *Haloferax mediterranei* produisent les vésicules de gaz à l'intérieur des cellules. Ces vésicules de gaz sont utiles pour les Archaea halophile strictement aérobie. Les vésicules de gaz sont formées à partir des composants protéiques et remplis d'air afin d'assurer la flottabilité des cellules et surmonter ainsi le stress de l'oxygène dans les lacshypersalins (PFEIFER, 2015). Les membrane cellulaire des haloarchaea contiennent une variété de lipides avec des liaisons éther entre les hydrocarbures isoprénoïdes, tandis que les liaisons ester entre les acides gras sn-glycérol-3-phosphate se trouvent chez les bactéries et les eucaryotes (JAIN et al., 2014).

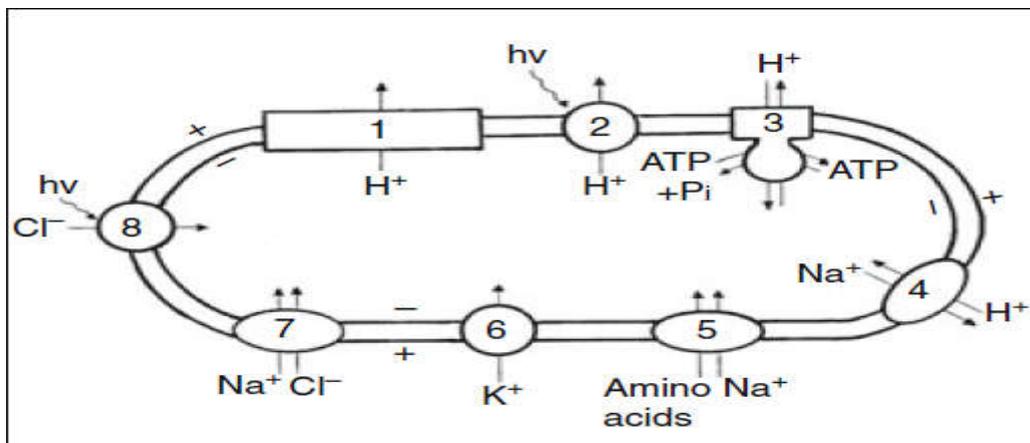
### 1.2. Facteurs influençant la croissance des haloarchaea

La concentration en sels, le pH et la température sont les principaux facteurs influençant la croissance des haloarchaea dans les milieux hyper salins. La concentration du sel détermine la répartition des espèces d'haloarchaea.

### 1.3 .Adaptation des haloarchaea en milieux hypersalins

Pour faire face à la pression osmotique élevée de leurs environnements hyper salés, le cytoplasme des haloarchaea contient des fortes concentrations molaires d'ions, en particulier  $K^+$  et  $Cl^-$ , avec des concentrations souvent considérables de  $Na^+$  étant rapporté. Par cette stratégie d'accumulation de sel, la cellule fait l'équilibre entre le milieu extérieur et le milieu intérieur (OREN, 2006b).

La composition ionique particulière du cytoplasme et la formation des gradients de concentration membranaire sont les résultats de l'action coopérative de différentes pompes ioniques, des anti pores et des protéines de transport dont les plus importants sont résumés dans la (figure 01) (OREN, 2006a).

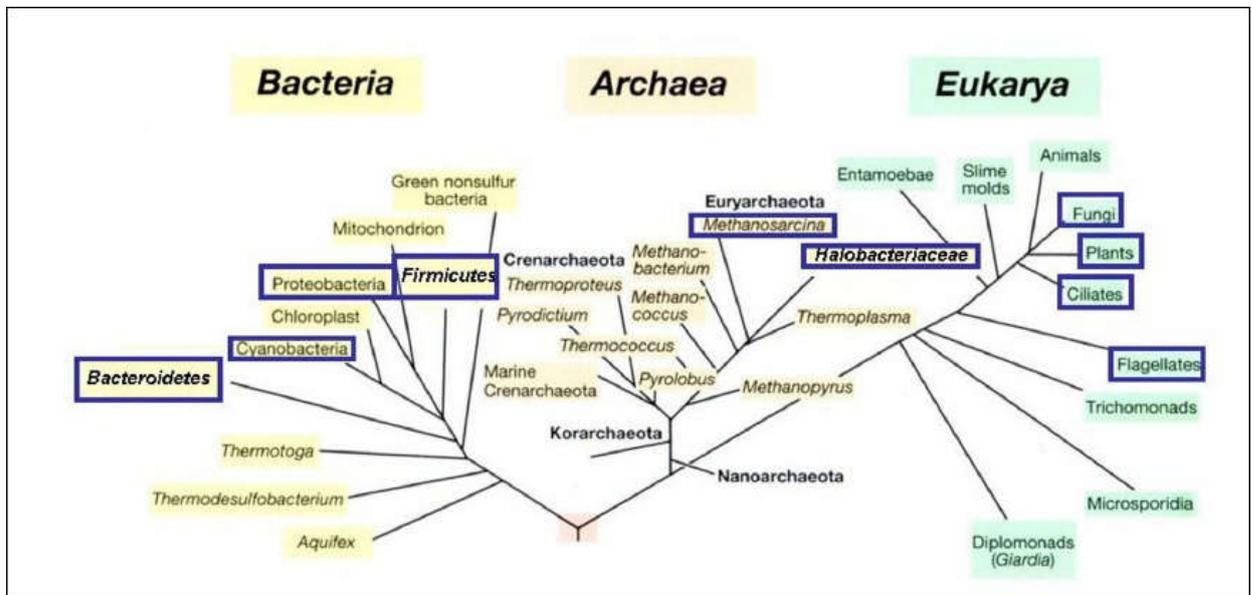


**Figure 01** : Le mouvement des ions à travers la membrane cellulaire des haloarchaea. 1 : l'extrusion des protons par l'intermédiaire de transport d'électrons respiratoires. 2 : la lumière est entraînée par l'extrusion de protons médiée par la bactériorhodopsine ; 3 : le gradient de protons permet la formation d'ATP par l'ATP synthase. 4 : électrogénique antiporteur proton /sodium. 5 : gradient de sodium conduit au transport des acides aminés vers l'intérieur. 6 : uniport de potassium conduit par le potentiel membranaire. 7 : système de transport de chlorure, lumière indépendant, probablement couplée avec le transport de sodium vers l'intérieur. 8 : halorhodopsine, la pompe primaire de chlorure conduite par la lumière (OREN, 2006a)

### 1.4 .Diversité des archaea halophiles

Les archaea halophiles sont inclus dans le phylum *Euryarchaeota*. Ils sont représentés par les archaea aérobie extrêmement halophiles, également désigné comme halobacteria, actuellement inclus dans la classe des *Halobactéries*. Cependant, certaines espèces méthanogènes halophiles isolées à partir des environnements hypersalins ont été décrites (RAFAEL *et al.*, 2011).

Taxonomiquement les archaea méthanogènes sont regroupés au sein de cinq ordres, mais seulement l'ordre *Méthanosarcinales* comprend des espèces halophiles (figure 2). Ils sont placés au sein de la famille *Methanosarcinaceae*. Ils sont strictement anaérobies et obtiennent de l'énergie par la formation de méthane. Ils peuvent se développer par dissimulation des composés méthyliques (méthanol, les amines méthyle, ou des sulfures de méthyle). Les genres suivants comprennent des espèces extrêmement ou modérément halophiles: *Methanohalobium*, *Methanohalophilus* et *Methanosalsum* (RAFAEL *et al.*, 2011).



**Figure 02** : L'arbre phylogénétique de la vie, basé sur la séquence de gènes d'ADNr, les groupes encadrés présentent au moins un halophile (OREN, 2008)

Tableau 1 : Les principales différences entre les trois domaines de la vie (PRESCOTT *et al.*, 2010)

Propriétés	Bacteria	Archaea	Eucarya
Noyau entouré d'une membrane, avec nucléole	Absent	Absent	Présent
Organites membranaires internes complexes	Absents	Absents	Présents
Paroi cellulaire	Presque toujours faite de peptidoglycane contenant de l'acide muramique	Divers types, pas d'acide muramique	Pas d'acide muramique
Lipides membranaires	Acides gras à chaînes droites et liaisons ester	Chaînes aliphatiques ramifiées et liaisons éther	Acides gras à chaînes droites et liaisons ester
Vacuoles gazeuses	Présentes	Présentes	Absentes
ARN de transfert	Présence de thymine dans la plupart des ARNt : l'ARNt initiateur porte une N-formylméthionine	Pas de thymine dans le bras T ou T $\psi$ C de l'ARNt : l'ARNt initiateur porte une méthionine	Présence de thymine : l'ARNt initiateur porte une méthionine
ARNm polycistroniques	Présents	Présents	Absents
ARNm avec introns	Absents	Absents	Présents
ARNm épissés, avec coiffe et queue polyA	Absents	Absents	Présents
<b>Ribosomes :</b>			
Taille	70S	70S	80S(ribosomes cytoplasmiques)
Sensibilité au chloromphénicol et à la kanamycine	Sensible	Insensible	Insensible
Sensibilité à l'anisomycine	Insensible	Sensible	Sensible
<b>ARN polymérase ADN dépendante :</b>			
Nombre d'enzymes	Une	Une	Trois
Structure	Modèle sous unitaire simple (six sous unités)	Modèle sous unitaire complexe semblable aux enzymes eucaryotes (8-12 sous unités)	Modèle sous unitaire complexe (12-14 sous-unités)
Sensible à la rifampicine	Sensible	Insensible	Insensible
Promoteurs de type polymérase II	Absent	Présent	Présent
<b>Métabolisme :</b>			
ATPase similaire	Non	Oui	Oui
Méthanogenèse	Absente	Présente	Absente
Fixation de l'azote	Présente	présente	Absente
Photosynthèse chlorophyllienne	Présente	Absente	Présente <sup>a</sup>
Chimiototropie	Présente	Présente	Absente
<sup>a</sup> présente dans les chloroplastes (d'origine bactérienne)			

### 2 .Halocines :

#### 2.1. Généralités

Les halocines sont les protéines antimicrobiennes protéiques/peptides (AMP) sécrétées par plusieurs membres de l'haloarchaea appartenant à la classe des halobactéries. La plupart des haloarchaea produisent une halocine optimale pendant la transition de la phase exponentielle à la phase stationnaire. L'exception est l'halocine H1 dont la production est jugée maximale à phase moyennement exponentielle et reste stable jusqu'à la phase stationnaire (SHAND et LEYVA, 2007; BESSE et al., 2015). Peu de membres de l'haloarchaea, p. ex., *Haloferax mediterrané*, baisse de leur niveau d'halocine au cours de la phase stationnaire. Par conséquent, la production d'halocine est associée à la croissance, et il peut être utilisé comme modèle permettant d'étudier l'expression de l'halocine dépendante de la phase (CHEUNG et al., 1997; PRICE et SHAND, 2000). Sur la base de l'étude de l'antagonisme, des centaines de types différents de les halocines devraient être présents dans la nature, mais peu d'halocines ont été caractérisés jusqu'à la date (GHANMI et al., 2016). Les propriétés biochimiques des différentes halocines sont résumées dans le tableau 2 et les mises à jour récentes concernant les halocines (producteurs appartenant au phylum Euryarchaeota) et aux sulfolobocins (producteurs appartenant au phylum Crenarchaeota) sont décrites.

