



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 Option :

Microbiologie appliquée

Thème

Criblage d'activité halocine chez des isolats halophiles

Présenté par:

- ❖ *Hameurl Aine Sara*
- ❖ *Hemil Lamia*

Devant le jury compose de:

Président: Mr LAHRECH Mokhtar Boulem Professeur Univ.De Djelfa

Examinatrice: Mr MOSTEFAOUI Abdellah MCA Univ.De Djelfa

Promoteur: Mr BOUTAIBA Saad Professeur Univ.De Djelfa

Année universitaire:2022/2023

Remerciements

Nous remercions sincèrement Allah pour nous avoir donné le courage et la patience nécessaires pour mener à bien ce travail.

*En premier lieu, nous exprimons nos profonds remerciements à notre promoteur, Monsieur **BOUTAIBA Saad**, pour son aide précieuse, sa patience, sa confiance et son encouragement. Nous lui sommes extrêmement reconnaissants.*

*Ensuite Nos vifs remerciements vont à monsieur **LAHRECH Mokhtar Boulem** pour L'honneur qu'il nous a fait de Présider ce jury.*

*Nos chaleureux remerciements s'adressent également à monsieur **MOSTEFAOUI Abdellah** d'avoir accepté D'examiner ce travail.*

Ensuite, nous souhaitons adresser nos remerciements à toute l'équipe du laboratoire de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'université Ziane Achour de Djelfa, qui nous a grandement facilité le travail pratique. Leur soutien et leur expertise ont été inestimables.

Enfin, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude envers toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet de fin d'études. Leurs conseils, leur soutien moral et leur participation ont été d'une valeur inestimable. Nous les remercions du fond du cœur pour leur aide précieuse.

Dédicace

Je suis reconnaissant envers Allah d'avoir pu surmonter les défis et terminer mon mémoire. Ma réussite est effectivement le fruit de mes efforts et de ma patience, mais également du soutien et de la guidance de mes proches.

Je suis extrêmement reconnaissant envers ma chère mère et mon cher père qui ont joué un rôle essentiel dans mon parcours, en m'enseignant des valeurs telles que la sagesse, la patience, l'obéissance et la loyauté. Je prie pour que Dieu les bénisse pour leur précieuse contribution à ma vie.

Je souhaite exprimer ma gratitude à mes frères qui m'ont soutenu et aidé tout au long de mon parcours de recherche. Leur présence et leur soutien ont été une source de force inestimable pour moi.

*Je n'oublie pas de remercier chaleureusement mon promoteur, le professeur **Boutaïba Saad**, qui m'a permis de travailler sur ce sujet et m'a guidé avec ses précieux conseils. Sa contribution à ma recherche est inestimable et je lui suis profondément reconnaissante.*

Enfin, je tiens à adresser mes remerciements à toutes les personnes qui m'ont soutenu de près ou de loin. Leur coopération, leur motivation et leur aide ont été essentiels à ma réussite. Je souhaite exprimer ma reconnaissance sincère à, khdra, Lamia, Kholoud, Iman, Mariem et Najat et à tous les autres qui ont contribué à mon parcours. A toute la famille Hameurl Ain et Zemmar.

Hameurl Aine Sarah

Dédicace

Nous rendons grâce à Allah qui nous a permis de terminer cette étape de notre carrière d'étude et qui nous a inspiré de la patience face aux difficultés auxquelles nous avons été confrontés pour terminer notre mémoire, C'est le fruit d'efforts et de patience.

Ceux qui m'ont toujours aidé à savoir ce qui était bon pour moi et m'ont encouragé quand j'étais sur le bon voie, qui m'ont appris à gravir les échelons de la vie avec sagesse et patience; obéissance et loyauté envers eux: ma chère mère, mon cher père. Que Dieu Me les bénisse

À ceux qui m'ont soutenu et aidé dans mon parcours de recherche: mes frères.

Merci à mon superviseur Dr Boutaiba Saad qui m'a permis de travailler sur ce sujet et m'a orienté avec ses conseils.

À tous ceux qui m'ont aidé de loin ou de près, merci infiniment pour votre coopération et votre motivation, en particulier: Sarah, Kholoud, Hadjer, Zahra, Manel, Iman, Mariem

Hemil Lamia

Liste des abréviations:

% : pourcentage

°C: Degré Celsius

CaCl₂ : Chlorure de calcium

DO : Densité Optique

g:Gramme

g/l : gramme par Litre

h:heure

Hal: Halocine

KDa: Kilos Dalton

l: Liter

Min : Minute

MgCl₂:chlorure de Magnésium

MgSo₄ : Sulfate de magnésium

ml: millilitre

MSH : Milieu Spécifique Halophile

NaBr: Bromure de sodium

NaCl : chlorure de sodium

NaHCO₃ : Bicarbonate de sodium

NaOH: Hydroxyde de sodium

nm: Nanomètre

pH : potentiel d'hydrogène

P/v: poids par volume

RS: Rocher de sel

Sb: Sebka

λ :longueur d'onde

μ l:microlitre

Liste des figures :

FigureN°01:Représentation des 3grands phylums dumon de vivant avec un arbre «classique» (Woese et al .,1990)	4
FigureN°02:Transport des ions et des acides aminés chez les archées halophiles selon la stratégie <<Saltin>>.Les numéros indiquent les différentes voies de la stratégie<<salt-in>>(Oren ,2006).....	6
Figure N° 03: exemple de protéines et de peptides antimicrobiens(AMP) présents dans les trois domaines de la vie sur un arbre phylogénétique (Meknaci, 2015)	9
FigureN°04:Organigramme général de méthode du travail	14
Figure N°05: Situation géographique de rocher de sel (Google Earth).....	15
FigureN°06:Milieu après l'agitation.....	18
FigureN°07:Milieu après l'autoclavage.....	18
FigureN°08: Laissez les boites refroidir	18
FigureN°09:Méthode d'antibiogramme (technique des puits).....	23
FigureN°10:Méthoded'antibiogramme (technique de disque d'agar).....	24
FigureN°11:Conservation des souches sur MSH solide	25
Figure N°12: La revivification des souches tests (S3P1, S3P2, S5A1) Par la méthode de trois quadrants.....	27
Figure N°13: Ensemencement des souches tests (S3P1, S3P2, S5A1) Par la méthode de trois quadrants.....	27
FigureN°14:sériede repiquage Par la méthode de trois quadrants.....	28.
FigureN°15:sériede repiquage	29
FigureN°16:Conservation des souches	30
FigureN°17:Résultatde Test d'activité (disque d'agar) Sur milieu semi solide	32
FigureN°18:Cinétique de croissance pour les souches étudiées.....	33
FigureN°19:Cinétique de croissance et de production de composé actif par la souche S3P1.....	35
FigureN°20:Résultatde Test d'activité sur MSH liquide (test des puits) soucheS3P1	35
FigureN°21:Cinétique de croissance et de production de composé actif par la souche S3P2.....	37
FigureN°22:Résultatde Test d'activité sur MSH liquide (test des puits) souche S3P2.....	37
FigureN°23: Cinétique de croissance et de production de composé actif par la souche S5A1	39
FigureN°24:Résultatde Test d'activité sur MSH liquide (test des puits) souche S5A1	39

Liste des tableaux :

Tableau N°01:Composition du milieu MSH	16
Tableau N°02:Cinétique de croissance pour les souches étudiées	34
Tableau N°03: Cinétique de croissance et de production de composé actif par la souche S3P1...	36
Tableau N°04:Cinétique de croissance et de production de composé actif par la souche S3P2....	38
Tableau N°05:Cinétique de croissance et de production de composé actif par la souche S5A1....	40

SOMMAIRE

Remerciements

Dédicace

Liste d'abréviation

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction :..... 1

Chapitre 01:Synthèse bibliographique

I. Micro-organismes halophiles:..... 3

I.1. Osmorégulation: 6

II. Bactériocines:..... 7

III. Archéocines produites par les halobactéries: 7

IV. Halocine: 8

IV.1.Histoire d'halocine:..... 8

IV.2. Types de halocines: 9

IV.2.1. Micro-halocine:10

IV.2.2. Macro-halocines:11

IV.3. Applications biotechnologiques des halocines:..... 12

IV.3.1. Outil d'adsorption de l'ADN: 12

IV.3.2. Conservateurs pour produits alimentaires salés :.....13

IV.3.3. Prévention des maladies cardiaques:13

IV.3.4. Action anticancéreuse:.....13

Chapitre 02:Matériel et Méthodes

I. Matériel: 15

I.1. Situation géographique des zones d'études: 15

I.1.1.Rocher de sel (Hadjer El melh):15

I.2. Matériels biologiques: 16

I.2.1. Souches Tests:16

I.2.2. Souches cible:16

I.2.3. Milieux de cultures utilisées:.....16

II. Méthodes: 19

II.1. Revivification des souches : 19

II .1.1. Mode opératoire : 19

II.2. Ensemencement :	19
II.3. Purification des souches:	20
II.4Conservation des souches:	20
II.5. Cinétique de croissance:	20
II.6. Tests d'antagonisme:	20
II.6.1. Test d'antagonisme sur MSH liquide (test de puits):	20
II.6.1.1. Préparation de la solution saline:	20
II.6.1.2. Préparation de la souche cible:	21
II.6.1.3. Préparation des souches tests:	21
II.6.2. Test d'antagonisme sur MSH solide (disque d'agar) :	21

Chapitre03:Résultats et discussion

I. Revivification des souches:	26
II. Ensemencement:	26
III. Purification des souches:	26
IV. Conservation des souches:	26
VI. Tests d'antagonisme:	31
VI.1. Sur milieu semi solide (disque d'agar):	31
VI.2. Sur milieu liquide: (Test de puits):	31
Conclusion :	41

Références bibliographiques

Annexes

Résumé



Introduction

Introduction :

Les études récentes se concentrent sur la recherche de nouvelles sources d'agents antimicrobiens naturels. L'une de ces études majeures concerne le criblage des activités halocines chez des isolats halophiles, c'est-à-dire la recherche de substances produites par des micro-organismes capables de résister à des conditions de haute salinité et pouvant éventuellement être utilisées dans des applications industrielles, pharmaceutiques ou environnementales (Birbir et al., 2004 ; Lee, 2013; Kumar et *al.*, 2021).

Dans ce contexte, avant d'aborder cette étude, revenons sur la découverte des organismes halophiles jusqu'au 20e siècle. On croyait alors que la vie n'était possible que dans des environnements "naturels", c'est-à-dire des conditions compatibles avec la vie humaine. Des chercheurs ont entrepris de trouver des créatures vivant en dehors de ces paramètres, dans des environnements présentant des contraintes physiques et/ou des caractéristiques chimiques radicales (Peduzzi et *al.*, 2006).

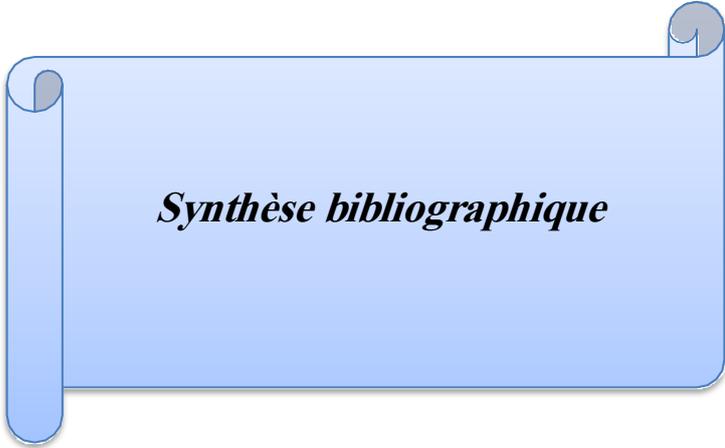
Les halophiles sont des organismes capables de survivre et de prospérer dans des environnements très salins tels que les lacs salés, les marais salants et les salines (Garcia, 2002). Ces micro-organismes sont non seulement tolérants à ces conditions difficiles, mais ils en ont également besoin pour leur croissance et leur développement (Echigo et al., 2005 ; Pikuta et *al.*, 2007 ; in Khallef et *al.*,2019). Les marais salants sont des environnements hostiles abritant des micro-organismes capables de survivre dans des conditions de haute salinité, de températures élevées et de fortes radiations solaires. Ces lieux sont explorés pour découvrir leur potentiel de production de nouvelles molécules bioactives (Mota et *al.*.,2004). Les halophiles sont très répandus dans ces environnements extrêmes et sont définis comme des organismes "amants du sel"(salt-loving).

Le terme "halophile" est généralement utilisé pour décrire les organismes nécessitant une quantité spécifique de sel, qui est généralement du chlorure de sodium. La distinction entre les différents groupes d'organismes halophiles est basée sur leur besoin ou leur tolérance au sel (Kushner, 2020).les bactéries qui prospèrent dans des environnements faiblement salins, en dessous de 1 % (p/v) de sel, ne sont généralement pas considérées comme halophiles. Ces micro-organismes sont un outil puissant dans la recherche fondamentale car ils fournissent un modèle unique pour l'étude de la stabilité des biomolécules dans des conditions environnementales difficiles.

Le terme "halocine" a été inventé pour la première fois par Francisco Rodriguez-Valera en 1982. Les halocines sont des peptides antimicrobiens produits par des bactéries halophiles et présentent une activité antimicrobienne contre d'autres bactéries (Rodriguez-Valera, 1982; Meseguer et *al.*, 1985 ; O'Conner et Shand, 2002 ; Bouktit et *al.*, 2003 ; Sun et *al.*, 2005).

La présente étude avait pour objectif majeur de cribler les activités halocines chez des isolats halophiles extraits de roches de sel de la wilaya de Djelfa. Cette étude a été subdivisée en trois parties principales :

- La première partie consistait à vérifier les souches pures.
- La deuxième partie était consacrée aux différentes méthodes utilisées pour rechercher une activité antibactérienne.
- La troisième partie présentait les résultats obtenus, suivis d'une discussion et enfin d'une conclusion relatant les perspectives du travail réalisé.



Synthèse bibliographique

I. Micro-organismes halophiles:

Sur notre planète, une variété de micro-organismes peuple différents écosystèmes aquatiques, Ces micro-organismes prospèrent dans des conditions physico-chimiques propices à leur croissance, qui comprennent généralement une disponibilité abondante en eau, des températures comprises entre 20 et 30 °C, une pression atmosphérique et un pH neutre (Rothschild et Mancinelli 2001, Satyanarayana et *al.*, 2005). Cependant, d'autres micro-organismes appelés extrémophiles sont capables de coloniser des environnements extrêmes caractérisés par des conditions physico-chimiques difficiles telles que la température, le pH, la salinité, la profondeur ou d'autres facteurs. Parmi ces environnements extrêmes, les environnements hypersalins sont habités par des micro-organismes connus sous le nom d'halophiles, qui peuvent être trouvés dans les marais salés, les lacs hypersalins (acides, neutres ou alcalins) et d'autres habitats similaires (Oren, 2002a). Depuis les années 1980, de nombreuses techniques ont été développées pour l'identification et la détermination de la composition des communautés microbiennes halophiles au sein des environnements hypersalins. L'étude de ces communautés est essentielle pour comprendre le fonctionnement de ces écosystèmes et les interactions entre les communautés microbiennes (Fernandez et *al.*, 2014, León et *al.*, 2014, Oren ,2015). Plusieurs études ont porté sur la biodiversité de ces micro-organismes dans les marais salants, qui sont des écosystèmes particulièrement intéressants pour étudier la diversité microbienne en relation avec la concentration en sel. Ces études ont démontré que les micro-organismes halophiles sont présents dans les trois domaines du vivant : archées, bactéries, et eucaryotes (Woese et *al.* ,1990,) (Figure 1), et leurs proportions et identités varient en fonction de la salinité. Pour des salinités inférieures à 190-200 g/L, la vie microbienne au sein de ces milieux est principalement représentée par différentes communautés de bactéries halophiles ou modérément halophiles (Oren 2008, 2015). Ces bactéries halophiles appartiennent à divers phylums : notamment les *Cyanobactéries*, les *Protéobactéries*, les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes*, et englobent de nombreux genres tels que *Shewanella*, *Halomonas*, *Idiomarina*, *Alcanivorax*, *Pseudomonas* ou *Marinobacter* (Tazi et *al.*, 2014). Plusieurs recherches sur la diversité microbienne, menées à l'aide d'approches moléculaires, ont révélé que la prédominance des micro-organismes halophiles est étroitement liée à la salinité. Aux salinités proches de la saturation en NaCl, ce sont principalement les archées halophiles qui dominent, tandis qu'à de faibles salinités, ce sont les bactéries halophiles qui prédominent, telles que les actinobactéries (Anton et *al.*, 1999 ; Ghai et *al.*,2011 ; Boujelben et *al.*,2012a, 2012b, 2014 ; Hozzein ,2015).

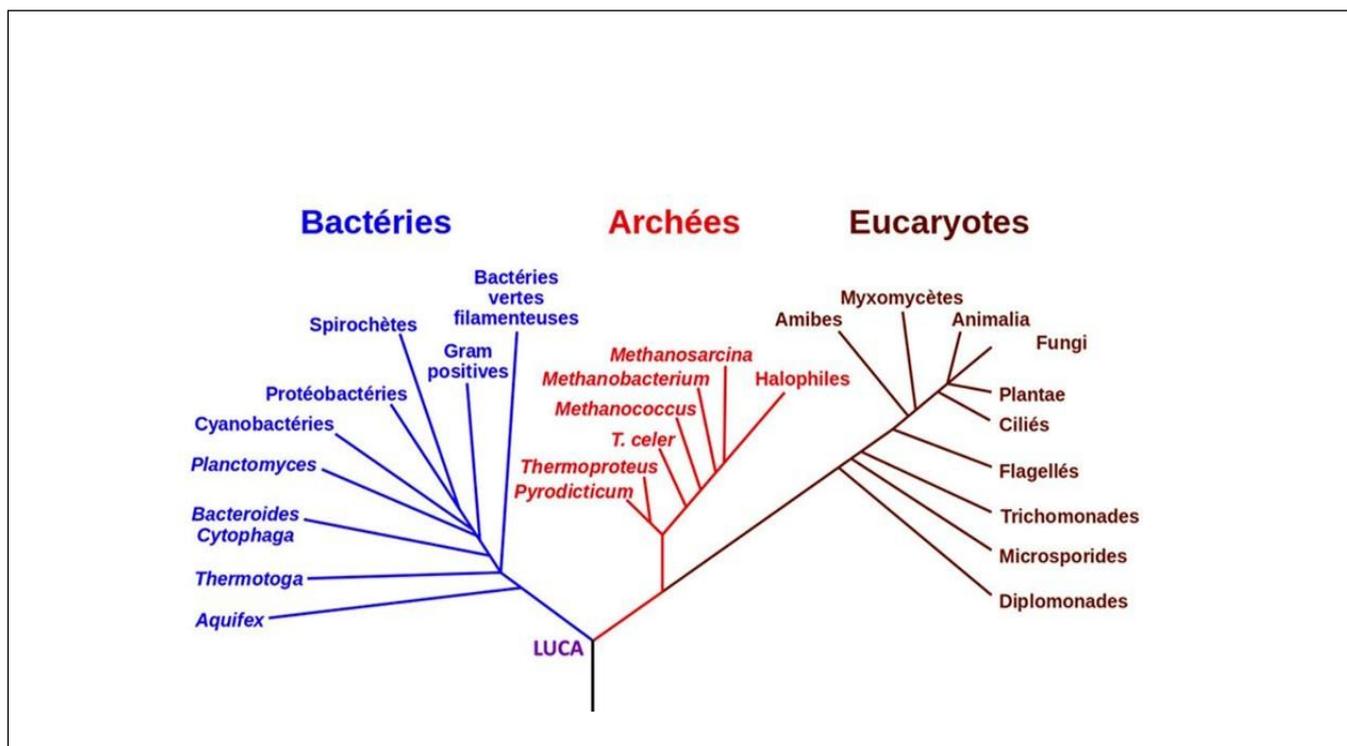


Figure N° 01: Représentation des 3 grands phylums du monde vivant avec un arbre « classique » (Woese et *al.*, 1990,).

Les bactéries halophiles des milieux hypersalins sont majoritairement représentées par trois groupes : les halotolérantes, les halophiles modérées et les halophiles extrêmes. (Anton et *al.*, 2002).

- **Bactéries halotolérantes :**

Les bactéries halotolérantes sont capables de tolérer des concentrations élevées de sel, mais elles ne nécessitent pas des niveaux extrêmes de salinité pour leur croissance optimale. Elles se répartissent dans différents groupes phylogénétiques et peuvent (Ventosa et *al.*, 1998). Se développer dans des concentrations de NaCl comprises entre 10 et 60 g/L.

- **Bactéries halophiles modérées :**

Les bactéries halophiles modérées peuvent pousser dans une gamme de salinité plus élevée, allant jusqu'à environ 220 g/L de NaCl (Ventosa et *al.*, 1998). Elles sont également présentes dans divers groupes phylogénétiques et ont des exigences en sel plus élevées que les halotolérantes.

- **Bactéries halophiles extrêmes :**

Les bactéries halophiles extrêmes, sont principalement représentées par le genre *Salinibacter* et l'espèce *Salinibacter ruber*, une bactérie halophile extrême isolée pour la première fois de la saline d'Alicante en Espagne (Anton et al., 2002). Les caroténoïdes se trouvent dans cette bactérie, Des caroténoïdes tels que bacteriorubérine et le caroténoïde C40-acyle glycoside sont présents au niveau de sa membrane cellulaire. Ce sont des pigments dont la fonction est de protéger les cellules contre les dommages dus à la photo-oxydation, contre les UV et par conséquent contre le stress oxydant (Oren, 2009 a,b). Cette bactérie subit une pigmentée en rouge grâce à la présence de ces pigments. *Salinibacter ruber* emploie la même méthode d'accumulation de KCl (stratégie «salt-in») que les archées halophiles aérobies afin de maintenir l'équilibre osmotique intracellulaire (Anton et al.,2002). De plus, cette souche présente des similitudes avec les archées halophiles de la classe des *Halobacteria* en ce qui concerne sa physiologie et ses conditions de culture (Colwell et al.,1979,Bardavid et al.,2007).Effectivement, cette bactérie est capable de tolérer des concentrations en sel très élevées, avec une croissance optimale dans des concentrations comprises entre 200 et 300g de NaCl, une température situées entre 37 et 47°C, et une gamme de pH entre 6 et 8. En outre, cette souche chimio-organotrophe est strictement aérobie. Des analyses de cellules de *Salinibacter* révèlent la présence de concentrations élevées en ions (K⁺) dans le cytoplasme. Des concentrations similaires ont été observées chez la souche d'archées halophiles extrêmes *Hbt. salinarum R1* (Anton et al., 2002). Ces espèces sont semblables aux archées halophiles et cohabitent le même environnement. La caractéristique partagée est le besoin en sel pour leur croissance et une capacité à tolérer des concentrations élevées en fonction de la température et des nutriments disponibles (Kushner, 2020). Ces bactéries affichent une croissance optimale à des concentrations de NaCl entre 100 et 300 g.L et elles utilisent les acides organiques comme sources de carbone et d'énergie (Romano et al.,1996, Sorokin et al., 2006).

Parmi les genres les plus en évidence de ces bactéries halophiles, on retrouve *Salinivibrio*, *Dichotomicrobium* et *Arhodomonas* (Ventosa et al., 1998, Kamekura ,1998). Ces espèces ont été isolées à partir de divers environnements hypersalins, tels que les lacs salés alcalins, la Mer Morte ou les marais salants (Arahal et al.,2002, Oren,2008). Cependant, quelques bactéries halophiles présentent une coloration de Gram positive, et se trouvent surtout dans le phylum des *Firmicutes* et la famille des *Bacillaceae* (Oren, 2002b).

1.1. Osmorégulation:

Les organismes qui poussent dans des environnements à haute salinité sont affectés par une forte pression osmotique. Pour atteindre un équilibre osmotique entre le cytoplasme et le milieu environnant contenant de fortes concentrations de Na^+ , les halophiles ont développé des stratégies qui conduisent à une pression osmotique intracellulaire élevée tout en maintenant de faibles concentrations de Na^+ dans le cytoplasme (Gunde- Cimerman et al.,2018). Les deux stratégies d'osmorégulation sont utilisées : l'accumulation de chlorure de potassium (KCl) ou d'osmorégulateurs organiques tels que les acides aminés, les polyalcools ou les sucres, dans le cytoplasme (Oren, 2006) .

Dans le cas de l'accumulation de KCl, les phénomènes d'osmoregulation s'effectuent à l'aide de pompes membranaires qui permettent les échanges bidirectionnels de molécules et d'ions. Ces différents échanges sont illustrés dans la Figure 02.Chez les archées halophiles extrêmes, le transport des électrons s'effectue par l'intermédiaire de la chaîne respiratoire et est accompagné par l'extrusion des protons (voie1.Figure02) .Les bacteriorhodopsines sont des protéines membranaires caractérisées par la présence de Rétinal qui sous l'effet de la lumière peuvent aussi être utilisées pour la génération d'un gradient de protons (voie 2. Figure 02). Le gradient de protons H^+ entraîne la formation d'ATP par l'ATP synthase (voie 3. Figure 02). A des concentrations en sel élevées, le flude ions Na^+ diffuse vers l'espace extracellulaire à l'aide de l'échangeur Na/H (voie 4, Figure 02). Cet échangeur permettrait également la régulation du pH intracellulaire .Le Na^+ extracellulaire peut également être utilisé pour permettre l'import de différentes substances organiques telles que les acides aminés (voie 5, Figure 02). L'export de Na^+ via l'échangeur Na/H est compensé par l'entrée à travers la membrane d'ions K^+ , ce qui permet le maintien de l'électro neutralité (voic6, Figure02).

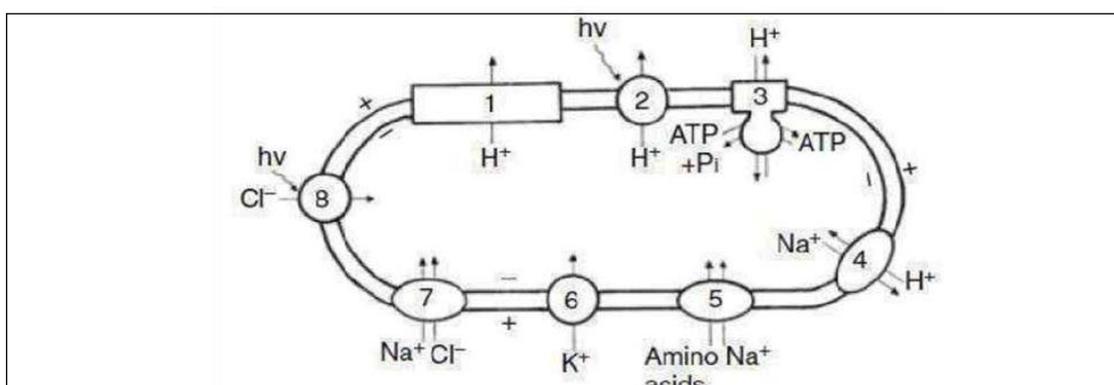


Figure N°02:Transport des ions et des acides aminés chez les archées halophiles selon la stratégie <<Saltin>>.Les numéros indiquent les différentes voies de la stratégie <<salt-in>> (Oren ,2006).

II. Bactériocines:

Les micro-organismes produisent en effet des toxines et des antimicrobiens dans le but de survivre dans leur environnement. Cela s'applique aux organismes cellulaires des trois domaines de la vie, (Shand et Levy, 2007). à savoir les bactéries, les archées et les eucaryotes.

Il est intéressant de noter que les bactériocines ont suscité un intérêt constant depuis leur découverte en 1925, non seulement en raison de leur efficacité contre les bactéries indésirables, mais aussi en raison de leur capacité à être synthétisées par différents types de micro-organismes tels que les bactéries Gram négatif, Gram positif et les archées.(Taale, E., et *al.*, 2016).

Les bactériocines produites par les bactéries sont de petits peptides thermostables que les bactéries utilisent dans le cadre de la compétition contre d'autres bactéries de la même espèce (à spectre étroit) ou contre des bactéries d'autres genres (à large spectre) (Taale, E., et *al.*, 2016).

Les bactériocines ont une activité bactéricide intra-espèces, ce qui signifie qu'elles agissent spécifiquement contre d'autres bactéries de la même espèce. (Kleanhammer, 1988 ; Riley, 1998). Cette spécificité est généralement liée à l'organisme qui les produit. Les bactériocines constituent le groupe le plus abondant et le plus divers de systèmes de défense bactériens (Riley et Wertz, 2002).

Le mode d'action des bactériocines varie, mais en général, elles ciblent la cellule bactérienne en identifiant des récepteurs spécifiques à sa surface. Une fois attachées, elles peuvent former des canaux ion-perméables dans la membrane cytoplasmique, ce qui provoque la lyse cellulaire. Elles peuvent également dégrader l'ADN ou inhiber la synthèse du peptidoglycane, qui est un constituant essentiel de la paroi cellulaire bactérienne (Riley ,1998).