#### 2.2 .Description de quelques molécules d'halocines

**2.2.1. Halocine H4 :** C'est la première halocine étudiée produite à partir de *Haloferax mediterrané* R4 (ATCC33500), isolée à partir d'un marais salant à Alicante en Espagne (RODRIGUEZ-VALERA et al., 1981; MESEGUER et RODRIGUEZ-VALERA, 1985). Le poids moléculaire de l'halocine H4 est de 39,6 kDa. L'activité a d'abord été détectée lorsque la culture a commencé sa transition vers la phase stationnaire qui est dépendante du sel et sensible aux protéases et aux températures élevées. L'activité antimicrobienne de l'halocine H4 disparaît à 60°C (pendant 24 h), à 70 °C (pendant 4 h) et à 80 °C (pendant 30 min) (O'CONNOR et SHAND, 2002). L'activité de l'halocine demeure stable à plus de 15 % de NaCl (RODRIGUEZ-VALERA et al., 1982). L'halocine H4 inhibe de nombreux membres des haloarchaea comme *Halobacterium salinarium* CCM2090 et présente plusieurs caractéristiques des protéines halophiles, notamment une forte teneur en acides aminés chargés négativement, en particulier l'aspartate, une faible teneur en lysine et une forte teneur en résidus non sulfureux (proline, glycine, valine et thréonine). Elle possède des fragments hydrophobes de 32 acides aminés (résidus 178-209) (CHEUNG et al., 1997).

Tableau 2: Propriétés biochimiques d'halocines produites par différentes espèces d'haloarchaea(VIJAYet SANTOSH, 2019)

Halocine	Microorganisme producteur	Source	Propriétés
A4	Strain TuA4	marais salants, Tunisie	7435 Da; >100 C; no; broad; ND; ND
C8	<i>Halobacterium</i> strain AS7092	Great Chaidan, lac salé en Chine	6.3 kDa; >100 C; no; broad; proteinase K; ND
G1	<i>Halobacterium</i> strain GRB	marais salants, France	ND; ND; ND; broad; ND; ND
H1	<i>Haloferax mediterranei</i> M2a (or Xai3)	marais salants, Alicante, Espagne	31 kDa; <50 C; yes; broad; ND; membrane permeability
H2	<i>Haloarchaeon</i> Gla2.2	marais salants, Alicante, Espagne	ND; ND; ND; broad; ND; ND
H3	<i>Haloarchaeon</i> Gaa12	marais salants, Alicante, Espagne	ND; ND; ND; broad; ND; ND
H4	<i>Haloferax mediterranei</i> R4	marais salants, Alicante, Espagne	34.9 kDa; <60 C; partially; narrow; ND; proton flux
H5	<i>Haloarchaeon</i> Ma2.20	marais salants, Alicante, Espagne	ND; ND; ND; narrow; ND; ND
H6/H7	<i>Haloferax gibbonsii</i> Ma2.39 or Alicante SPH7	marais salants, Alicante, Espagne	32 kDa; <90 C; no; narrow; Pronase; Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> Antiporter inhibitor
R1	<i>Halobacterium</i> strain GN101	marais salants, Mexico	3.8 kDa; <93 C; no; broad; proteinase K; ND
S8	Strain S8a	Grand lac salé, Utah, USA	3.58 kDa; >100 C; no; broad; proteinase K; ND
KPS1	<i>Haloferax volcanii</i> KPS1	Kovalam saltern, India	ND; <80 C; ND; broad; proteinase K and trypsin; ND
Sech7a	<i>Haloferax mediterranei</i> Sech7a	Secovlje marais salants, Slovenie	10.7 kDa; <80 C; yes; narrow; ND; ND
SH10	<i>Natrinema</i> sp. BTSH10	Salt pan, Kanyakumari, Tamil Nadu, Inde	20 kDa; <50 C; ND; ND; ND; ND
HA1	<i>Haloferax larsenii</i> HA1	Pachpadra salt lake, Rajasthan, Inde	14 kDa, >100 C; yes; narrow; proteinase K;
HA3	<i>Haloferax larsenii</i> NCIM5678 (HA3)	Pachpadra salt lake, Rajasthan, Inde	13 kDa, >100 C; yes; narrow; proteinase K;

ND: Non déterminé

**2.2.2. Halocine H1 :** Elle a été purifiée à partir de la souche *Haloferax mediterranei* M2a (auparavant Xia3) isolée dans des marais salants à Santa Pola (Alicante, Espagne) (RODRIGUEZ-VALERA et al., 1981; PLATAS et al., 2002). Le poids moléculaire de halocine H1 est de 31 kDa. La production optimale d'halocine H1 se produit lorsquela culture rentre dans la phase stationnaire à 20 % de NaCl, 37°C et 220 tr/min. son activité reste stable dans la phase stationnaire. Comme l'halocine H4, L'activité antimicrobienne de l'halocine H1 est sensible à une température plus élevée et dépendante du sel. L'halocine H1 est stable jusqu'à 50 °C seulement et nécessite un minimum de 6 % de NaCl pour l'activité (O'CONNOR et SHAND, 2002; PLATAS et al., 2002).

La dialyse du surnageant actif contre des concentrations plus faibles de sel a entraîné une diminution immédiate dans son activité et ne peut être rétablie par dialyse contre la solution saline initiale. L'activité a été complètement réduite dans les 7 jours suivant la dialyse contre l'eau (PLATAS et al., 2002). L'effet de dessalement dénature irréversiblement l'activité de l'halocine qui peut être due à une perturbation de la structure tridimensionnelle de l'halocine H1 (TORREBLANCA et al., 1989; PLATAS et al., 2002; PASIC et al., 2008; KAVITHA et al., 2011). La plupart des propriétés de l'halocine H1 sont communes à l'halocine H4 tels que les deux sont produites à partir de *Haloferax mediterranei* isolées des marais salants espagnols et leurs tailles sont supérieures à 30 kDa. Toutes ces propriétés communes suggèrent que les deux sont liés ou pourraient même être la même halocine (SHAND et LEYVA, 2007). L'halocine H1 n'inhibe pas la croissance des eubactéries halotolérantes, mais a démontré un large éventail de spectre antimicrobien contre les souches d'haloarchaea (PLATAS et al., 2002).

**2.2.3. Halocine H6 :** Elle est produite à partir de *Haloferax gibbonsii* Ma2.39 isolé des étangs salés espagnols d'Alicante (TORREBLANCA et al., 1989). Un mutant sur exprimant l'halocine a été nommée *Haloferax gibbonsii* Alicante SPH7. L'halocine produite par la souche SPH7 a été désignée halocine H7 (TORREBLANCA et al., 1989; LEQUERICA et al., 2006). Le poids moléculaire de l'halocine H6 est de 32 kDa. Semblable à l'halocine H4, la production d'halocine H6 atteint le niveau maximal lors de la transition de la phase exponentielle à la phase stationnaire (TORREBLANCA et al., 1989). L'halocine H6 est résistante à la chaleur et active jusqu'à 90 °C, mais son activité est réduite à 50 % à 100 °C et complètement perdue à la température d'autoclavage. La trypsine, même à une concentration de 5 mg/ml, ne dénature pas l'activité de l'halocine (TORREBLANCA et al., 1989). Le fait intéressant, est que l'halocine H6 est capable d'inhiber l'échangeur d'hydrogène-sodium (NHE) présent dans la membrane cellulaire de l'haloarchaea et de la cellule eucaryote, mais elle n'a pas été testée contre des bactéries pour l'inhibition de l'NHE (LEQUERICA et al., 2006).

La séquence d'acides aminés de l'halocine H6 n'a pas été déterminée (**TORREBLANCA et al., 1989; PLATAS et al., 2002**). Meseguerémis l'hypothèse selon laquelle l'halocine H6 mature serait en fait un peptide de 3 kDa libéré par une protéine précurseur, mais les données expérimentales à l'appui de cette hypothèse ne sont pas encore disponibles (**SHAND et LEYVA, 2007**).

**2.2.4. Halocine SH10 :** Elle est produite par *Natrinema* sp. BTSH10 isolée du lac de Kanyakumari en Inde. Son poids moléculaire est de 20 kDa. La production de l'halocine atteint son niveau optimal au cours de la transition vers la phase stationnaire de croissance de la souche productrice incubée à 42°C, pH 8,0 et une agitation de 200 tr/min dans le milieu de Zobell contenant du NaCl à 3 M (**KARTHIKEYAN et al., 2013**). L'halocine SH10 montre une activité antimicrobienne contre les isolats halophiles de du même lac salé et particulièrement contre *Halorubrum* sp. BTSH3. La nature protéique de l'activité antimicrobienne de l'halocine SH10 n'a pas été décrite (**KARTHIKEYAN et al., 2013; BESSE et al., 2015**).