III. Archéocines produites par les halobactéries:

Les halobactéries, un groupe de micro-organismes halophiles adaptés à des Environnements salins, fabriquent des substances antibactériennes appelées archéocines. Ces archéocines sont des peptides de nature protéique qui possèdent la capacité d'inhiber la croissance d'autres halobactéries (Rodriguez-Valera et *al.*, 1982 ; Tamar et Oren, 2000). Le terme "archéocine" a été utilisé pour distinguer ces peptides Antibactériens produits par les

archées (Archaea) des autres types d'antibiotiques produits par des micro-organismes halophiles (Archaea, bactéries) (Taale et *al.*, 2016).

IV. Halocine:

IV.1.Histoire d'halocine:

Les études sur les bactériocines ont commencé avec les travaux de Gratia en 1925 (Shand et Levya, 2007), Par la suite, la recherche s'est également intéressée aux eucaryocines, qui sont des protéines antimicrobiennes sécrétées par les eucaryotes, à partir du début des années 1960 (O'Connor et Shand, 2002). Cependant, la caractérisation des peptides et protéines inhibitrices produites par les Archaea, appelées "*archéocines*", n'a commencé que récemment (Shand et Levya, 2007).

Le terme "halocine" a été inventé en 1982 par Francisco Rodriguez-Valera. Il a supposé que ces substances étaient similaires aux bactériocines et a donc proposé une nomenclature similaire (Joyce et *al.*, 1997; Price et Shande, 2000) ; Cela faisait suite à des recherches mettant en évidence un antagonisme entre les souches halophiles isolées des marais salants d'Alicante, en Espagne (Torreblanca et *al.*, 1994).

Les archéocines sont produites par deux groupes phylogénétiques : les Euryarchaeota, comprenant les Haloarchaea (O'Connor et Shand, 2002 ; Shand et Levya, 2007), et les Crenarchaeota (hyperthermophiles) (Prangishvili et *al.*, 2000 ; Haseltine et *al.*, 2001; Paul, 2008). Cependant, sept autres halocines, dont une sulfolobicine, n'ont été que partiellement caractérisées. Par conséquent, la plupart des Archaea n'ont pas encore été examinées pour la production de ces molécules (Shand et Levya, 2007).

De plus, certaines souches de bâtonnets halophiles, probablement des halobactéries, produisent des substances qui inhibent la croissance d'autres halobactéries, mais pas celle des *halococcus* (Rodriguez-Valera et *al.*, 1982). La sécrétion de ces agents inhibiteurs peut se faire soit en phase exponentielle, soit en phase stationnaire de la croissance de l'organisme producteur (Haseltine et *al.*, 2001).

Bien que la production d'halocines soit largement répandue parmi les halobactéries en forme de bâtonnet. (Torreblanca, 1994 ; O'Connor et Shand, 2002 ; Kharroub, 2007) seules trois halocines ont été caractérisées en détail jusqu'à présent. Les deux premières halocines sont appelées H4 et H6, et elles sont produites respectivement par les genres *Haloferax* et *Halobacterium*. La troisième halocine, appelée HalR1, est produite par une autre espèce de

Halobactérium. Ces halocines ont été initialement détectées lors de cultures de ces microorganismes en phase de croissance exponentielle, ainsi qu'en entrant dans la phase stationnaire (Joyce et al., 1997).

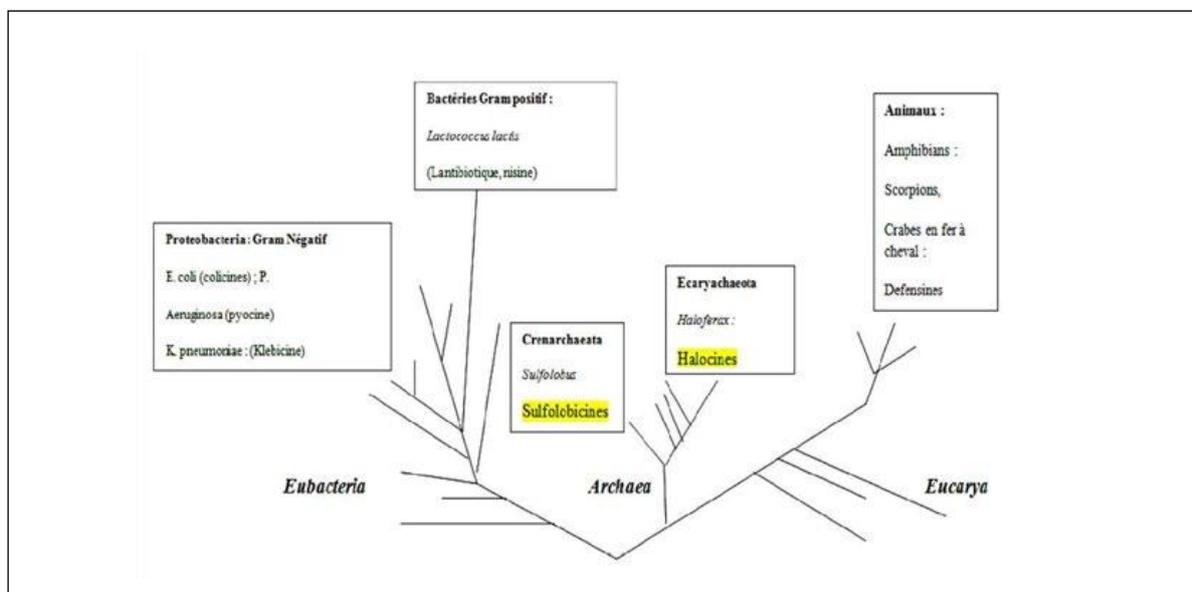


Figure N° 03: exemple de protéines et de peptides antimicrobiens(AMP) présents dans les trois domaines de la vie sur un arbre phylogénétique (Meknaci 2015).

IV.2. Types de halocines:

Lorsqu'on examine les communautés microbiennes dans les environnements salins, de nombreuses recherches ont été axées sur la biodiversité des communautés microbiennes au sein des environnements hyper salins afin de comprendre la dominance de la population des archées halophiles extrêmes productrices d'halocines. La production d'halocines pourrait constituer un mécanisme utilisé par ces archées pour dominer ces écosystèmes en inhibant leurs concurrents.

Cependant, même si certaines recherches ont suggéré que la production des halocines est une caractéristique universelle de toutes les archées halophiles (Messeguer et al., 1986 ; Torreblanca et al., 1994), seules quelques halocines ont été décrites, identifiées et caractérisées, et ce, uniquement de manière préliminaire (Torreblanca et al., 1994)

Les halocines ont été divisées en petites halocines peptidiques de petite taille de 3,6 kDa (micro-halocines) et en grandes halocines protéiques de 35 kDa (macro-halocines) (O'Connor et Chand, 2002; Chand et Livie, 2007).

IV.2.1. Micro-halocine:

Dans la nomenclature des bactériocines, les bactériocines ayant les poids moléculaires suivants comprennent Entre 5 KDa et 10 KDa sont placés dans une catégorie spéciale appelée microfilms (Price et Shande, 2000). Par conséquent, ils sont de poids moléculaire inférieur à 10KDa, hydrophobe et Robuste, résistant à la chaleur, au dessalement et à l'exposition aux solvants organiques.

Exister Contrairement aux bactériocines et aux cytokines eucaryotes, les microhalocine ont un grand nombre de résidus neutres et ne sont pas cationiques (O'Connor et Shand, 2002; Li et *al.*, 2003).

Les uniques halocines décrits au niveau peptidique sont C8 (Sun et *al.*, 2005) et (Price et Shande, 2000), au fil du temps, les chercheurs ont découvert d'autres types de micro-halocines On distingue les types suivants :

IV.2.1.1. Halocin S8 :

L'halocine S8 (HalS8), produite par la souche S8a isolée du Grand Lac Salé, est un microhalocine hydrophobe composée de 36 acides aminés (3,58KDa), représentant ainsi le premier micro-halocine a été décrit. Cet antibiotique peptidique est unique. Ils sont également localisés dans la protéine au niveau du résidu 311, à partir duquel ils sont libérés par un mécanisme inconnu (Shand et O'Connor, 2002). Halocin S8 est très fort car il peut dessaler, bouillir, résister solvants organiques, et stockage longue durée à 4°C sans aucun Perdre de l'activité. De plus, l'halocine S8 est résistante à la trypsine mais sensible à la protéase. L'activité de l'halocine est parallèle au niveau des transcrits du gène Hal S8, Leur activité est plus caractéristique pendant la période de repos (Price et Shand, 2000 ; O'Connor et Shand, 2002; Riley et *al.*, 2002).

IV.2.1.2. Halocine R1 :

Il s'agit de la deuxième halocine caractérisée produite à partir de la souche *Haloarchaeoma salinarum* isolée à l'origine à Néger de Guerrero (Mexique); est la microhalocine avec 38 acides aminés (3,8 kDa) (O'Connor et Shand., 2002; Sun et *al.*, 2005).

Telle la majorité des halocines, l'activité de Hal R1 est initialement observée dans le surnageant de la culture pendant la transition vers la phase stationnaire (Cheung et *al.*, 1997). par rapport à H6, l'halocine R1 ne semble pas être archéolitic, puisqu'elles ne provoquent pas de changements dans la densité optique de la cellule. Comme l'halocine S8, l'activité de HalR1 reste inchangée lors du dessalage, elle est également résistante aux acides, bases et solvants organiques, son activité est résistante à la DNAase, la RNase, des protéases spécifiques telles que la pipérine, la trypsine et la thermo-lysine ; mais un total de protéases telles que la protéinase.

L'activité de Hal R1 était stable à 48°C cette année, bien que moins thermostable que HalS8, HalR1 conserve une activité de 100° après incubation à 60°C pendant 24 heures à ; cependant, perd toute activité après 5 minutes à 93°C (O'Connor et Shand, 2002).

IV.2.1.3. HalocinC8:

Halocin C8 est une micro-halocine très stable avec une puissante activité antibactérienne de contre Halo-archaea (Mei et *al.*, 2008) et une activité hydrophobe allant jusqu'à lors de la transition de la phase exponentielle à la phase stationnaire (Sun et *al.*, 2005), excrété par *Halobacterium*.

C'est une microhalocine composée de 76 acides aminés et de 6,3 kDa. (Meknaci et *al.*, 2014) Il est sensible à la protéinase K mais pas à la trypsine. L'halocine C8 est assez stable car elle peut être dessalée, bouillie, congelée et traitée avec des solvants organiques et stockée dans le surnageant de culture à 4°C. L'halocine C8 a un très large spectre d'activité (Li et *al.*, 2003).

IV.2.1.4. HalocineA4 :

L'halocine A4 est produite par des halo-bactéries non caractérisées isolées par Pfeiffer dans les marais salants tunisiens. Son poids moléculaire est de 7 435 Da (très similaire à HalocinC8), (Meknaci, 2015).

IV.2.2. Macro-halocines:

Macro-halocines (≥ 10 KDa) Sont des protéines de plus de 10KDa, on peut identifier les halocines H1 et H4, jusqu'à présent, ces deux types sont déterminés au niveau protéique:

IV.2.2.1. HalocineH1 :

L'halocine H1 est une bactériocine produite par un halophile extrême qui a été isolée en méditerranée. Cette bactériocine est produite par l'archaea *Haloferax*, Pour une production

optimale de l'halocine H1, il faut la concentration en sel de 20% et une température comprise entre 37 et 42°C (Platassetal, 1996).

Le poids moléculaire de cette bactériocine atteint 31 KDa et un large spectre d'activité contre les haloarchées. L'activité de cette bactériocine est décelable pendant la phase exponentielle au lieu du début de la phase stationnaire. Comme pour la plupart des autres halocines (O'Connor et Shand 2002 ; Li et al., 2003).

IV.2.2.2. Halocine H4:

Halocine H4 a été étudié en tant que premier halocine produit à partir de *Haloferax mediterranea* R4 (ATCC33500). Cette souche a été isolée d'une mare salée ensoleillée à Alicante, en Espagne (Rodriguez-valera et al., 1982 ; Meseguer et Rodriguez-valera, 1985). est un antibiotique de nature protéique avec une masse moléculaire de 34.9 KDa (mûre) et 39.6 KDa (pré-protéine), mais à partir des études qui ont été faites par Rodriguez-Valera et Perey: La masse moléculaire est de 30 à 33.5 KDa (O'Connor et Shand, 2002). L'activité d'halocine H4 est produite en phase stationnaire (Meseguer et Rodriguez-valera, 1985 ; Cheung et al., 1997). Halocin H4 Propriétés : sensible aux protéases et à la chaleur, la durée de conservation du concentré Halocin H4 est de 115-159 jours à 48°C, bien qu'il n'y ait pas de perte d'activité à 51°C après 24 heures d'incubation, mais complètement disparaît à 60 °C après 24 heures. L'activité a également été perdue lorsque la concentration en sel a chuté de 5 % en dessous de (O'Connor et Shand, 2002).

IV.2.2.3. Halocine H6/H7:

L'halocine H6/H7 a été obtenue à partir du surnageant de culture de la souche *Haloferax gibbonsii* (Torreblanca et al., 1989), elle a d'abord été isolée et décrite par Torreblanca et al. 1989. L'activité se produit dans la transition de phase stationnaire, pics d'activité dans la phase stationnaire, puis diminue progressivement. C'est une substance d'un poids moléculaire de 32 kDa (O'Connor et Shand, 2002). De plus, le mécanisme d'action n'est connu que pour Halocin H6. (Shand et Price, 2000 ; Riley et al., 2002). L'halocine H6 inhibe la libération induite par la lumière de Na⁺ dans les vésicules membrane *halobium* de *Halobacterium* (Meseguer et al., 1995).

IV.3. Applications biotechnologiques des halocines:

En plus de cela, les halocines ont de nombreux avantages et propriétés qui peuvent être utilisés dans certaines applications biotechnologiques, notamment :

IV.3.1. Outil d'adsorption de l'ADN:

Pour connaître les transformations génétiques et les traitements des Archaea, certains des

hallucinogènes peuvent lui servir d'outil moléculaire .

Q22 a des propriétés uniques qui se sont avérées agir comme un nouveau stimulateur de l'absorption d'ADN par *H.Mediterranei* (Chen *et al.*, 2019 ; Kumar *et al.*, 2021).

IV.3.2. Conservateurs pour produits alimentaires salés :

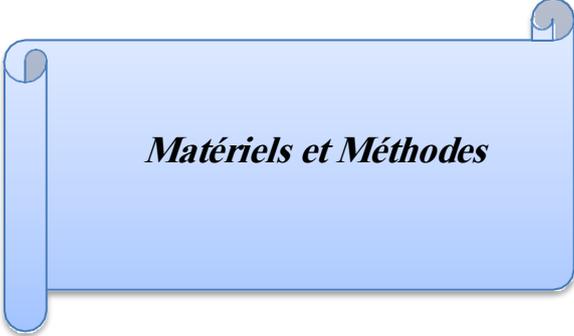
L'halocine est un conservateur alimentaire qui a la capacité de contrôler la voie des hallucinogènes dans les produits salés contaminés tels que le poisson et la viande salés et divers légumes salés ou fermentés. (Lee, 2013 ; Birbir *et al.*, 2004 ; Kumar *et al.*, 2021).