**2.2.5. Halocine S8 :** C'est la première halocine peptidique (microhalocine) produite par la souche haloarchaea S8 non caractérisée et isolée du Grand Lac Salé dans l'Utah aux États-Unis (**PRICE et SHAND, 2000**). Le poids moléculaire de l'halocine S8 est de 3,58 kDa. Semblable à l'halocine H4 et H6. Sa production atteint son maximum au passage à la phase stationnaire de croissance. Elle est thermostable, sensible à la protéinase K mais résistante à la trypsine. En outre elle est indépendante du sel (**PRICE et SHAND, 2000**). L'halocine dessalée conserve son activité et reste stable pendant un mois à 4°C. L'halocine S8 présente un spectre inhibiteur étroit. En effet elle inhibe la croissance uniquement de *Halobacterium salinarum* NRC817, *Halobacterium* sp. souche GRB et *Haloferax gibbonsii* (**PRICE et SHAND, 2000**). La séquence complète de l'halocine S8 (résidus de 36 acides aminés) a été révélée par la méthode de dégradation d'Edman. La plupart des résidus se composent de quatre résidus de cystéine le long de la séquence qui peuvent former des ponts disulfure. L'information concernant sa structure tertiaire n'est pas disponible. Cependant, L'analyse par BLAST de la séquence n'a révélé aucune homologie avec d'autres séquences disponibles dans la base de données (**SHAND et LEYVA, 2007; BESSE et al., 2015**).

**2.2.6. Halocine R1 :** C'est la deuxième microhalocine étudiée produite par *Halobacterium salinarum* GN101, isolée à partir d'un marais salant au Guerrero Negro en

Mexique, par Barbara Javor (**EBERT et al., 1986**). Le poids moléculaire de l'halocine R1 est de 3,8 kDa. Sa production atteint son maximum au cours de la transition vers la phase stationnaire de croissance de la souche productrice. elle est résistante jusqu'à 60°C pendant 24 h, mais perd son activité après un traitement à 93°C pendant 5 min. L'activité de l'halocine R1 est résistante au dessalage et aux enzymes protéolytiques comme la papaïne, la trypsine et la thermolysine, mais elle est sensible à la protéinase K, la pronase et l'élastase (**BESSE et al., 2015**). La séquence complète de l'halocine R1 a été déterminée avec 38 acides aminés dont à 63 % sont identiques et à l'halocine S8 (**O'CONNOR et SHAND, 2002; PRICE et SHAND, 2000**). L'halocine R1 est signalée être archaéostatique, comme le suggèrent (RDESTet **STURM, 1987**). sa séquence est disponible dans la base de données GenBank sous le numéro d'accès EU080936. Les deux halocine S8 et R1 sont capables d'inhiber la croissance des espèces de *Sulfolobus*, alors que l'halocine R1 peut également inhiber *Methanosarcina thermophila* (**HASELTINE et al., 2001; BESSE et al., 2015**).

**2.2.7. Halocine C8 :** C'est la plus grande molécule de la famille des microhalocines produite par Haloarchaeon *Natrinema sp.* AS7092 (anciennement *Halobacterium* souche AS7092), isolée du grand lac salé Chaidan en Chine (**LI et al., 2003; SUN et al., 2005**). Le poids moléculaire de l'halocine est de 7,44 kDa. Le gène responsable de la production de l'halocine est signalé dans cinq autres Espèce de *Natrinema* isolée des marais salants d'Ichekaben en Algérie (**IMADALOU IDRES et al., 2013**). La production de l'halocine au niveau de la transition phase exponentielle - phase stationnaire de la croissance, et l'activité reste stable pendant toute la phase stationnaire (**SUN et al., 2005**). L'halocine C8 est thermostable jusqu'à 100°C pendant 1 h et sans sel. L'halocine dessalée peut être stocké pendant plus d'une année à 20°C sans perdre l'activité. En plus cette activité reste inchangée après le traitement avec divers solvants organiques tels que le méthanol, l'éthanol et l'acétonitrile. Elle est sensible à la protéinase K et à la papaïne, mais résistante à la trypsine. Ces propriétés font de l'halocine C8 un peptide de nature robuste (**LI et al., 2003**). L'halocine C8 ne peut inhiber les bactéries, alors qu'il montre un spectre inhibiteur plus large contre différentes souches d'haloarchaea. En effet elle a inhibé la croissance de 16 des 21 souches d'haloarchaea comprenant *Natronobacterium gregoryi*, *Natronobacterium magadii* et *Natronomonas pharaonis* (**LI et al., 2003**). la séquence de l'halocine C8 est riche en cystéine (dix résidus de cystéine) qui peuvent former des ponts de disulfure responsables de la grande stabilité de l'activité de l'halocine C8 dans différentes conditions (**LI et al., 2003; SUN et al., 2005**).

**2.2.8. Halocine A4 :** Elle est produite par une souche d'haloarchaea non caractérisée TuA4 isolée du marais salant en tunisie (SHAND et LEYVA, 2008). Auparavant, l'halocine A4 a également été désigné halocine U1. Son poids moléculaire est de 7,4 kDa. Son activité est indépendante du sel et thermostable. Elle est résistante à la température d'ébullition jusqu'à une semaine (SHAND et LEYVA, 2007; SHAND et LEYVA, 2008). Comme l'halocine C8, Elle a la même masse moléculaire et une stabilité similaire. Elle montre un large spectre d'inhibition contre d'autres haloarchaeas comme *Sulfolobus solfataricus* (hyperthermophile crenarchaeal) (Haseltine et al. 2001). Le Séquençage N-terminal de l'halocine A4 a révélé une identité de 75 % à l'halocine C8, ce qui suggère qu'il s'agit d'une variante de cette dernière (SHAND et LEYVA, 2008).

**2.2.9. Halocine Sech7a :** Elle est produite par *Haloferax mediterranei* Sech7a, isolée d'un marais salant de l'Adriatique en Slovénie. Son poids moléculaire est de 10,7 kDa. La production de l'halocine commence lorsque les cellules entrent dans la phase exponentielle de croissance (30 h) et atteint le niveau maximum au début de la phase stationnaire (40 h) cultivée à 45°C et à pH de 7,0 à 7,5 et 20 % de NaCl (PASIC et al., 2008). Elle est assez stable dans une vaste gamme de pH de 2,0 à 10,0 et thermostable jusqu'à 80°C. L'activité est restée inchangée à 6% de NaCl, mais le dessalage réduit d'avantage l'activité. Celle-ci peut être rétablie jusqu'à ~40% de l'activité initiale (BESSE et al., 2015).

**2.2.10. Halocine KPS1 :** elle est produite par *Haloferax volcanii* KPS1, isolée à partir d'un lac à Kanyakumari en Inde. La croissance et la production de l'halocine ont fait l'objet d'une surveillance à 25 % de NaCl, à 40°C et à un pH de 7,0 (KAVITHA et al., 2011). La production de la molécule commence au milieu de la phase logarithmique à 48 h et atteint son maximum (120 AU/mL) à la phase stationnaire de croissance à 72 h, et persiste jusqu'à 120 h; par la suite, l'activité diminue (40 AU/ml) à 144 h. Cette activité est thermostable et réduite aux températures supérieures à 80°C. Elle est stable sur une large plage de pH de 3,0 à 9,0. L'activité disparaît après le traitement avec les enzymes protéolytiques telles que la protéinase K et la trypsine indiquant la nature protéique du composé inhibiteur. L'halocine KPS1 présente une activité inhibitrice contre les bactéries Gram positif et Gram négatif comme *Bacillus subtilis* MTCC1134, *Streptococcus mutans* MTCC896, *Staphylococcus aureus* MTCC916, *Escherichia coli* MTCC1671 et *Pseudomonas aeruginosa* MTCC6538, respectivement. Elle montre aussi une forte activité antimicrobienne contre *Halobacterium sodomens* S2 (KAVITHA et al., 2011; BESSE et al., 2015).

**2.2.11. Halocine HA1 et HA3 :** Ces halocines ont été produites par *Haloferaxlarsenii* HA1 et HA3 isolées du lac salé de Pachpadra au Rajasthan, en Inde. Elles ont été purifiées par ultrafiltration, Une chromatographie échangeuse d'anions(AEC), Une chromatographie par filtration sur gel (GFC) et enfin par une chromatographie liquide haute performance en phase inverse (HPLC RP). L'halocine HA1 purifiée est stable jusqu'à 80°C et perd 50% de son activité à 100 et 121°C. Cependant l'activité de l'halocine HA3 est réduite jusqu'à 88 % à 100°C et à 94 % à 121°C. Les deux molécules sont actives à pH de 4,0 à 12,0 et pH de 2,0 à 10,0, respectivement, ce qui suggère leur stabilité sous la plage de pH acide et basique. L'activité des deux halocines HA1 et HA3 n'a pas été affectée par le méthanol, l'éthanol, l'isopropanol, le Tween-80 et le Triton X-100, mais une perte complète de l'activité est enregistrée après le traitement avec la trypsine et la protéinase K. Les deux halocines sont dépendantes exigeant au moins 10 % de NaCl. Leur Poids moléculaires sont très proches ~14 et ~13 kDa, respectivement. L'analyse de la séquence par MALDI-TOF MS/MS analyse des halocines HA1 et HA3 n'a montrée aucune homologie avec les halocines connus dans la base de données NCBI. L'analyse des séquences N-terminal des deux halocines HA1 et HA3 par Blastp (NCBI) a montré que l'halocine HA3 est identique à une protéine hypothétique de *Halogeometricum pallidum*. Cependant l'halocine HA1 n'a montré aucune homologie significative avec des protéines connues, (KUMAR et al., 2016; KUMAR et TIWARI, 2017a, b).

### 2.3. Applications des halocines:

Les halocines sont les composés antimicrobiens naturels qui peuvent contrôler la croissance des haloarchaea dans les produits alimentaires salés; par conséquent, elles peuvent avoir une utilisation potentielle dans l'industrie alimentaire comme agents de conservation (CHARLESWORTH et BURNS, 2016). Les halocines comme HA1, HA3 (KUMAR and TIWARI, 2017a, b), Sech7a(PASIC et al., 2008), H4 (MESEGUER et RODRIGUEZ-VALERA, 1985), H6 (TORREBLANCA et al., 1989), C8 (LI et al., 2003) et SH10 (KARTHIKEYAN et al., 2013) lysent les cellules cibles (O'CONNOR et SHAND, 2002; SUN et al., 2005; PASIC et al., 2008; KARTHIKEYAN et al., 2013). Actuellement, l'halocine H6 est la seule archéocine qui exerce un effet inhibiteur spécifique sur l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  existant dans les deux types de cellules haloarchaea et mammifères (LEQUERICA et al., 2006). Par conséquent, elle peut jouer un rôle majeur dans la protection Contre l'Infarctus Du Myocarde (IDM)ischémique (BESSE et al., 2015). Il a été suggéré aussi que d'autres archéocines peuvent avoir des applications cliniques similaires ou différentes. Pour exploiter leur potentiel clinique, on a besoin de plus de recherches sur leurs structures physiques et leurs modes d'action.