IV.3.3. Prévention des maladies cardiaques:

L'halocine a des avantages même dans le domaine médical, de sorte que jusqu'à présent il n'y a pas de médicament pour les maladies cardiaques à l'exception de l'halocineh6, c'est le seul pour de tels cas, afin qu'il cible l'ancien et eucaryote échangeur Na^+/H^+ (NHE), et agit pour réguler le pH intracellulaire et le volume des cellules, et Maintient l'équilibre sodique. (Meseguer *et al.*, 1995 ; Price et Shand, 2000 ; Lequerica *et al.*, 2006; V. Kumar *et al.*, 2021).

IV.3.4. Action anticancéreuse:

Karttikeya (2013) a mené les études nécessaires sur SH10, qui a montré une bonne efficacité contre de nombreux cancers, car il analyse les cellules cancéreuses telles que (cancer du poumon) A549, (cancer u larynx), Hep2. (Kumar *et al.*, 2021).



Matériels et Méthodes

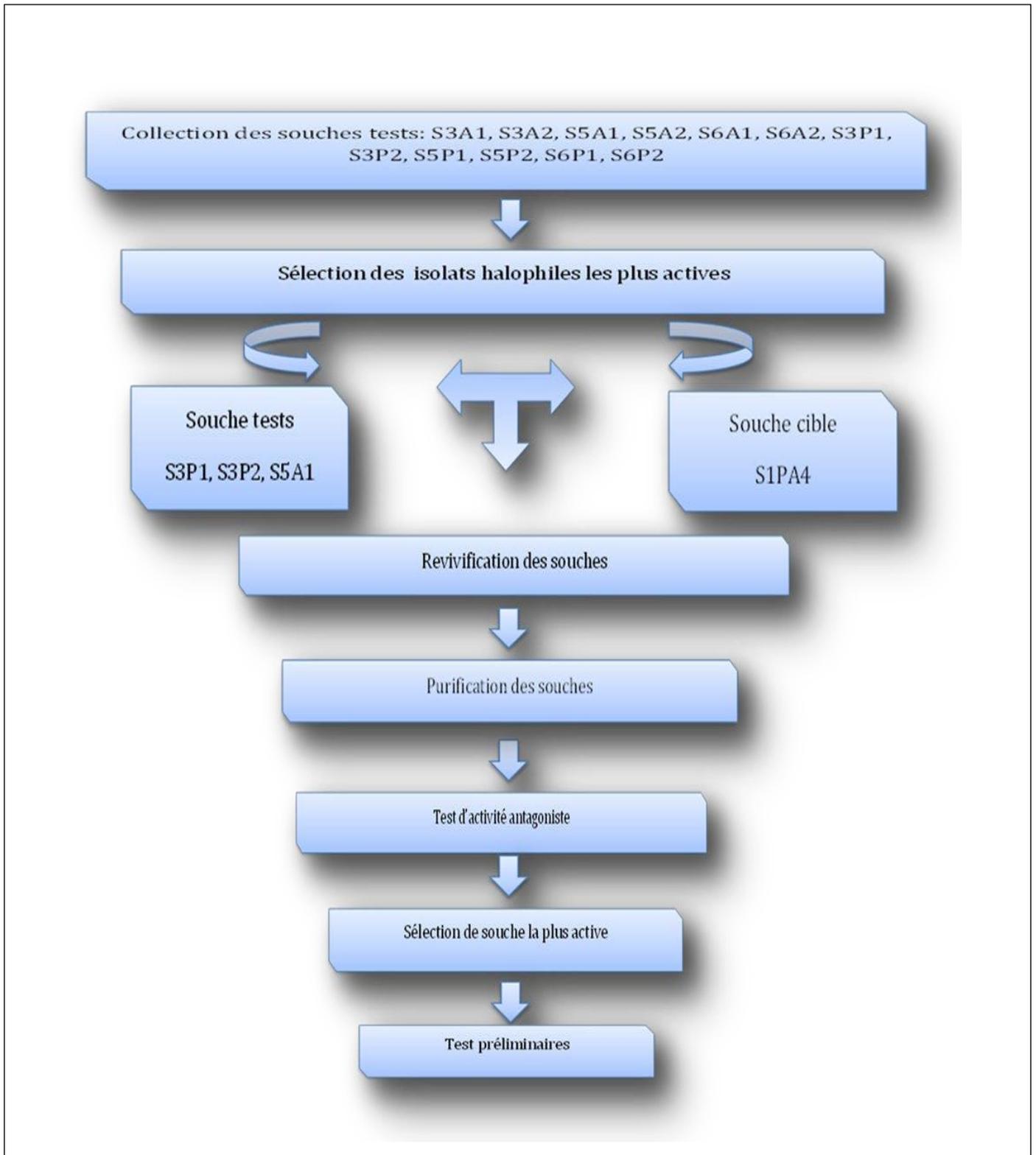


Figure N°04: Organigramme général de méthode du travail.

Le présent travail a 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 trois mois de l'année universitaire 2022_2023 et dans le laboratoire des doctorants 1.

Ce travail vise essentiellement la mise en évidence d'activité de substances antibactériennes «Halocines» produites par des souches bactériennes extrêmement halophiles isolées à partir de milieu hypersalées, à savoir le Rocher de Sel dans la wilaya de Djelfa.

I. Matériel:

I.1. Situation géographique des zones d'études:

I.1.1. Rocher de sel (Hadjer El melh):

Le Rocher de sel est situé à 25Km au nord de la ville de Djelfa, dans la commune d'Ain-Maabad, entre les coordonnées géographiques latitude : 34° 77'39.04" Nord et longitude : 3°17'37.89" Est, et s'élève à une altitude de 1083 mètres. Le nom de "Rocher de Sel" est courant, et il ne s'agit pas d'une traduction exacte du nom autochtone qui est Khanguet-el-Melah littéralement : le "défilé du sel". Cependant, les deux noms ont sans doute été suggérés en raison des falaises et canyons de sel gemme qui sont présents. D'autres noms sont utilisés par les habitants de Djelfa, le plus connu étant le nom de "HADJER EL-MELH", dont l'origine du nom arabe est inspirée par la nature des gisements de gemmes (Gauttier, 1914) .



Figure N°05: Situation géographique de rocher de sel (Google Earth).

I.2. Matériels biologiques:

I.2.1. Souches Tests:

En se basant sur les résultats des travaux d'Ammari khoulood Fatima et Bessaoud Messaouda et Bouabdelli Achwak, (2021/2022), trois isolats ont été choisis pour cette étude à savoir S3p1, S3p2 et S5A1, ces isolats ont montré une meilleure production de l'activité halocine (d'Ammari khoulood Fatima, Bessaoud Messaouda, et Bouabdelli Achwak) (2021/2022).

I.2.2. Souches cible:

En se basant sur les résultats des travaux de Ben khechiba Zakaria, Homida Siham, Touati Zahra,(2021/2022),sélection de l'isolat S1PA4.

I.2.3. Milieux de cultures utilisées:

L'étude des bactéries halophile nécessite l'utilisation de plus d'un milieu spécifique car elles sont connues pour avoir des besoins nutritionnels différents. (Oren et *al.*,1997). Le milieu approprié pour cette étude est le MSH car il contient des sels minéraux et une source organique complexe (extrait de levure). (Kharoub ,2007). Le pH doit être ajusté à 7 (Hacéne et *al.*,2004).

Tableau N°01: Composition du milieu MSH

Produit chimique	Quantité en(g)
NaCl	200
MgSO ₄ 7H ₂ O	50
MgC ₁₂ 6H ₂ O	32
KCl	05
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,8
NaBr	0,6
NaHCO ₃	0,16
Extrait de levure	05

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

I.2.3.1. Préparation:

Afin de préparer le milieu de culture, nous avons suivi les étapes suivantes:

- Dans un Erlenmeyer sa capacité est de 1 litre nous mettons environ 700ml d'eau distillée ajoutons les ingrédients mentionnés ci-dessus à une température de 200°C et sous agitation à 1400 tours par minute.
- Enfin nous ajoutons le NaCl pour éviter la précipitation des sels ; et laissons bien le mélange se déplacer jusqu'à ce qu'il homogénéise Ajoutez 20g d'agar et agitez bien pour obtenir un milieu très homogène. Pour éviter l'évaporation de la solution nous fermons l'ouverture de l'erenmeyer avec du papier aluminium.
- A l'ébullition ajouter 300 ml du volume d'eau distillée manquant pour faire 1 L. (Figure N°06)
- Le milieu est réparti dans des flacons de 200ml à raison de 150 ml par flacon.
- Stériliser les flacons à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes. (Figure N°07)
- Verser environ 20 ml du milieu stérilisé dans les boîtes de Pétri (sous hotte)
- Laissez les boîtes refroidir. (Figure N°08)



FigureN°06:Milieu après agitation.



FigureN°07:Milieu après L'autoclavage



FigureN°08:Laissez les boites refroidir.

II. Méthodes:

II.1. Revivification des souches :

La résurrection des souches ressuscitées a été réalisée sur des milieux spécifiques pour obtenir de jeunes cultures (Benhammou et Bekkara, 2009).

Cette étape a été effectuée afin de mettre à l'échelle les souches que nous avons étudiées (S3P2, S3P1, S5A1, S1PA4) de la phase d'en durance à la phase d'activation comme suit: Tout d'abord, les souches conservées dans de la gélose inclinée ont été sorties du réfrigérateur et laissées reposer pendant 2 heures pour atteindre la température ambiante. Après cette période, ensemencher les souches sur des boîtes de Pétri déjà gélosées avec du MSH solide, étiquetées avec le code de la souche, la date d'inoculation et Nom binomial. Ensemencement selon la méthode des trois quadrants.

II .1.1. Mode opératoire :

A l'aide d'une boucle de platine, retirer l'inoculum du tube incliné contenant la souche cible (après brûlage en anneau, bien sûr) et inoculer en série unidirectionnelle par la méthode des trois quadrants, puis placer le para film sur la boîte à plaques et il sera être prêt Placer les boîtes dans un sac hermétique avec du papier humide pour éviter que la gélose ne se des sèche et les placer à l'envers(couvercle vers le bas) dans une étuve à 40°C pendant 21 jours, Lire les résultats : Après l'incubation : sont observés par l'apparition des colonies sur la gélose.

II.2. Ensemencement :

Ensuite, ensemencher la colonie sous forme de trois quarts de lignes série unilatérales sur un milieu d'agar MSH. Et ce plan se fait après avoir retiré la colonie à l'aide d'un anneau de platine, puis les liasses de boîtes sont enveloppées de para film et placées dans un sac bien fermé contenant du coton humide pour éviter le dessèchement de la gélose, puis insérées dans une étuve à une température de 40 degrés Celsius, en mettant l'accent sur le placement des boîtes à l'envers pendant 8jours .

II.3. Purification des souches:

Les isolats ont été purifiés par inoculation dans un milieu gélosé MSH approprié. Les colonies apparaissent après environ 7 jours dans une étuve à 40°C, puis cultivent les souches sur d'autres boîtes de gélose, puis les incubent à 40°C jusqu'à l'émergence d'autres colonies bien isolées.(Purification des souches S3P1,S3P2,S5A1,S1PA4).

II.4Conservation des souches:

On plante les souches en ligne à la surface de tubes inclinés contenant un milieu solide MSH, elles sont conservées à une température de 40 C° Celsius pendant une durée de 7jours, puis placées au réfrigérateur.(Figure N°09).

II.5. Cinétique de croissance:

3 flacons bien stérilisés sont préparés, contenant chacun 50 ml de milieu de culture liquide, etensemencés avec les souches actives 'S3P1, S3P2, S5A1', puis les flacons sont placés dans une étuve sous agitation à 40 °C à une vitesse de 150 cycles/min pendant 15jours.Nous prélevons chaque jour des échantillons stériles pour mesurer la densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre à 680 nm.

II.6. Tests d'antagonisme:

Il existe différentes méthodes pour évaluer l'activité antibactérienne in vitro. Selon les conditions expérimentales utilisées par l'opérateur, différents résultats peuvent être obtenus (Suhr et Niels en,2003).Les plus couramment utilisées sont la méthode de diffusion sur gélose et la méthode des puits.

II.6.1. Test d'antagonisme sur MSH liquide (test de puits):

En testant le puits, nous avons mené une étude de l'efficacité antibactérienne contre la souche cible, et cela s'est fait en deux étapes :

II.6.1.1. Préparation de la solution saline:

Mettez 150 grammes de sel dans environ 1 litre d'eau stérilisée et remuez bien jusqu'à homogénéité.

II.6.1.2. Préparation de la souche cible:

On prend des colonies bien nettoyées de la souche cible S1pA4 puis on les met dans un tube à essai contenant environ 3 ml de solution saline, puis on agite bien avec un vortex. Ensuite, nous prenons 1 ml de la solution et la vidons dans des boîtes de Pétri contenant du MSH semi-solide. Laisser sécher les boîtes de Pétri pendant environ deux heures, puis marquer les puits à l'aide d'une pipette Pasteur stérile.

II.6.1.3. Préparation des souches tests:

Nous utilisons des flacons de 250 ml contenant chacun 50 ml de MSH liquide stérile inoculé par les souches testées (S3P2, S3P1, S5A1), vortex er et bien agiter et mesurer Do préparation (t0), après incubation dans un incubateur à agitation Stuart-SI500)40°C pendant 15 jours. Prendre 1,5 ml par jour pour surveiller la croissance bactérienne, mettre en un Cuvette de mesure de DO à 680 nm par spectrophotométrie de type BECKMAN La croissance a été arrêtée et une autre a été stockée dans un tube eppendorf. Enfin ce sont Centrifuger à 5000 rpm (SIGMA320) pendant 20 min à 4°C. Pour chaque souche testée. Prélever 400 µl de surnageant de (jour 0 à jour 15) et déposer dans des puits A la surface de la boîte; 2 heures à température ambiante sous une hotte (pour permettre Diffusion d'agents antibactériens sur gélose). Ensuite, placez la boîte dans un sac en plastique .et cultivé à 40°C pendant 5 jours. L'activité inhibitrice n'a été observée que lorsque des zones d'inhibition étaient présentes. (FigureN°09).

II.6.2. Test d'antagonisme sur MSH solide (disque d'agar) :

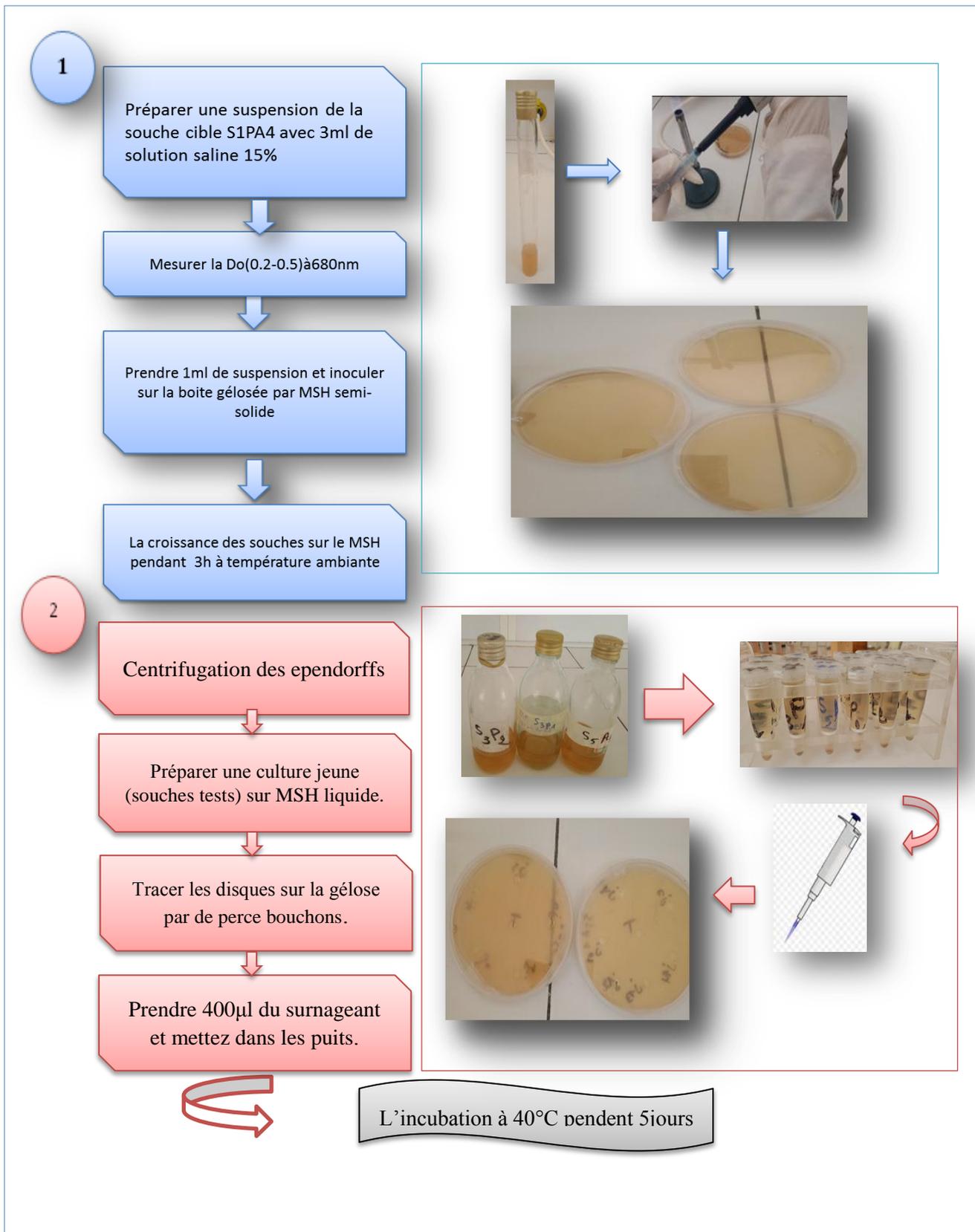
Ce type de production d'agent antibactérien est réalisé par la méthode du disque d'agar (Tortorano et *al.*, 1979), dont le principe est basé sur l'étalement de l'agent antibactérien sur du MSH semi-solide inoculé avec la souche cible S1PA4.

On met une seringue de la souche cible S1PA4 et on la met dans un tube à vide contenant 3 ml de solution saline 15, on fait bien tourner le mélange jusqu'à ce qu'il devienne homogène, puis on mesure la DO de cette suspension bactérienne, et la DO doit être comprise entre 0,2 et 0,5. Nous prélevons 1 ml de cette suspension bactérienne à l'aide d'une micropipette stérile et on l'étale sur la surface du milieu MSH gélosé.

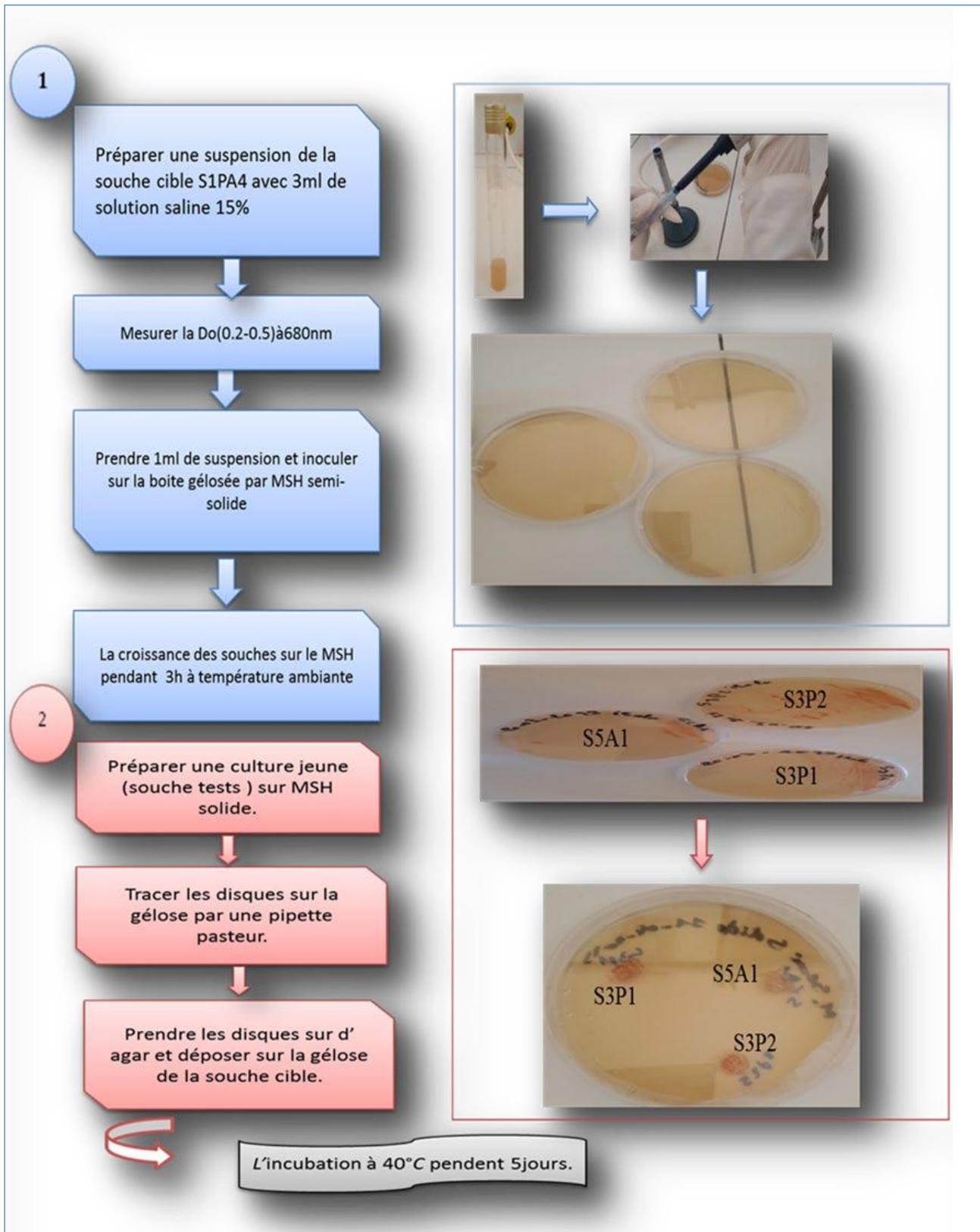
Nous laissons les boîtes pendant un certain temps jusqu'à ce qu'elles sèchent, environ deux heures. A partir de chaque souche testée, on prend un disque de gélose et on la place sur la boîte préalablement fixée à la souche cible.

Afin de permettre à l'agent antibactérien de se propager, nous avons placé les boîtes dans des sacs en plastique à 4 °C pendant 4 heures, après quoi elles ont été incubées dans une étuve à 40 °C pendant 5 jours.

Des zones d'inhibition apparaissent autour des disques de gélose, à travers lesquelles l'activité antibactérienne peut être estimée en mesurant leurs diamètres. (Figure N°10).



FigureN°09:Méthode d'antibiogramme (technique des puits).



FigureN°10:Méthode d'antibiogramme (technique des disques d'agar)

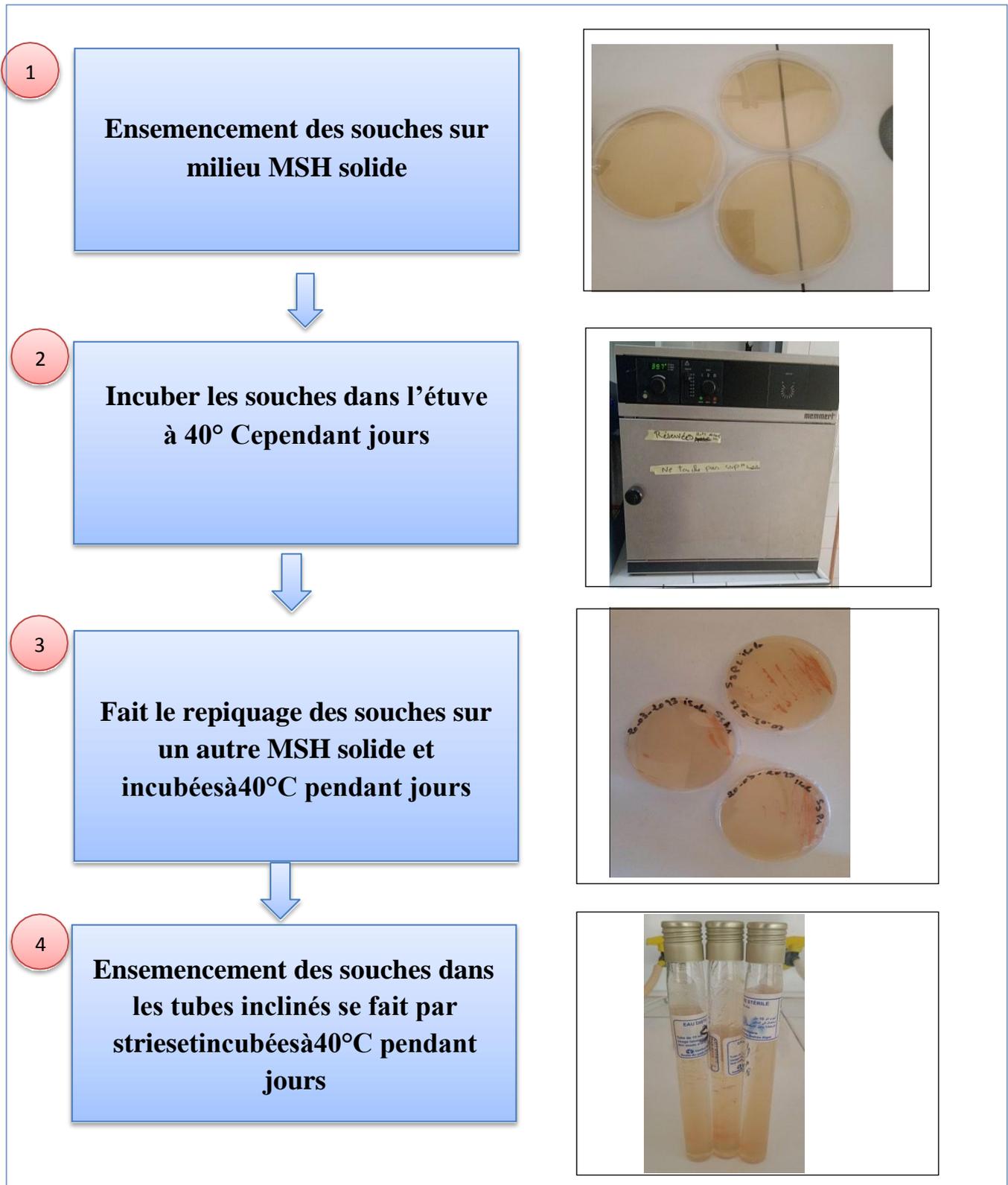


Figure N°11: Conservation des souches sur MSH solide



Résultats et discussion

I. Revivification des souches:

Après 7 jours d'incubation, nous avons observé l'apparition de colonies. La croissance des souches indique que le milieu MSH est similaire à des milieux favorables aux halophiles, car il contient les constituants nécessaires à la croissance bactérienne, tels que le NaCl, le MgSO₄ et le KCl (Hacène et *al.*, 2004). De plus, la température d'incubation de 40°C est très appropriée pour la croissance des souches halophiles. (Figure N°12).

II. Ensemencement:

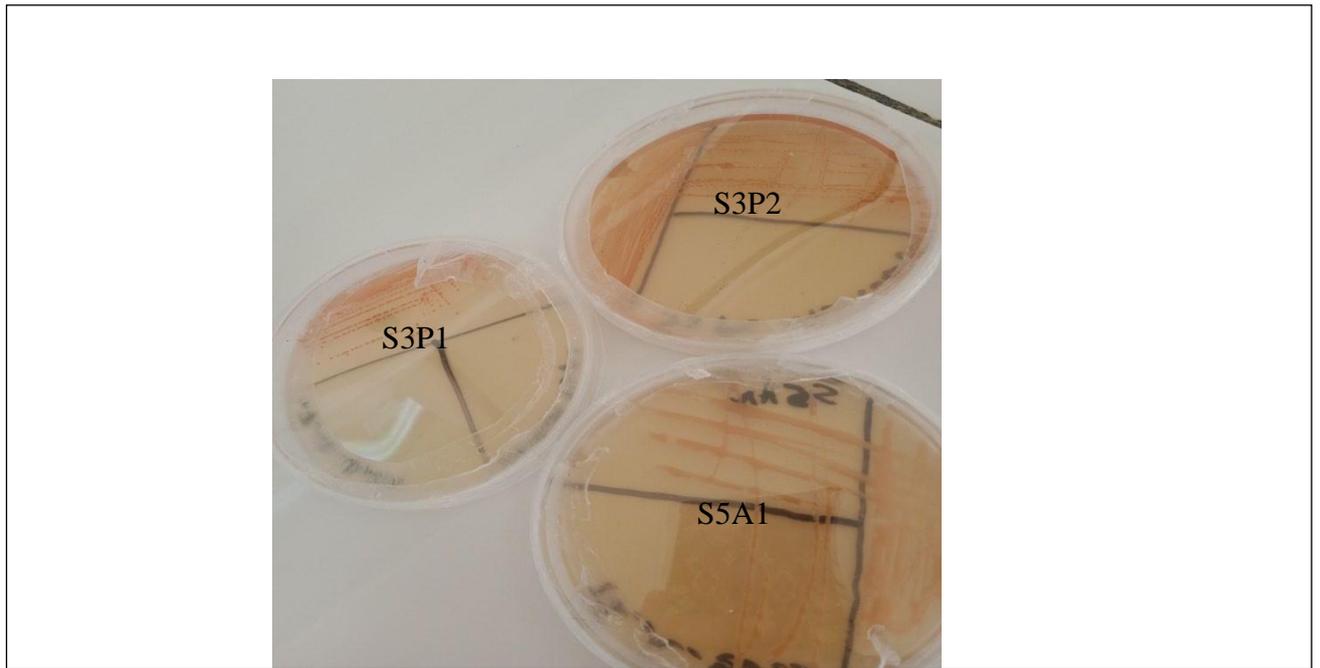
Après 7 jours d'incubation, on observe une très faible croissance des souches S3P1 et S5A1 et S3P2. (Figure N°13).