### 3. Rôle écologique des halocines :

Seules quelques études ont été menées pour comprendre le rôle écologique des halocines dans les interactions microbiennes en milieux hypersalins. L'implication de ces molécules dans la dominance des archées halophiles dans les salines, les lacs salins et les saumures n'a pas encore été confirmée et les résultats sont encore souvent contradictoires. Les premières études ont montré que la production d'halocines était fréquemment observée parmi les souches d'archées halophiles. Cependant, KisPapo et Oren ont montré que, bien que l'excrétion d'halocine soit un phénomène très répandu parmi les archées de la classe des Halobacteria, il semblerait que la contribution de ces halocines aux compétitions entre archées dans ces environnements hypersalins soit négligeable. Lorsqu'il y a compétition soit pour l'espace, soit pour les nutriments, les micro-organismes produisent des substances antimicrobiennes qui inhibent la croissance d'espèces phylogénétiquement proches. Des études ont suggéré que des conditions de carence nutritionnelle stimulent la production d'halocine par la souche productrice. Par conséquent, ces peptides antimicrobiens pourraient jouer un rôle dans la dynamique des communautés d'archées halophiles et le contrôle de la biodiversité des micro-organismes observée dans ses environnements hypersalins, ont suggéré que la présence d'agents antimicrobiens dans l'environnement peut à fois réduire et augmenter la diversité des espèces par la lyse cellulaire dans le premier cas ou par la disponibilité des nutriments dans le deuxième cas (GHANMI, 2016).

Une étude plus récente sur les interactions entre archées et bactéries halophiles provenant d'origine géographique diverses, a montré qu'au moins un tiers des souches testées produisent une halocine. Parmi les 144 interactions observées entre micro-organismes, plus de 80% sont détectées entre micro-organismes provenant de genres différents. Par ailleurs des inhibitions ont été observées entre le domaine des archées et celui des bactéries. En particulier des souches d'archées des genres *Haloferax*, *Halorubrum* et *Halogranum* sont actives contre des bactéries des genres *Halomonas*, *Pontibacillus*, *Salinivibrio* et *Salicola*, tandis que des souches du genre *Salicola* sont actives contre des archées du genre *Halorubrum*. La production d'halocine pourrait ainsi augmenter la diversité microbienne et les halocines pourraient donner aux souches productrices un avantage transitoire vis à vis des compétiteurs (GHANMI, 2016).

#### 3.1. Rôle des halocines dans l'environnement :

L'ubiquité de la production d'halocines nous amène à supposer que ces dernières sont largement répandues dans les milieux hypersalins. Cette hypothèse soulève une autre question: "Les halocines sont-elles impliquées dans la compétition entre les Haloarchaea dans les marais

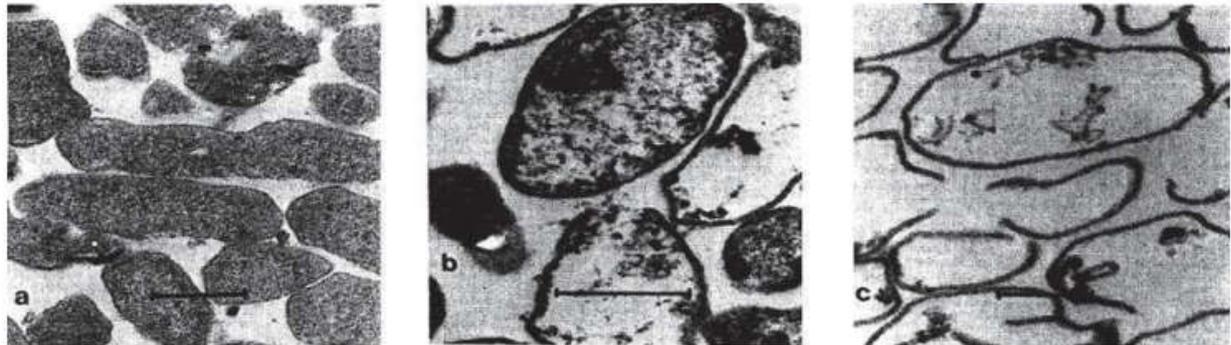
salants ? (Boudrioua, 2013). Des échantillons, exempts de cellules, concentrés prélevés de différents milieux hypersalins et à différentes périodes de l'année n'ont révélés aucune activité inhibitrice sur 12 souches cibles. Tandis que les cellules des échantillons produisaient des halocines in vire. Cette étude a permis de conclure que probablement en milieux naturels, les halocines n'étaient pas produites, et que ces dernières n'interviennent pas dans la compétition entre les espèces. L'explication téléologique de la production d'halocines est la lyse du germe cible pour libérer des nutriments (**BOUDRIOUA, 2013**).

#### 4. Mécanismes d'action des halocines :

Le mode d'action des halocines produites par les souches d'archées halophiles extrêmes a été beaucoup moins étudié que celui des bactériocines et actuellement très peu d'informations sont disponibles sur cette question. Le mode d'action n'est connu que pour les halocines H6/H7, H4 et HI. Ces halocines agissent sur la membrane plasmique des souches sensibles, soit par inhibition du transporteur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (**MESEGUER et al. 1995**), soit par perturbation de la perméabilité membranaire (**MESEGUER et RODRIGUEZ-VALERA, 1985, O'CONNOR et SHAND 2002**).

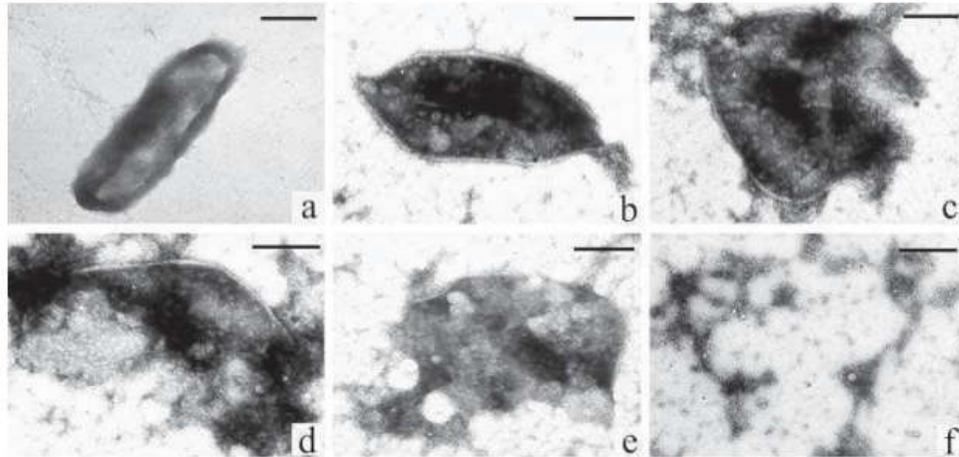
L'halocine H6 se fixe sur la membrane des souches cibles d'*Hbt. salinarum*, et bloque le transporteur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . (**MESEGUER et al. 1995**). Ce mécanisme utilise le gradient d'ions  $\text{H}^+$  pour échanger 2  $\text{H}^+$  de l'extérieur de la cellule contre un  $\text{Na}^+$  à l'intérieur de la cellule, ce qui contribue à maintenir la concentration intracellulaire de  $\text{Na}^+$  à des niveaux compatibles avec la vie cellulaire. Le blocage du transporteur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  par l'halocine H6 conduit à l'augmentation des concentrations du  $\text{Na}^+$  intracellulaire et à la diminution de la concentration en protons  $\text{H}^+$ , ce qui provoque des variations de pH du milieu intracellulaire, du potentiel transmembranaire et de la force protomotrice (**MESEGUER et al. 1995**). Par son action sur le transporteur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , l'halocine H6 entraîne une modification de la morphologie des cellules sensibles qui deviennent sphériques et gonflent suite à l'entrée massive de l'eau stimulée par l'accumulation des ions  $\text{Na}^+$ , jusqu'à la lyse cellulaire (**LEQUERICA et al. 2006**). Cette halocine laisse des fantômes de cellules vides, dans lesquels les enveloppes semblent rester intactes. Torreblanca et al. 1989, ont étudié l'effet de l'halocine H6 sur la morphologie cellulaire de la souche *Halobacterium*. Les résultats observés par microscopie électronique après les traitements durant 5 et 24 h de la souche sensible par l'halocine H6 à 640 UA.mL montre que la membrane reste intacte (Figure 25) (**TORREBLANCA et al. 1989**). L'activité de l'halocine H6 a été quantifiée dans le surnageant de la culture productrice par la méthode de double dilution ; elle est exprimée en UA.mL', qui est l'inverse de la dilution du dernier puits qui ne présente aucune zone

d'inhibition de la souche cible divisé par le volume de surnageant déposé dans le puits et multiplié par mille (TORREBLANCA *et al.* 1989). L'augmentation des doses d'halocines H6 induit un effet plus rapide (LEQUERICA *et al.* 2006). Ainsi, l'halocine H6 entraîne la dégradation des sphéroplastés des archées qui sont dépourvus de parois cellulaires (Torreblanca *et al.* 1989).



**Figure03** : Effet de l'halocine H6 sur la morphologie cellulaire d'Halobacterium observé en microscopie électronique. a : Cellules d'Halobacterium non traitées, b : après 5 h de traitement par 640 UA.mL" d'halocine H6, c : après 24 h de traitement par l'halocine H6. Barre : 0,5 um, UA : unités arbitraires (TORREBLANCA *et al.* 1989).

L'halocine H4 semble agir sur la cellule cible en affectant l'état d'équilibre du flux protonique (O'CONNOR *et SHAND* 2000), tandis que l'halocine HI perturberait la perméabilité membranaire de la cellule cible (O'CONNOR *et SHAND* 2002) ont étudié l'effet de l'halocine C8 sur la cible *Hrr. saccharovorum*, dans le but de déterminer le mode d'action de cette halocine. Cette étude a montré que l'halocine C8 a un effet sur la membrane cellulaire et surtout sur sa perméabilité. Suite au traitement des cellules cibles par l'halocine C8, un gonflement des cellules est observé, puis la paroi cellulaire se rétrécit, le cytoplasme est libéré à l'extérieur et finalement les cellules sont complètement lysées (L1 *et al.* 2003) (Figure 26). Cet effet bactéricide suggère que l'halocine C8 agit sur la paroi cellulaire de la souche cible (L1 *et al.* 2003. 2003, BESSE *et al.* 2015).