III. Purification des souches:

Une série de repiquage a été effectuée afin de bien purifier les souches (S3P2, S3P1, S5A1, S1PA4). (Figure N°14), (Figure N°15).

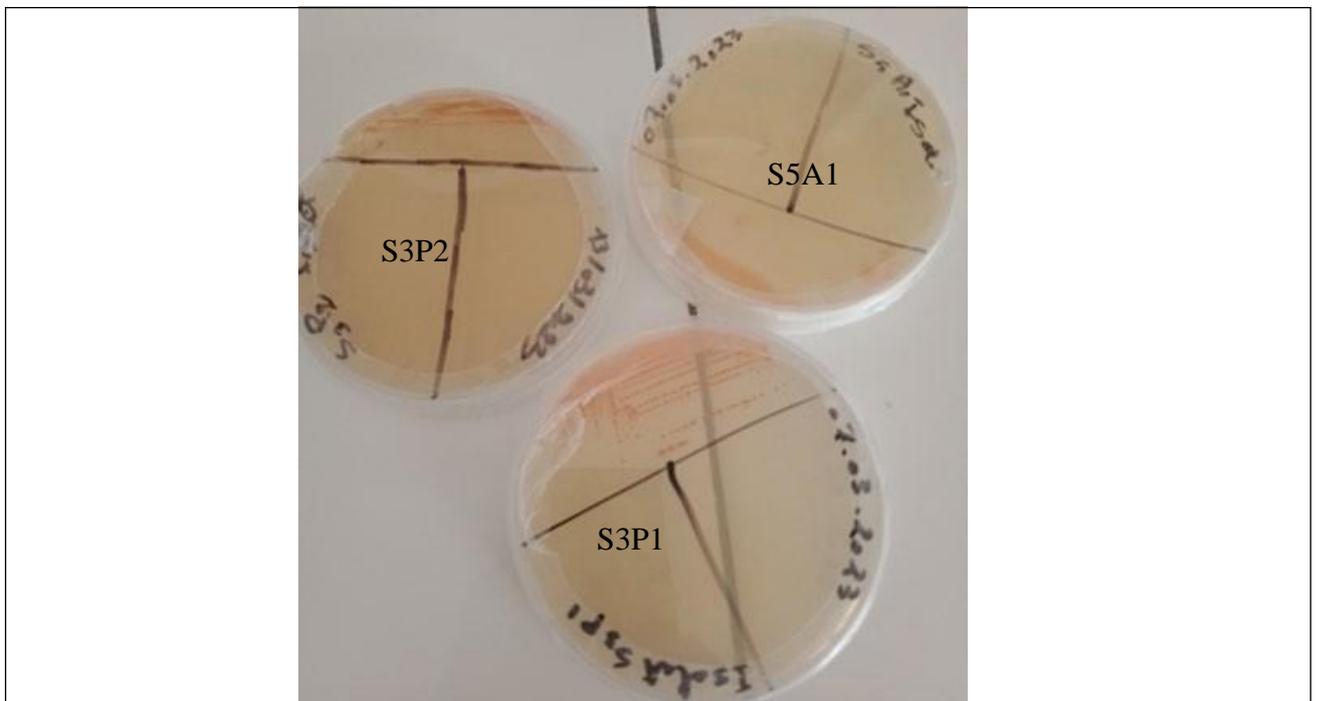
IV. Conservation des souches:

A partir de la (Figure N°16), on remarque l'apparition de colonies dans le tube incliné, ce qui indique que les conditions d'incubation sont parfaites. Réfrigérateur pour le plaisir après le travail.



FigureN°12:La revivification des souches tests (S3P1, S3P2, S5A1)

Par la méthode de trois quadrants.



FigureN°13:Ensemencement des souches tests (S3P1, S3P2, S5A1)

Par la méthode de trois quadrants.

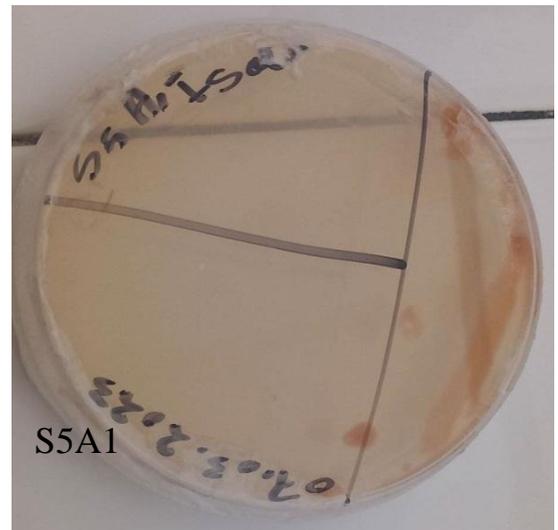
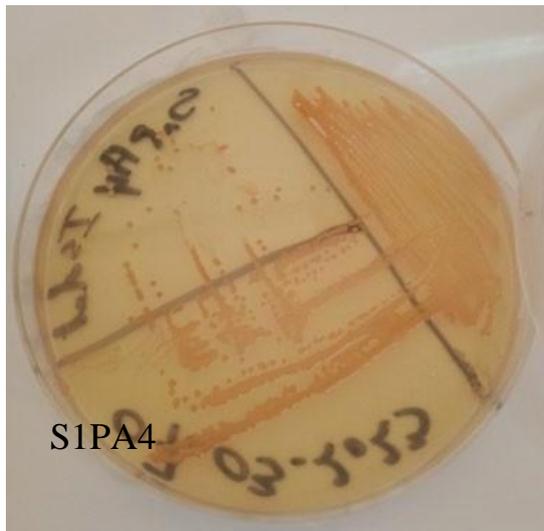
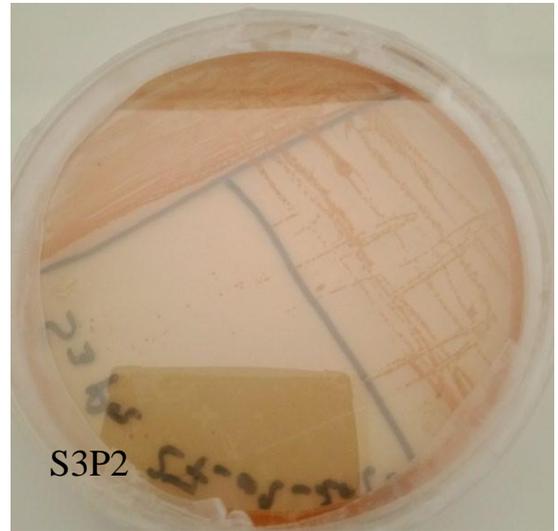
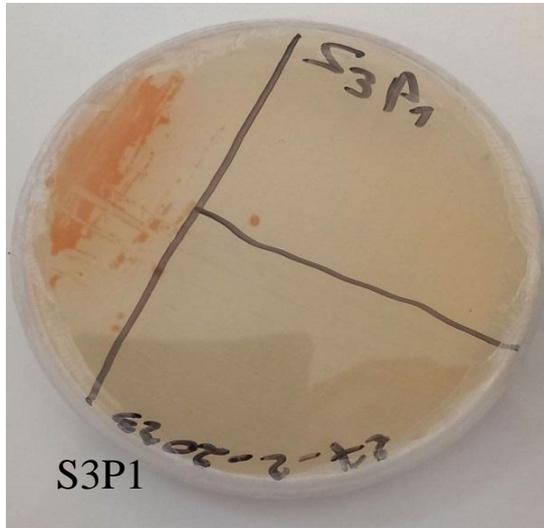


Figure N°14: Série de repiquage Par la méthode de trois quadrants.

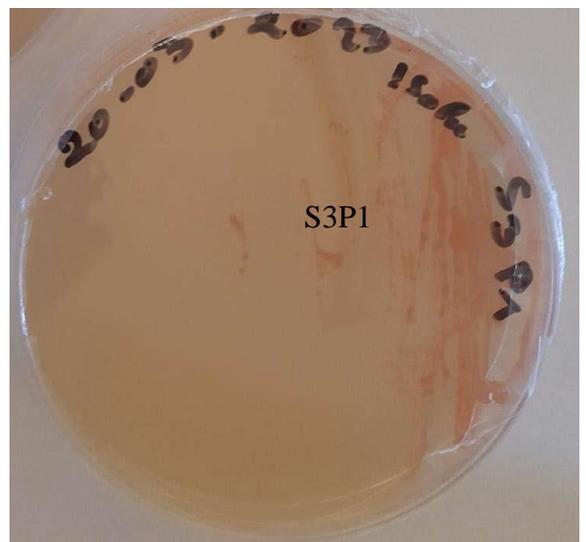
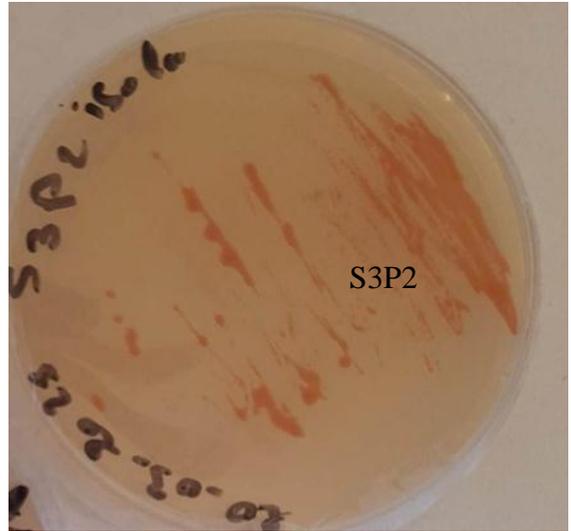
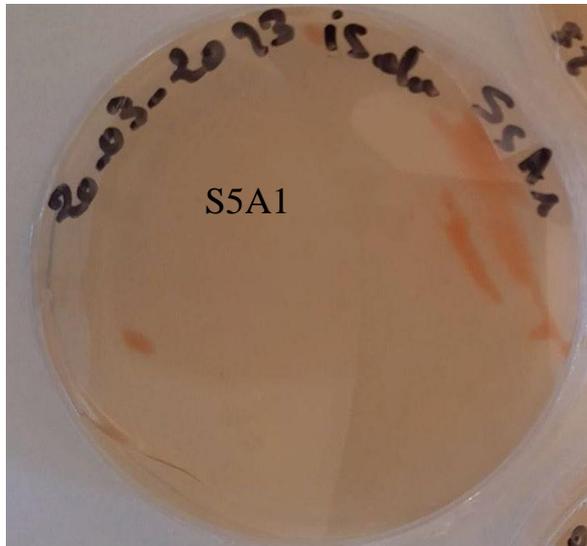


Figure N°15: série de repiquage



Après 7 jours
d'incubation 40°C.



Figure N°16: Conservation des
souches

VI. Tests d'antagonisme:

VI.1. Sur milieu semi solide (disque d'agar):

Nous avons utilisé la technique des disques de gélose afin de connaître et de déterminer l'anti-activité des souches testées. Les résultats de cette étude sont présentés dans la (Figure N° :18).

Les souches testées ont produit une fraction inhibitrice, (l'halocine), qui a été observée par la présence d'une zone d'inhibition autour des disques d'agar.

La souche test S3P2 a donné une plus grande activité avec un diamètre d'inhibition de 11,05 mm par rapport aux deux souches test S3P1 S5A1 car elles avaient presque la même activité avec un diamètre d'inhibition de 8,84 mm.

VI.2. Sur milieu liquide: (Test de puits):

Nous avons utilisé la méthode de la gélose bien dispersée, afin de connaître l'efficacité de l'halocine en milieu liquide .les résultats sont reportés sur les (Figure N° : 20, 22,24) En mesurant les diamètres d'inhibition, nous avons remarqué que le surnageant de culture apparaissait dans la souche S3P2 avec un halo de 17,68 mm de diamètre par rapport aux autres souches S3P1, S5A1, dont les diamètres variaient entre 13,16 mm. Grâce à des expériences sur des milieux solides et liquides, il a été constaté que la souche S3P2 est la plus active, par rapport aux autres souches qui ont été testées sur la souche cible S1PA4La production d'halocine et la cinétique de croissance des souches étudiées semblent être étroitement liée, selon les résultats observés. Les souches S3P1 et S5A1 commencent à produire de l'halocine dès le 7e jour de croissance, avec un diamètre d'inhibition compris entre 8 et 12 mm. La production atteint son maximum le 13e jour, avec un diamètre d'inhibition de 13 à 16 mm. Ensuite, la production d'halocine diminue légèrement, et au 14e jour, le diamètre d'inhibition est compris entre 10 et 14 mm.

Pour la souche S3P2, la production d'halocine commence dès les premières 24 heures de la phase exponentielle de croissance bactérienne. Au cours de cette période, un halo d'inhibition apparaît, ce qui signifie qu'il y a une zone autour des colonies bactériennes où la croissance des autres organismes est empêchée. Ce halo d'inhibition mesure entre 8 et 14 mm au départ, et il atteint son diamètre maximal le 13ème jour, mesurant entre 16 et 18 mm. Après le 13ème jour, la production d'halocine commence à diminuer légèrement. Au 15ème jour, le diamètre d'inhibition se situe entre 10 et 15 mm.

D'autres études sur une halocine H1 ont également montré une production d'activité inhibitrice. (Redriguez-Valera et *al.*, 1982 ; Platas et *al.*, 2002). Ces résultats suggèrent que la sécrétion de ces agents inhibiteurs peut se produire soit en phase exponentielle, soit en phase stationnaire de la croissance de l'organisme producteur.(Haseltine et *al.*, 2001).

Bien que la production d'halocine soit une caractéristique courante chez les halobactéries, seules trois halocines ont été caractérisées en détail jusqu'à présent : H4, H6 produites par *Haloferax* et HalR1 produite par *Halobacterium*. (Torreblanca, 1994 ; O'Connor et Shand, 2002 ; Kharroub, 2007) Toutes ces halocines ont été détectées lorsque les cultures étaient en phase de croissance exponentielle ou entrant dans la phase stationnaire. (Joyce et *al.*, 1997).

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

En conclusion, la production de la substance inhibitrice (halocine) par les souches étudiées suit la cinétique de croissance. L'activité inhibitrice débute pendant la phase de croissance, ce qui indique que cette substance inhibitrice est un métabolite primaire pour les microorganismes producteurs.

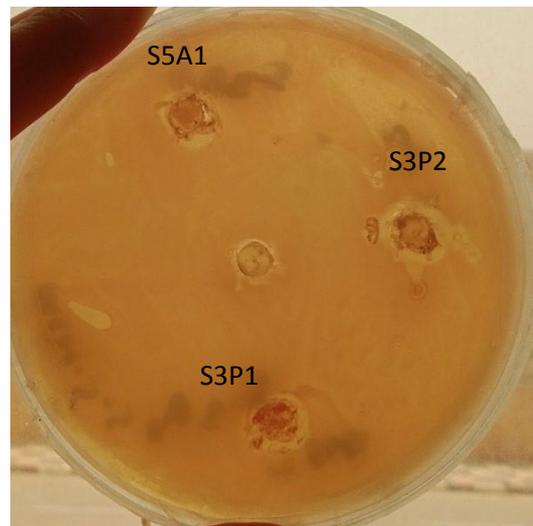


Figure N°17:Résultat de test d'activité (disque d'agar) Sur milieu semi solide

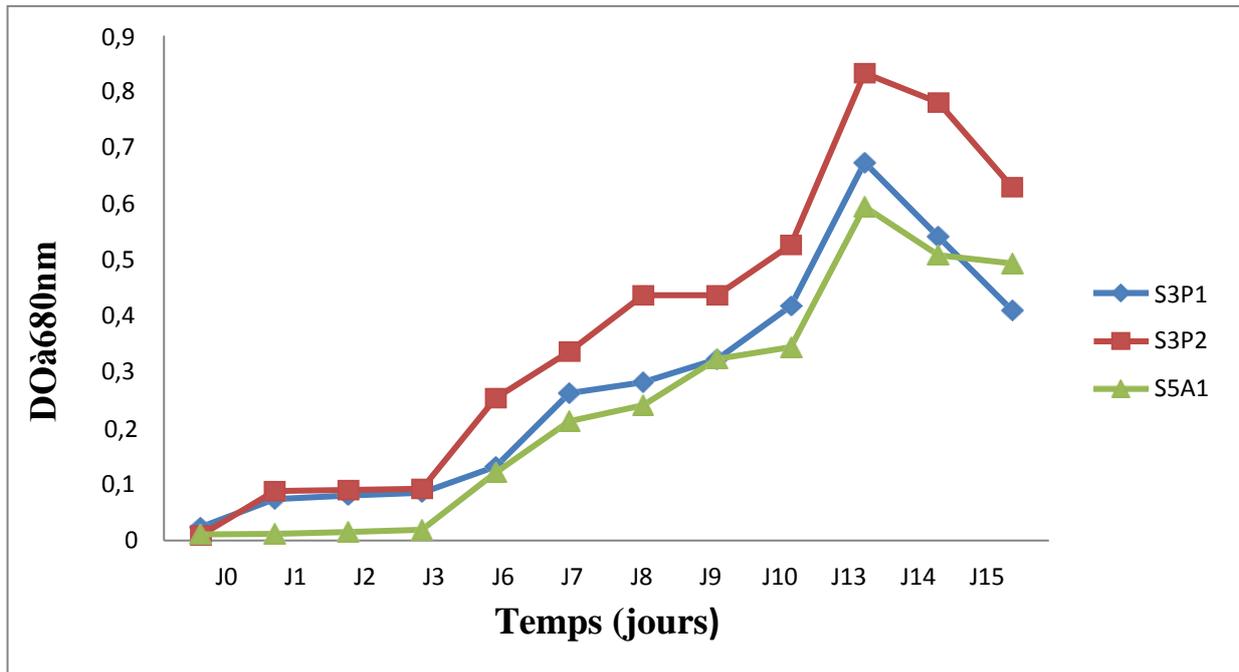


Figure N°18 :Cinétique de croissance pour les souches étudiées.

Tableau N°02: Cinétique de croissance pour les souches étudiées.

<i>JOURS</i>	<i>S3P1</i>	<i>S3P2</i>	<i>S5A1</i>
J0	0,024	0,009	0,011
J1	0,074	0,088	0,012
J2	0,08	0,09	0,015
J3	0,085	0,092	0,019
J6	0,132	0,254	0,121
J7	0,263	0,337	0,213
J8	0,282	0,437	0,241
J9	0,323	0,437	0,324
J10	0,418	0,527	0,345
J13	0,674	0,833	0,595
J14	0,542	0,781	0,509
J15	0,41	0,63	0,494

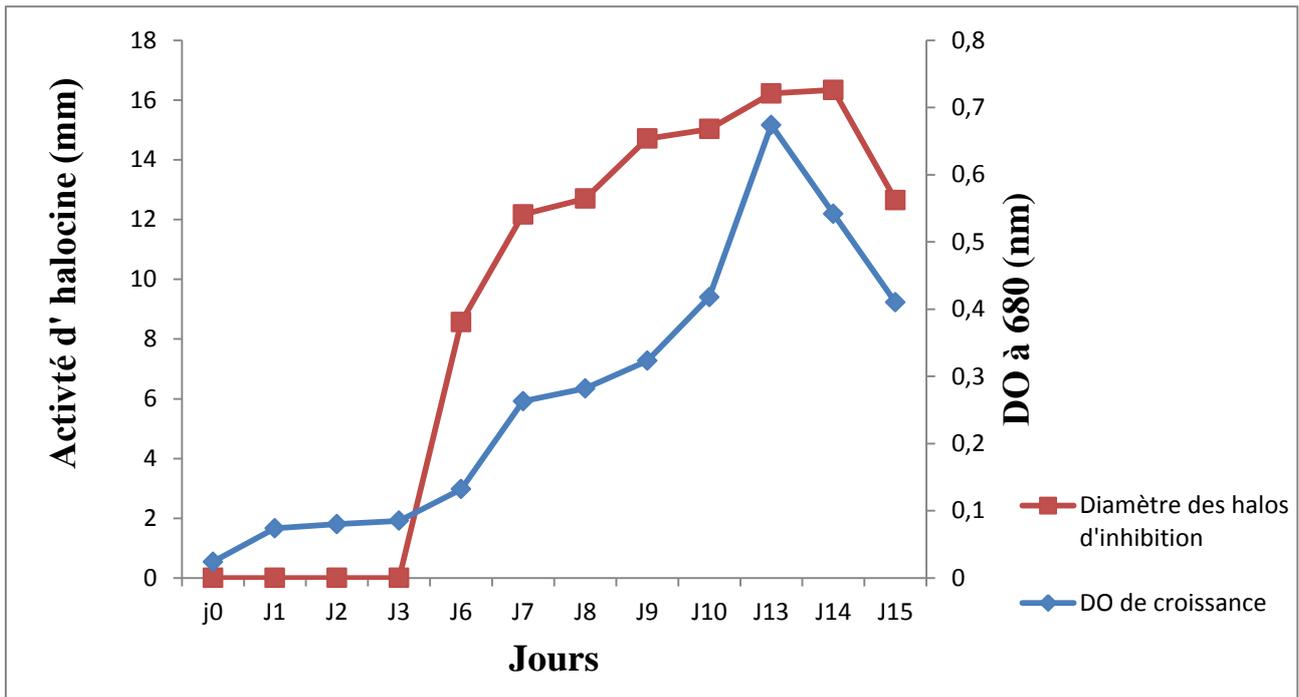


Figure N°19: Cinétique de croissance et de production de composé actif par la souche S3P1

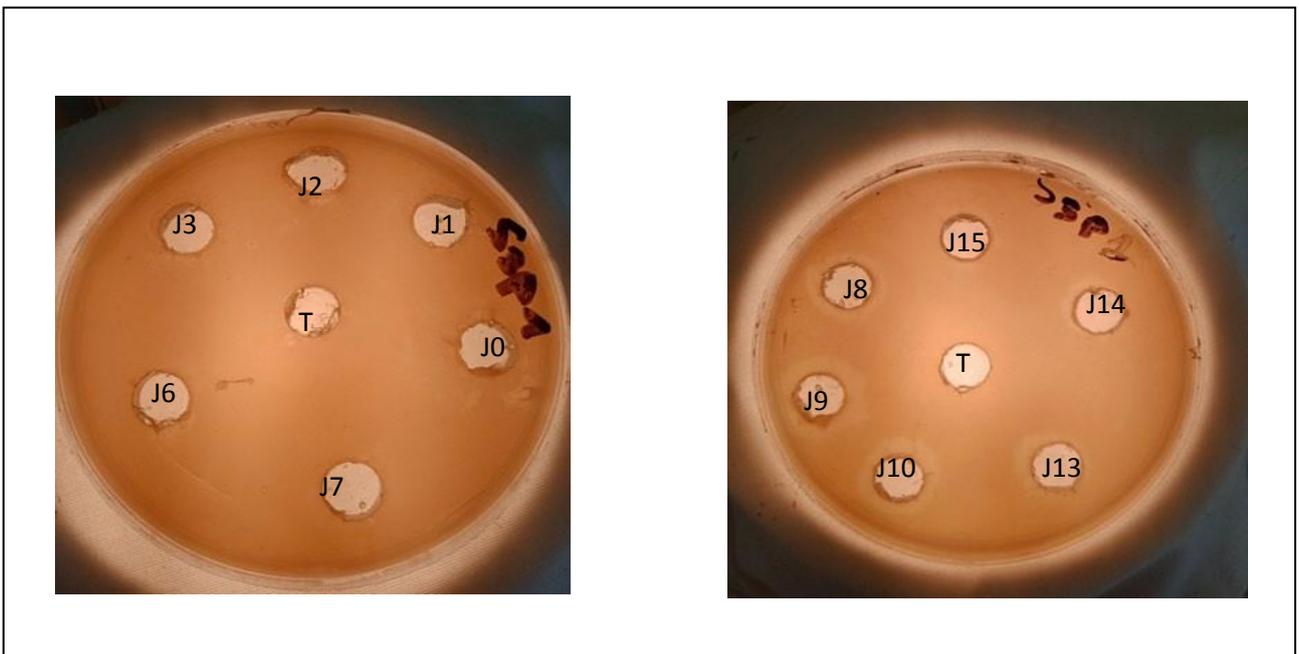
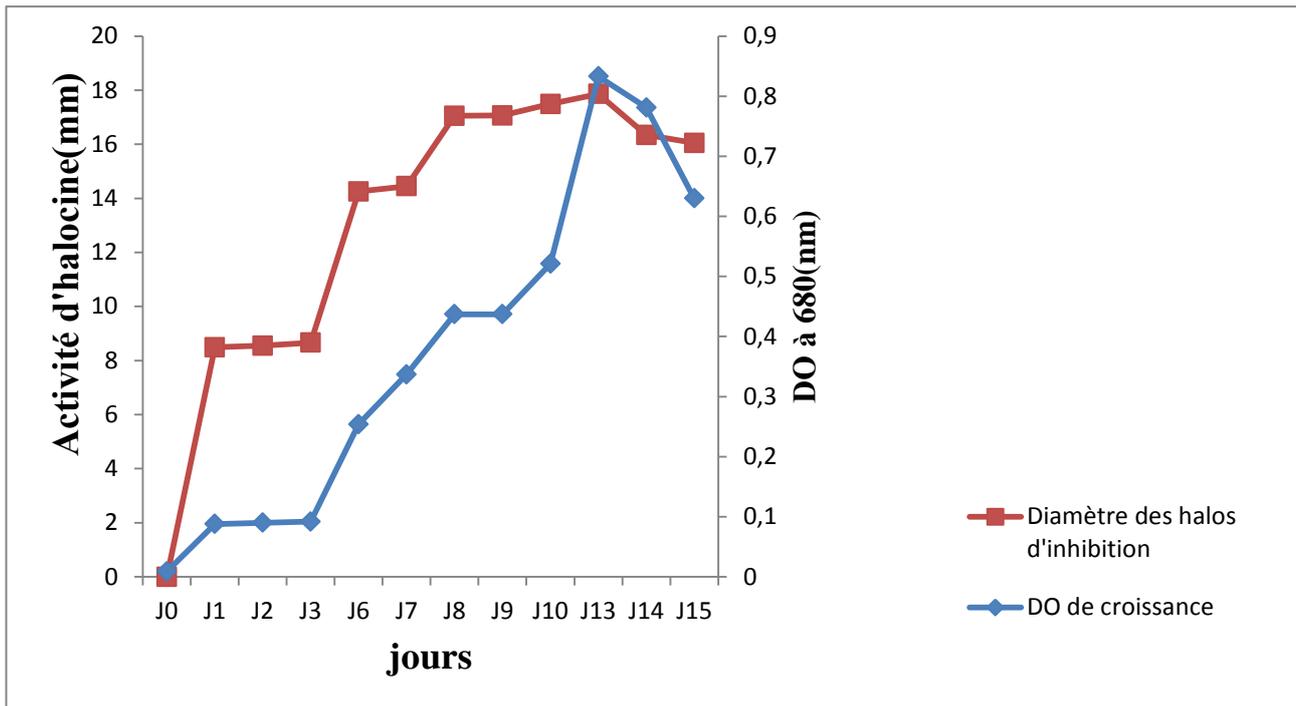