**Figure04 :** Images de microscopie électronique de cellules d'*AHalorubrum saccharovorum* traitées avec l'halocine C8. a : absence de traitement des cellules, b : après 5 h d'exposition des cellules à l'halocine C8, c : après 12 h de traitement, d, e : après 24 h de traitement par l'halocine C8, et f : après 48 h de traitement (LI et *al.* 2003).

### 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).

### 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).

# Chapitre II : Analyse d'un travail expérimental

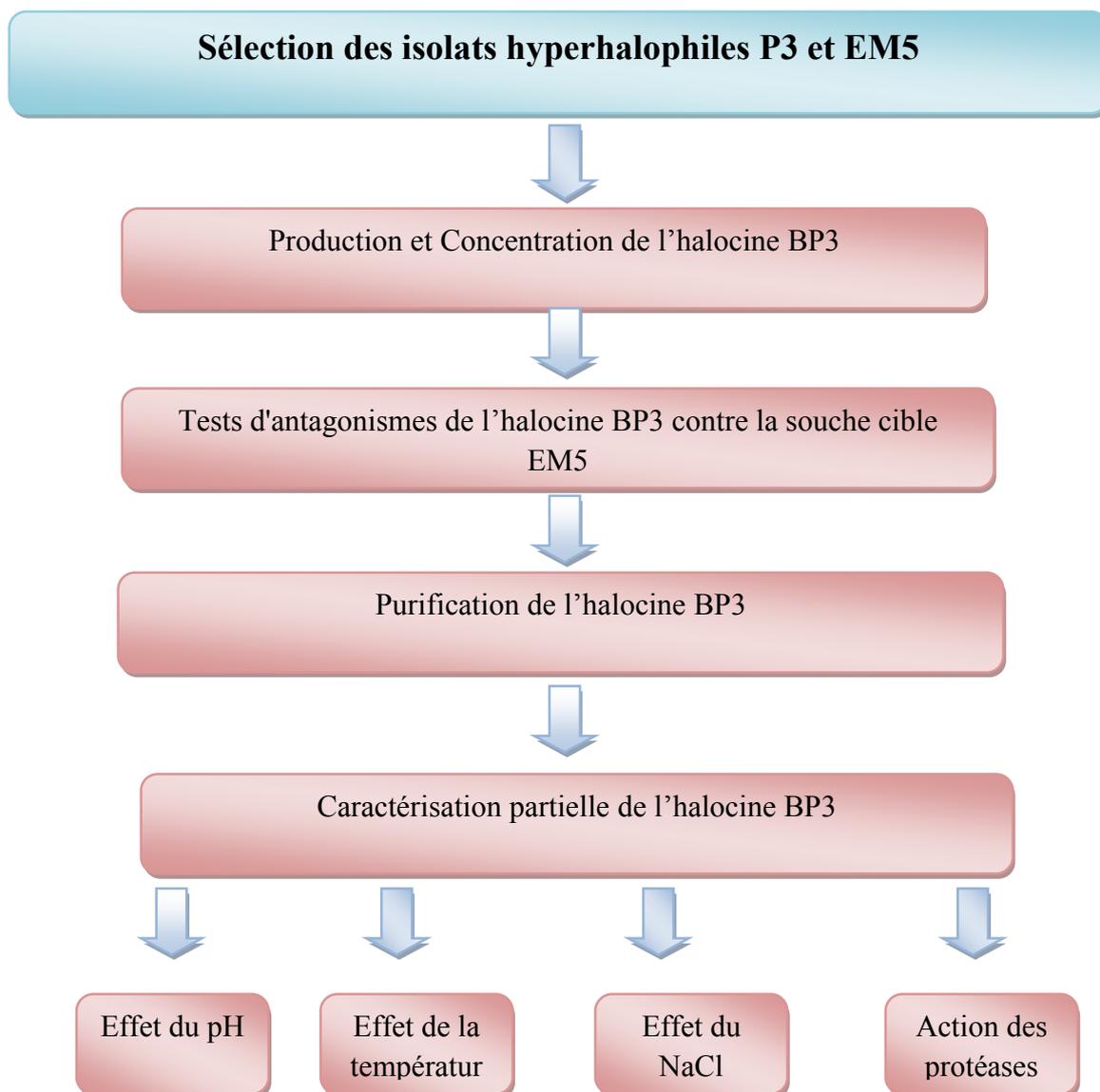
*« Les méthodes sont les habitudes de l'esprit et l'économie de la mémoire. »*

*Rivaros*

### 1- Introduction:

Le présent travail qui fait l'objet de notre analyse a été réalisé par N.BOUKTIT, N.IDRES et A.BOULILA sous la direction du professeur Benalaoua.s au niveau du laboratoire de Microbiologie Appliquée et Biochimie Microbienne. Département de Microbiologie. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université Abderahmen Mira Béjaïa, durant l'année 2003. Dans ce travail les auteurs expliquent les méthodes d'étude d'une molécule d'halocine produite par la souchehalophile P3 isolée à partir de poisson.

Au cours de leur travail de recherche les auteurs ont adopté le plan d'action suivant:



**Figure 05:** Organigramme général du travail(BOUKTIT *et al.*, 2003)

### 2. Principales étapes du travail expérimental

#### 2.1. Souches utilisées:

Dans cette étude les auteurs ont utilisé deux souches bactériennes hyperhalophiles P3 et EM5 isolées à partir de poisson et d'eau de mer, respectivement. La première correspond au germe producteur et la seconde au germe cible.

#### 2.2.Mise en évidence de l'activité halocine:

La mise en évidence de l'activité halocine à été faite sur milieu MSH solide en utilisant la méthode des disques d'agar. Cependant l'activité halocine dans le milieu MSH liquide a été révélée par la méthode des puits de diffusion sur gélose. Le germe cible utilisé dans ces tests d'antagonismes est la souche halophile EM5.

#### 2.3 Production de l'halocine BP3:

Dans cette étape, les chercheurs ont inoculé la souche P3 dans un bioréacteur contenant 2L du milieu MSH aéré et agité à 350 rpm durant 48h à 37°C. le milieu obtenu est centrifugé à une vitesse de 9000 rpm à 4°C pendant 30 min. L'activité est recherchée dans le surnageant et dans le culot (après la lyse cellulaire) selon la méthode des puits de diffusion sur gélose.

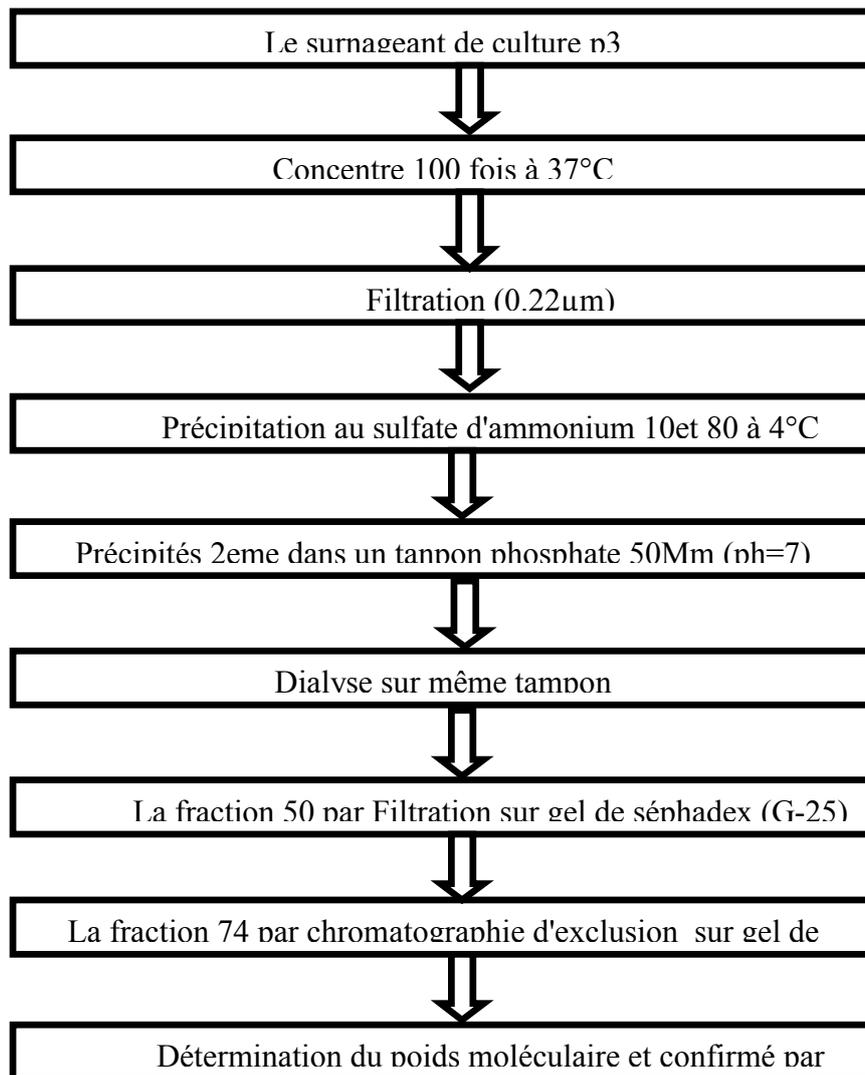
#### 2.4 Concentration et Purification de l'halocine BP3:

La concentration et la purification de la molécule d'halocine BP63 a demandé aux manipulateurs plusieurs étapes résumées dans la figure 4.

Le surnageant de culture de la souche P3 est concentré 100 fois par évaporation sous vide à 37°C, puis stérilisé par filtration à travers des filtres millipores de 0,22 µm.

Le concentré ainsi obtenu subit une précipitation au sulfate d'ammonium entre 10 et 80% à 4°C pendant 4h, le mélange est centrifugé à 12000 g (Sigma 6K 15) pendant 20 min à 4°C. La concentration est suivie d'une filtration sur gel de séphadex G-25, à travers une colonne de type Pharmacia (25x1, 5 cm), La fraction active récoltée est éluée avec du tampon phosphate à un débit de 0,5 ml/min à travers une colonne de séphadex G-75 de type Pharmacia (25x1, 5 cm).

La masse moléculaire de l'halocine BP3 a été estimée par chromatographie sur colonne. Cependant le degré de pureté du composé a été évalué par SDS-PAGE à 12% d'acrylamide.



**Figure 06:** Etapes de concentration et de purification de l'halocine BP3(BOUKTIT *et al.*, 2003)

### 2.5 Caractérisation partielle de l'halocine BP3

Dans le but de caractériser d'une façon partielle l'activité halocine BP3, les chercheurs ont étudiés les effets de certains paramètres physiologique sur l'activité notamment le pH, la température, la salinité et l'action des protéases en particulier la trypsine et la papaïne.

# **Chapitre III : Analyse des principaux résultats**

Dans cette partie du travail nous avons essayé de résumer et commenter les principaux résultats trouvés par les auteurs.

### **1. Nature de l'agent antibactérien**

Pour vérifier la nature de l'agent antibactérien produit par la souche P3, trois tests sont effectués et les résultats obtenus sont les suivants : le milieu de culture étant dépourvu de produits fermentescibles ainsi que l'évolution du pH excluent la possibilité de production d'acides organiques, la production de l'agent antibactérien rend le milieu alcalin, ce qui exclut l'intervention d'eau oxygénée.

### **2. Mise en évidence de l'activité halocine**

Les zones d'inhibitions observées après les tests d'activité restent intactes, même après 10 jours d'incubation. Ces résultats s'expliqueraient, d'après HASELTINE et *al* en 2001, par l'effet cytocidal exercé par le surnageant de culture de la souche P3 à l'encontre de la souche cible EM5. La caractérisation de l'agent antibactérien suggère que celui-ci soit une halocine et que les auteurs ont nommé BP3.

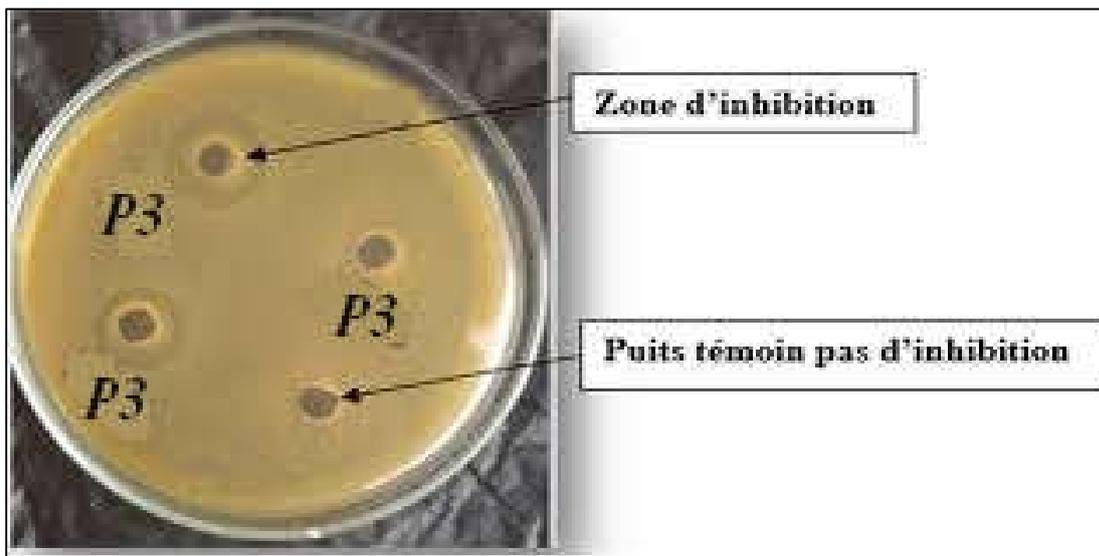


Figure 07 : Activité sur milieu solide selon la méthode des disques d'agar(BOUKTIT et *al.*, 2003)

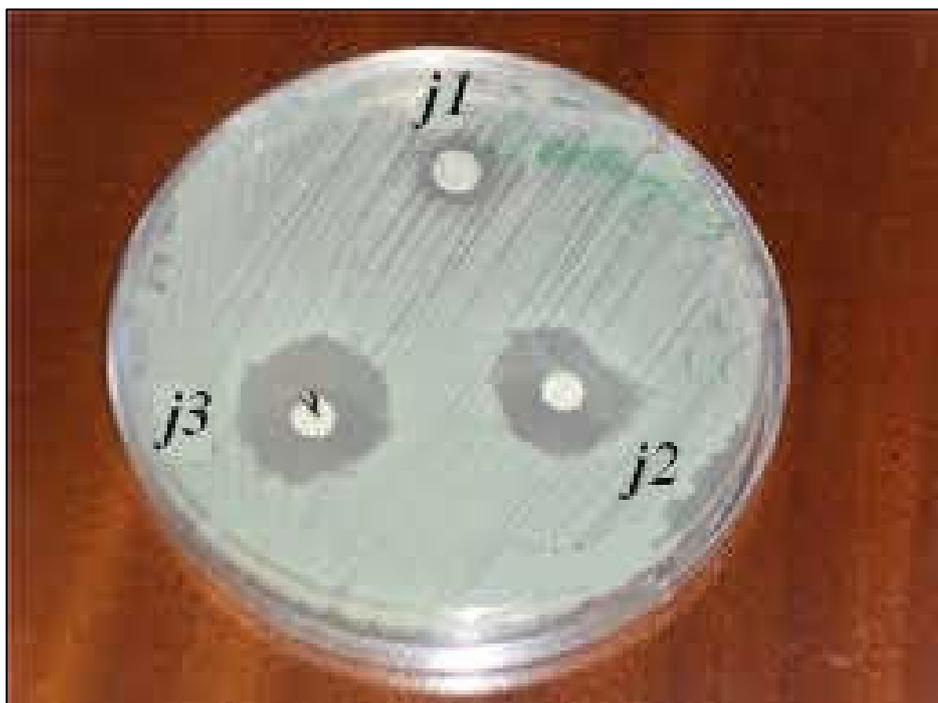


Figure 08: Activité dans le milieu liquide selon la méthode des puits de diffusion sur gélose(BOUKTIT et *al.*, 2003)

### 3 .Purification de l'halocine BP3

La précipitation au sulfate d'ammonium révèle que l'halocine BP3 précipite entre 40 et 60% de saturation en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . L'activité spécifique du composé BP3 est 12 fois supérieure à celle du surnageant concentré (Tableau 3). Cette étape de précipitation permet en plus de concentrer l'agent antibactérien, d'éliminer un grand nombre de protéines contaminantes.

Les résultats des tests d'antagonisme, effectués sur les fractions éluées après filtration sur gel de séphadex G-25 du précipité actif dialysé et concentré, révèlent que la fraction 29 présente une activité importante vis à vis du germe cible EM5. Le fait que la fraction active s'élué dans le volume mort suggère que le composé BP3 ait un poids moléculaire supérieur au seuil de séparation du gel qui est de 5 KDa.

Cette étape de purification permet en plus de désioniser le composé BP3, de le concentrer et d'éliminer toutes les petites molécules ayant une masse moléculaire comprise entre 1000 et 5000 Da. L'activité spécifique de BP3, après cette étape de désionisation, est 13 fois supérieure à celle du surnageant concentré (Tableau 3).

Le profil d'élué de la fraction BP3 désionisée après chromatographie sur gel de séphadex G-75, montre que la substance BP3 s'élué entre les fractions 30 et 40 (Figure 7). Les tests d'activités effectués sur les fractions collectées révèlent que l'activité est concentrée au niveau de ce pic (Figure 7); l'activité spécifique du composé BP3 après cette étape de purification est 15 fois supérieure à celle du surnageant concentré (Tableau 3). L'étalonnage de la colonne chromatographique par des protéines standards permet d'estimer le PM apparent du composé BP3 à environ 50 KDa. Ces résultats montrent que le composé BP3 est à haut poids moléculaire et semble similaire aux halocines : H4 dont le PM est de 28 KDa (**MESEGUER, et al., 1985**), H1 dont le PM est déterminé à 31 KDa et H6 dont le PM est estimé à 32 KDa (**O'CONNOR E.M, et al., 2002 ; SHAND R.F, et al., 1999 ; TORREBLANCA M, et al., 1989**).

La SDS-PAGE montre que l'halocine BP3 consiste en une seule chaîne polypeptidique. Car après traitement par le  $\beta$ -mercaptoéthanol et la chaleur, une seule bande apparaît (Figure 8). Un haut degré de pureté est donc probable car la protéine apparaît comme homogène dans les étapes précédentes.

L'estimation de la masse moléculaire du composé BP3 après SDS-PAGE est estimée à environ 52 KDa, ce qui confirme l'estimation effectuée par filtration sur gel de séphadex G-75.

**Tableau 3:** Degré de pureté du composé BP3 durant les étapes de purification.

Etapes de purification	Activité totale (UA)	Protéines totales (mg)	Activité spécifique (UA/mg)	purification (fois)	Rendement (%)
Surnageant brut	51200	39,45	1298	1	100
Précipitation par le sulfate d'ammonium	25600	1,61	15901	12	50
Chromatographie sur gel de séphadex G-25	12800	0,75	17067	13	25
Chromatographie sur gel de séphadex G-75	6400	0,34	18824	15	12.5

(BOUKTIT *et al.*, 2003)

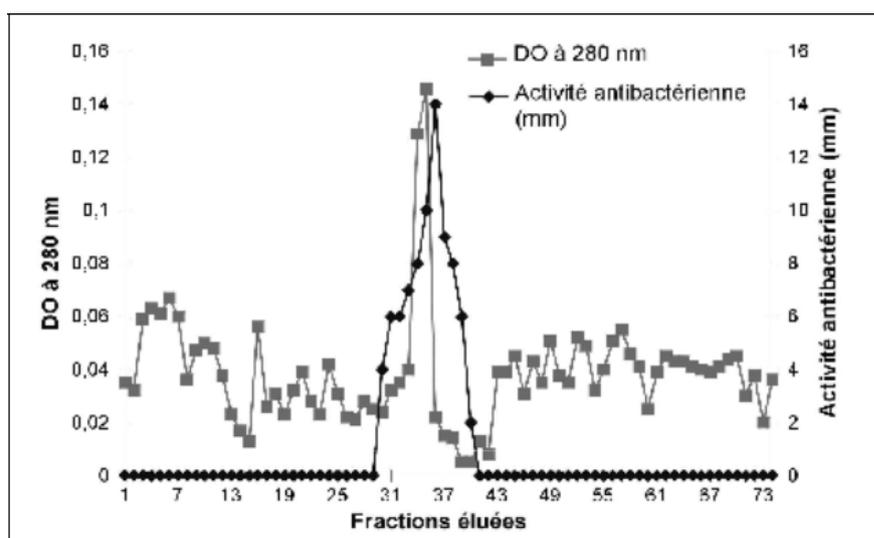
**LEGENDES:**

UA : Activité totale.

Activité spécifique (UA/mg) : Activité totale/ Protéines totales.

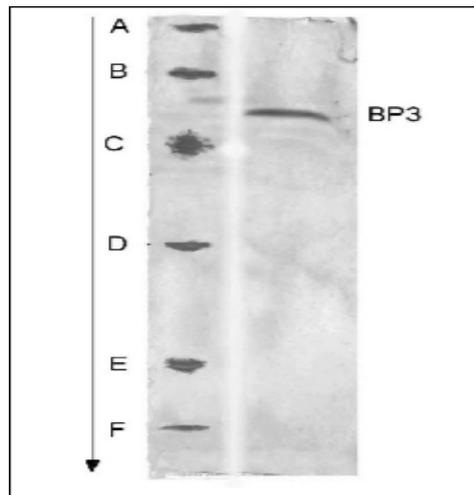
Purification (fois) : Activité spécifique après chaque étape de purification/ Activité spécifique du surnageant brut.

Rendement : Activité totale après chaque étape de purification x 100 / Activité totale du surnageant brut.



**Figure09 :** Profil d'éluion du composé BP3 après chromatographie sur gel de séphadex G-75.

(BOUKTIT *et al.*, 2003)



**LÉGENDE:**

- A: Phosphorylase B (92,5 KDa)
- B: Albumine bovine (66,2 KDa)
- C: Ovalbumine (42,7 KDa)
- D: Anhydrase carbonique (31,0 KDa)
- E:Trypsine (21,5 KDa)
- F: Lysozyme (14,3 KDa)

**Figure 10:** Profil électrophorétique de l'halocine BP3. (BOUKTIT *et al.*, 2003)

#### 4 .Caractérisation partielle de l’halocine BP3 :

Les résultats trouvés par les auteurs montrent que l’halocine BP3 est stable à pH allant de 6 à 9. Cependant son activité est altérée de 75% à pH 10 et s'annule complètement au-delà de 10 et à pH acide. Ces résultats sont en complet accord avec ceux des halocines H4, H6, HalR1, S8 et H1 qui sont toutes stables au voisinage de la neutralité. L’halocine BP3 s’avère thermostable car son activité reste intacte après traitement à 80°C pendant 10 min; elle conserve 85,7% de son activité à 90°C, 80% à 100°C. Mais l’activité est complètement altérée après un cycle d’autoclavage à 120°C pendant 20 min (Tableau4). Contrairement à l’halocine H4 dont l’activité s’avère thermolabile puisqu’elle est complètement altérée après traitement à 80°C pendant 10 min. L’halocine BP3 s’apparente à l’halocine HalR1, vu sa thermostabilité

Le traitement de l’agent antibactérien par la papaïne n’influence pas son activité alors que son traitement par différentes concentrations de trypsine le rend inactif, ce qui suggère que cet agent soit de nature protéique ou contiendrait au moins un résidu protéique nécessaire à son activité, contrairement aux halocines S8, H6 et HalR1 insensibles à l’action de la trypsine.

L’agent antibactérien produit par la souche P3, semble être similaire à l’halocine H4 car tous deux s’avèrent sensibles à l’action de la trypsine.

Tableau 4: Caractérisation partielle de l'halocine BP3

Paramètres		Diamètres des zones d’inhibition (mm)	%
pH	2-6	0	0
	6-9	35	100
	10	8,75	25
	10-12	0	0
Températures (°C)	60	35	100
	70	35	100
	80	35	100
	90	30	85,7
	100	28	80
	120	0	0
Trypsine (mg/ml)	1-5	0	0
Papaïne (mg/ml)	1-5	35	100

**Conclusion**

### CONCLUSION :

Le présent travail a été scindé en deux parties. La première partie représente une synthèse bibliographique sur les haloarchaea, décrivant d'une part leurs caractères morphologiques, physiologiques et leur taxonomie et de l'autre part les molécules actives qu'elles produisent en particulier les halocines.

La deuxième partie a été consacrée à une analyse d'un travail expérimentale entrepris par une équipe de microbiologistes de l'université de Bejaia portant sur la production et la caractérisation d'une molécule d'halocine qu'ils ont nommé BP3 produite par une souche halophile extrême nommée P3.

Dans cette étude les auteurs ont adopté un protocole scientifique composé de plusieurs étapes qui les a conduit à la production, la purification et la caractérisation d'une molécule d'halocine utile en bioindustrie.

Les résultats révèlent sa nature protéique, son indépendance au sel, sa thermostabilité et sa stabilité au voisinage de la neutralité. Elle exerce un effet cytocidal vis-à-vis du germe cible.

Ces résultats concordent avec la définition d'une bactériocine produite par les hyperhalophiles; le composé BP3 serait donc une halocine.

L'halocine BP3 a été purifiée jusqu'à homogénéité. Son PM a été estimé à environ 50 KDa, par une SDS-PAGE qui montre également que l'halocine BP3 est constituée d'une seule chaîne polypeptidique.

Cette halocine étant sel non dépendante, son application biotechnologique et pharmaceutique peut être envisagée.

# Références

**REFERENCES:**

**B**

**BESSE A, PEDUZZI J, REBUFFAT S, CARRE-MLOUKA A**(2015) Antimicrobial peptides and proteins in the face of extremes lessons from archaeocins. *Biochimie* 118:344–355

**BONETE MJ, BAUTISTA V, ESCLAPEZ J, GARCÍA-BONETE MJ, PIRE C, CAMACHO M, TORREGROSA-CRESPO J, MARTÍNEZ-ESPINOSA RM**(2015) New uses of haloarchaeal species in bioremediation processes. In: Shiomi N (ed) *Advances in bioremediation of wastewater and polluted soil*. InTech, Rijeka, pp 23–49

**BOUDRIOUA ABDELHAKIM** (2012) optimisation par un plan factoriel de la croissance et de la production d'halocines par une souches d'haloarchaea SW025, Thèse de Master, Université des sciences de la nature et de la vie, Abderhmane Mira Bijaia-Alger, P81.

**BOUKTIT.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*. N°20. pp. 39-43

**C**

**CHEUNG J, DANNA KJ, O'CONNOR EM, PRICE LB, SHAND RF** (1997) Isolation, sequence, and expression of the gene encoding halocine H4, a bacteriocin from the halophilic archaeon *H. mediterranei* R4. *J Bacteriol* 179:548–551

**D**

**DASSARMA S, ARORAP** (2001) Halophiles. In: *Encyclopedia of life sciences*. Nature Publishing Group, Basingstoke, pp 1–9. [www.els.net](http://www.els.net).

**E**

**EBERT K, GOEBEL W, RDEST U, SUREK B** (1986) Genes and genome structures in the archaeobacteria.

**ENACHE M, ITOH T, KAMEKURA M, TEODOSIU G, DUMITRU L** (2007) *Haloferax prahovense* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a Romanian salt lake. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:393–397

**ESSEN LO** (2002) Halorhodopsin: light-driven ion pumping made simple? *Curr Opin Struct Biol*12:516–522

**G**

**Galinski, Tindall, (1992)** Chapitre 11 Biotchnological Applictions and potentials of Halopilic Microorganisms, P357-358.

**GHANMI F, CARRE-MLOUKA A, VANDERVENNET M, BOUJELBEN I, FRIKHA D, AYADI H, PEDUZZI J, REBUFFAT S, MAALEJ S(2016)** Antagonistic interactions and production of halocine antimicrobial peptides among extremely halophilic prokaryotes isolated from the solar saltern of Sfax, Tunisia. *Extremophiles* 20(3):363–374

**GIBBONS NE (1974)** Family V. Halobacteriaceae fam. nov. In: Buchanan RE, Gibbons NE (eds) *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore, pp 269–273

**GRANT WD, KAMEKURA M, MCGENITY TJ, VENTOSA A(2001)** Class III. Halobacteria class. Nov. In: Boone DR, Castenholz RW, Garrity GM (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 1. Springer-Verlag, New York, pp 294–334

**H**

**HASELTINE C., HILL T., MONTALVO-RODRIGUEZ R., KEMPER S.K., SHAND R.F. AND BLUM P.**, «Secreted Euryarchaeal microhalocines kill hyperthermophilic Crenarchaea», *Bacteriol.*, vol. 183 (2001), pp.287-291.

**HEZAYEN FF, REHM BH, TINDALL BJ, STEINBÜCHEL A(2001)** Transfer of *Natrialba asiatica* BIT to *Natrialba taiwanensis* sp. nov. And description of *Natrialba aegyptiaca* sp. nov., a novel extremely halophilic, aerobic, non-pigmented member of the archaea from Egypt that produces extracellular poly (glutamic acid). *Int J Syst Evol Microbiol* 51:1133–1142.

**J**

**JAIN S, CAFORIO A, FODRAN P, LOLKEMA JS, MINNAARD AJ, DRIESSEN AJM (2014)** Identification of CDP-archaeol synthase, a missing link of ether lipid biosynthesis in archaea. *Chem Biol* 21:1392–1401

**K**

**KARTHIKEYAN P, BHAT SG, CHANDRASEKARAN M(2013)** Halocine SH10 production by an extreme haloarchaeon *Natrinema* sp. BTSH10 isolated from salt pans of South India. *Saudi J Biol Sci* 20:205–212

## *Références*

---

**KAVITHA P, LIPTON AP, SARIKA AR, AISHWARYA MS** (2011) Growth characteristics and halocine production by a new isolate, *H. volcanii* KPS1 from Kovalam solar saltern (India). *Res J Biol Sci* 6:257–262

**KLARE J, CHIZHOV I, ENGELHARD M**(2008) Microbial rhodopsins: scaffolds for ion pumps, channels, and sensors. *Bioenergetics. Results Probl Cell Differ* 45:73–122

**KUMAR V, SAXENA J, TIWARI SK** (2016) Description of a halocine-producing *Haloferax larsenii* HA1 isolated from Pachpadra salt lake in Rajasthan. *Arch Microbiol* 198:181–192

**KUMAR V, TIWARI SK** (2017a) Halocin HA1: an archaeocin produced by the haloarchaeon *Haloferax larsenii* HA1. *Process Biochem* 61:202–208

**KUSHNER DJ, KAMEKURA M** (1998) Physiology of halophilic eubacteria. In: Rodriguez-Valera F (ed) *Halophilic bacteria*, vol 1. CRC Press, Inc, Boca Raton, pp 109–138

### *ℒ*

**LEQUERICA JL, O'CONNOR JE, SUCH L, ALBEROLA A, MESEGUER I, DOLZ M, TORREBLANCA M, MOYA A, COLOM F, SORIAB** (2006) A halocine acting on Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger of Haloarchaea as a new type of inhibitor in NHE of mammals. *J Physiol Biochem* 62:253–262

**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.

**LI Y, XIANG H, LIU J, ZHOU M, TAN H** (2003) Purification and biological characterization of halocin C8, a novel peptide antibiotic from *Halobacterium* strain AS7092. *Extremophiles* 7:401–407 Lieb Gott PP,

### *m*

**MEKNACI-MENAS R,** (2015) production et caractérisation de substances antimicrobiennes chez des souches de Halobactéries. Thèse de Doctorat, Université des sciences et de technologie Houari Boumadiene- Alger, pp 12-47.

**MESEGUER I, RODRIGUEZ-VALERA F** (1985) Production and purification of halocin H4. *FEMS Microbiol Lett* 28:177–182

### *o*

## Références

---

**O'CONNOR E.M. AND SHAND R.F., "HALOCINES AND SULFOLOBICINS: The emerging story of archaeal protein and peptide antibiotics", J. Ind. Microbiol. Biotech, vol. 28 (2002), pp.23-31.**

**O'CONNOR EM, SHAND RF (2002) Halocines and sulfolobocins: the emerging story of archaeal protein and peptide antibiotics. J Ind Microbiol Biotechnol 28:23–31**

**OREN A (2002) Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. J Ind Microbiol Biotechnol 28:56–63**

**OREN A (2006) Life at high salt concentrations. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (eds) The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology and biochemistry, vol 2, 3rd edn. Springer, New York, pp 263–282**

**OREN A., 2006a – Life at high salt concentrations. Journal of prokaryotes. 2 :263-282.**

**OREN A., 2006b – The order Halobacteriales. pp : 113-164 cité par DWORKIN M., FALKOW S., ROSENBERG E., SCHLEIFER K.-H. et STACKEBRANDT E. – The prokaryotes, a handbook on the biology of bacteria : Ecophysiology and biochemistry. Ed. Springer, New York.**

**Oren A., 2008 – Microbial life at high salt concentrations : phylogenetic and metabolic diversity. Saline systems. 4-2.**

**OREN A, ARAHAL DR, VENTOSA A (2009) Emended descriptions of genera of the family Halobacteriaceae. Int J Syst Evol Microbiol 59:637–642**

**OREN A, RODRÍGUEZ-VALERA F (2001) The contribution of halophilic bacteria to the red coloration of saltern crystallizer ponds. FEMS Microbiol Ecol 36:123–130**

## P

**PASIC L, VELIKONJA BH, ULRICH NP(2008) Optimization of the culture conditions for the production of a bacteriocin from halophilic archaeon Sech7a. Prep Biochem Biotechnol 38:229–245.**

**PFEIFER F (2015) Haloarchaea and the formation of gas vesicles. Life (Basel) 5(1):385–402**

**PLATAS G, MESEGUER I, AMILS R (2002) Purification and biological characterization of halocine H1 from Haloferax mediterranei M2a. Int Microbiol 5:15–19**

**PRESCOTT, HARLEY, KLEIN, WILEY, SHERWOOD ET WOOLVERTON, 2010 – Microbiologie. 3<sup>ème</sup> Ed. De Boek, Bruxelles.  
genus Sulfolobus. J Bacteriol 182:2985–2988**

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

## **R**

**RAFAEL R., SANCHEZ-PERRO C., MARQUEZ M. C. ET VENTOSA A.**, 2011 – Taxonomy of halophiles. pp : 254-401 cité par HORIKOSHI K. – *Extremophiles handbook*. Ed. Springer, New York.

**RDEST U. AND STURM M.**, "BACTERIOCINS FROM HALOBACTERIA", In: *Protein purification : micro to macro*, R. Burgess (ed.), Alan R. Liss, Inc., New York, N.Y., (1987), pp. 271-278.

**RILEY M.A AND WERTZ J.E** (2002) Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie*, 84: 357-364.

**RIVERA SM, CANELA-GARAYOA R**(2012) Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials. *J Chromatogr A* 1224:1–10

**RODRIGO-BAÑOS M, GARBAYO I, VÍLCHEZ C, BONETE MJ, MARTÍNEZ-ESPINOSA RM** (2015) Carotenoids from haloarchaea and their potential in biotechnology. *Mar Drugs* 13:5508–5532

**RODRIGUEZ-VALERA F, JUEZ G, KUSHNER DJ**(1982) Halocines: salt – dependent bacteriocins produced by extremely halophilic rods. *Can J Microbiol* 28:151–154

**RODRIGUEZ-VALERA F, RUIZ-BERRAQUERO F, RAMOS-CORMENZANA A** (1981) Characteristics of the heterotrophic bacterial populations in hypersaline environments of different salt concentrations. *Microb Ecol* 7(3):235–243

## **S**

**SHAND R.F., PRICE L.B. AND O’CONNOR E.M.**, "HALOCINES: protein antibiotics from hypersaline environments", in: Oren A (ed) *Microbiology and biogeochemistry of hyper saline environments*, CRS Press, Boca Raton, (1999), pp. 295-306.

**SHAND RF, LEYVA KJ** (2007) Peptide and protein antibiotics from the domain archaea: halocines and sulfolobocins. In: Riley MA, Chavan MA (eds) *Bacteriocins: ecology and evolution*. Springer, Berlin/Heidelberg/New York, pp 93–109

## *Références*

---

**SHAND RF, LEYVA KJ** (2008) Archaeal antimicrobials: an undiscovered country. In: Blum P (ed) *Archaea: new models for prokaryotic biology*. Caister Academic Press, Norfolk, pp 233–243

**SPUDICH JL, LUECKE H**(2002) Sensory rhodopsin II: functional insights from structure. *Curr Opin Struct Biol* 12:540–546

**SUN C, LI Y, MEI S, LU Q, ZHOU L, XIANG H** (2005) A single gene directs both production and immunity of halocin C8 in a haloarchaeal strain AS7092. *Mol Microbiol* 57:537–549

**SYUTKIN AS, PYATIBRATOV MG, FEDOROV OV**(2014) Flagella of halophilic archaea: differences in supramolecular organization. *Biochem Mosc* 79:1470–1482.

### *T*

**TORREBLANCA M, MESEGUER I, RODRIGUEZ-VALERA F**(1989) Halocine H6, a bacteriocin from *Gibbonsia*. *J Gen Microbiol* 135:2655–2661

### *V*

**VIJAY K, SANTOSH K.T** (2017) activity- guided separation and characterization of new halocin HA3 from fermented broth of *Haloferax larsenii* HA3, Extremophiles.

**VIJAY K ET SANTOSH K. T.**,2019:Halocin Diversity Among Halophilic Archaea and Their ations. *Microbial Diversity in Ecosystem Sustainability and Biotechnological Applications*.

## Résumé :

Les archaea halophiles sont des microorganismes qui peuplent les milieux à concentration élevée en sel. Ce sont des microorganismes qui présentent un intérêt biotechnologique certain puisqu'ils produisent des métabolites primaires et secondaires entre autres les halocines. Ce sont des protéines anti-microbiennes secrétées par plusieurs membres d'haloarchaea.

Dans le but de s'approcher du côté pratique nous avons choisi d'analyser un travail expérimental effectué par un groupe de chercheurs de l'université de Bejaia sur une souche halophile extrême nommée P3 productrice d'une halocine BP3.

Les auteurs ont pu produire, purifier et caractériser l'halocine BP3. Les résultats révèlent sa nature protéique, son indépendance au sel, sa thermostabilité et sa stabilité au voisinage de la neutralité. Par ces propriétés, la molécule produite peut être candidate pour une éventuelle application en bioindustrie.

**Mots clés:** Halophile, Haloarchaea, Halocine BP3, archaea

## ملخص الدراسة:

الكائنات الحية الدقيقة المحبة للملوحة تعيش في بيئات ذات تركيز عالي من الملح. تكتسي هذه الكائنات أهمية تكنولوجية حيوية لأنها تنتج الأيضات مثل مضادات الميكروبات، هذا العامل من طبيعة بروتينية منتجة من طرف أعداد من السلالة الملحية.

في هذه الدراسة قام فريق بحث من جامعة بجاية باختيار عينة منتجة فعالة المسماة بـ P3 والتي استعملت لغرض إنتاج واستخراج واستخلاص وتمييز المضاد الحيوي المعروف بـ BP3، واكتشفوا طبيعته البروتينية، واستقلالته عن الملح، وثباته عند درجات عليا من الحرارة واستقراره في الوسط المعتدل، هذا الألوسين يمكن ان يستعمل في البيوتكنولوجيا والصيدلة.

**الكلمات المفتاحية:** الكائنات الحية الدقيقة المحبة للملوحة، الألوسين، مضاد حيوي BP3، سلالية ملحية

## Abstract:

Archaeal halophiles are microorganisms that populate environment with a high concentration of salt. They have a biotechnological interest since they are producers of metabolites such as antimicrobial agents

This agent is antimicrobial protein secreted by several members of the haloarchaea. In this study, a successful producing bacterial strain, designated P3, selected from six other hyperhalophilic producing bacterial strains, is used to produce, extract, purify and characterize the antibacterial agent designated BP3.

The results reveal that the molecule is a protein, independent from salt; it's thermostable and shows a big stability in the neutral pH.

This molecule with these properties can be used in biotechnology

**Key words:** archaea, hyperhalophiles, halocin. halophiles