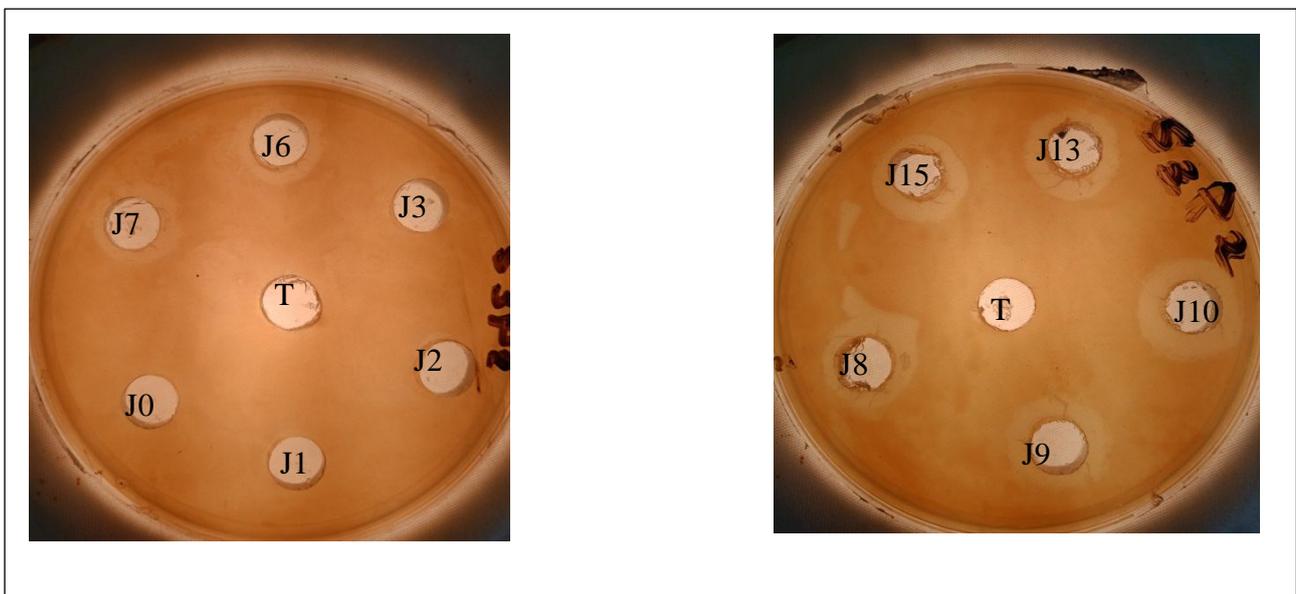
Figure N°20: Résultat du test d'activité sur MSH liquide (test des puits) souche S3P1

Tableau N°03: Cinétique de croissance et de production de composé actif par la souche S3P1

jours	DO₆₈₀ (nm)	Activité d'halocine (mm)
J0	0,024	0
J1	0,074	0
J2	0,08	0
J3	0,085	0
J6	0,132	8,57
J7	0,263	12,17
J8	0,282	12,7
J9	0,323	14,71
J10	0,418	15,03
J13	0,674	16,34
J14	0,542	16,22
J15	0,41	12,65



FigureN°21: Cinétique de croissance et de production de composé actif par la souche S3P2



FigureN°22: Résultat de Test d'activité sur MSH liquide (test des puits) souche S3P2

Tableau N°04: Cinétique de croissance et de production de composé actif par la souche S3P2

jours	DO ₆₈₀ (nm)	Activité d'halocine (mm)
J0	0,009	0
J1	0,088	8,49
J2	0,09	8,55
J3	0,092	8,66
J6	0,254	14,25
J7	0,337	14,45
J8	0,437	17,05
J9	0,437	17,06
J10	0,527	17,49
J13	0,833	17,86
J14	0,781	/
J15	0,63	16,05

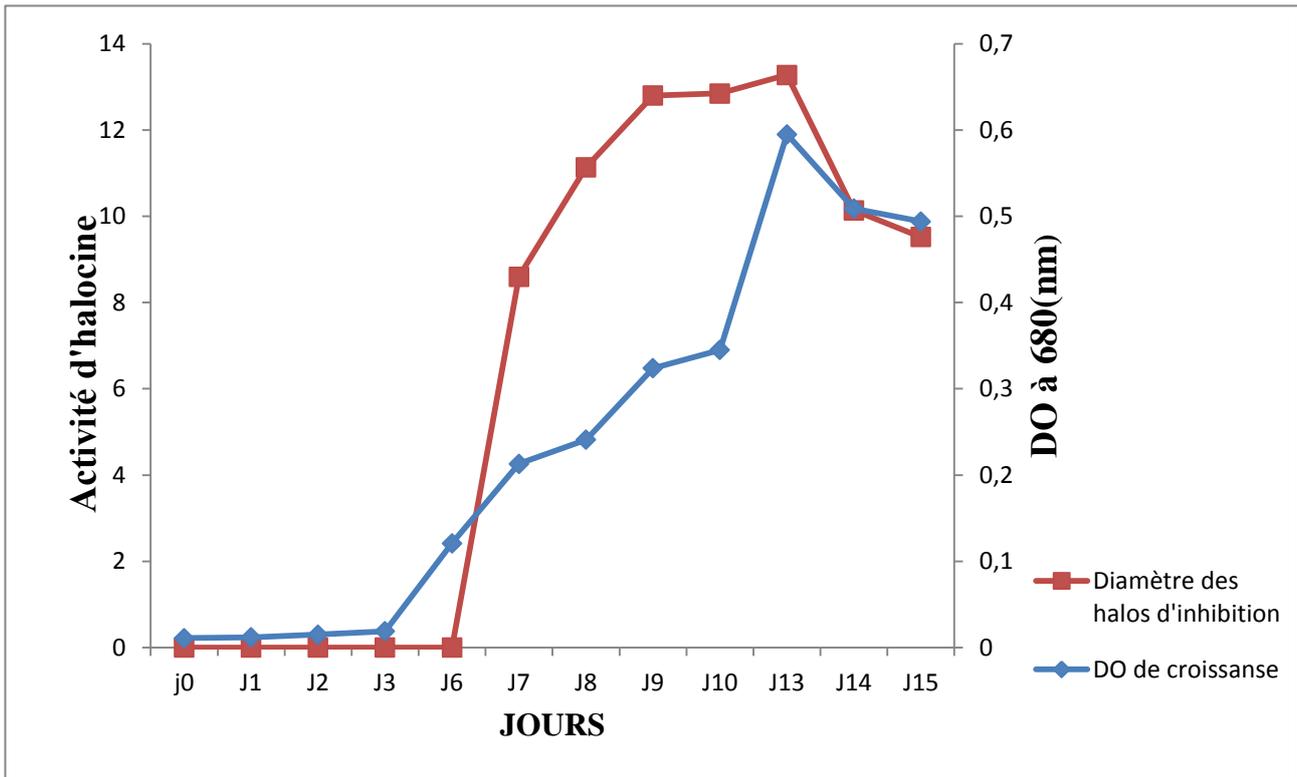


Figure N°23: Cinétique de croissance et de production de composé actif par la souche S5A1

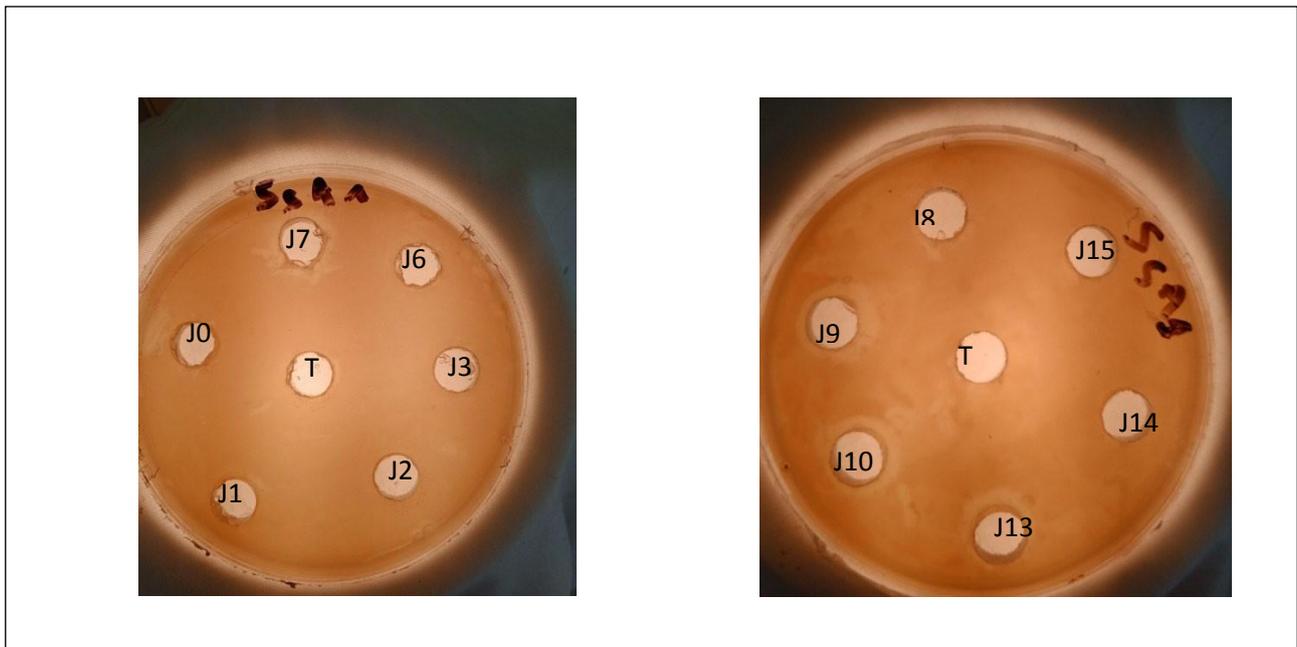
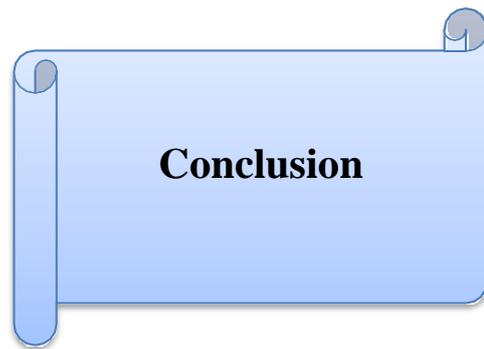


Figure N°24: Résultat de test d'activité sur MSH liquide (test des puits) souche S5A1

Tableau N°05: Cinétique de croissance et de production de composé actif la souche S5A1

jours	DO₆₈₀ (nm)	Activité d'halocine (mm)
J0	0,011	0
J1	0,012	0
J2	0,015	0
J3	0,019	0
J6	0,121	0
J7	0,213	8,6
J8	0,241	11,14
J9	0,324	12,8
J10	0,345	12,85
J13	0,595	13,28
J14	0,509	10,14
J15	0,494	9,52



Conclusion

En conclusion, il est intéressant de souligner que les résultats obtenus dans cette étude confirment de manière éloquente l'incroyable adaptabilité des microorganismes aux environnements extrêmes. La richesse des voies métaboliques et des biomolécules spécifiques découvertes dans les milieux halophiles suggère un potentiel biotechnologique prometteur.

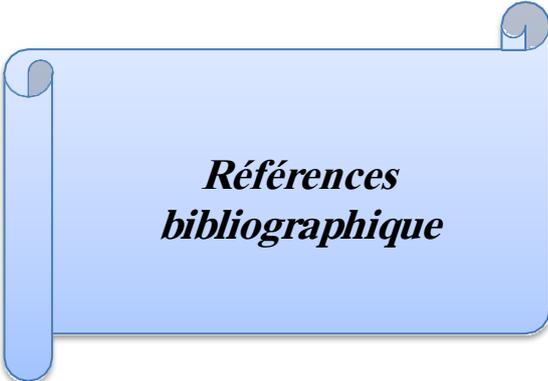
Dans ce contexte, l'objectif initial de cette recherche, qui était de vérifier les activités antagonistes des bactéries halophiles dans les milieux liquides et solides. à travers l'analyse des souches pures (S3P1, S3P2, S5A1), a été atteint avec succès

La mise en évidence de l'activité halocine de l'isolat S3P2, avec un diamètre d'inhibition de 17,86 mm, ouvre des perspectives passionnantes pour le développement de solutions antimicrobiennes innovantes.

Néanmoins, il est important de noter que pour exploiter pleinement ces découvertes, des analyses microbiologiques et physico-chimiques plus approfondies seront nécessaires. Ces études complémentaires permettront de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents, garantissant ainsi la sécurité et l'efficacité des applications futures.

Sur le plan biotechnologique, il est impératif d'envisager une optimisation des conditions de production, une purification minutieuse et une caractérisation approfondie de l'activité antimicrobienne. De plus, le clonage des gènes de ces souches pourrait ouvrir une nouvelle voie pour créer des espèces adaptées à des conditions de haute salinité, ouvrant ainsi la voie à des applications biotechnologiques novatrices.

En définitive, cette étude éclaire les perspectives prometteuses des microorganismes halophiles dans le domaine de la biotechnologie. Ces découvertes ne font que renforcer la nécessité de poursuivre la recherche dans ce domaine afin d'exploiter pleinement le potentiel de ces organismes, que ce soit dans le domaine médical, industriel, agricole ou environnemental.



***Références
bibliographiques***

Références bibliographique

- _ Anton, J., E. Llobet-Brossa, F. Rodriguez-Valera, et R. Amann.(1999). Fluorescence insitu hybridization analysis of the prokaryotic community inhabiting crystallizer ponds. *Environ Microbiol* 1(6):517-523 .
- _ Antón, J., Oren, A., Benlloch, S., Rodriguez-Valera, F., Amann, R., & Rosselló-Mora, R. (2002). *Salinibacter ruber* gen. nov., sp. nov., a novel, extremely halophilic member of the Bacteria from saltern crystallizer ponds. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 485-491 .
- _ Arahal, D. R., A. M. Castillo, W. Ludwig, K. H. Schleifer, et A. Ventosa,(2002). Proposal of *Cobetia marina* gen. nov., comb. nov., within the family Halomonadaceae, to include the species *Halomonas marina*. *System Appl Microbiol* 25(2):207-211.
- _ Bardavid, R. E., D. Ionescu, A. Oren, F. A. Rainey, B. J. Hollen, D. R. Bagaley, A. M. Small, et C. McKay,(2007). Selective enrichment, isolation and molecular detection of *Salinibacter* and related extremely halophilic Bacteria from hypersaline environments. *Hydrobiologia* 576:3-13.
- _ 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 Belkaïd, BP119, Imama, Tlemcen, ALGÉRIE*, p. 281-285.
- _Birbir, M., S. Eryilmaz et A. Ogan. 2004. Prevention of halophilic microbial damage on brine cured hides by extremely halophilic halocin producer strains. *J Soc Leather Technologists Chem* 88:99-104
- _ Boujelben, I., Gomariz, M., Martinez-Garcia, M., Santos, F., Pena, A., Lopez, C., Anton, J., & Maalej, S. (2012a). Spatial and Seasonal Prokaryotic Community Dynamics in Ponds of Increasing Salinity of Sfax Solar Saltern in Tunisia. *Antonie van Leeuwenhoek*, 101(4), 845-857
- _Boujelben, L., Yarza, P., Almansa, C., Villamor, J., Maalej, S., Anton, J., & Santos, F. (2012b). Virioplankton Community Structure in Tunisian Solar Salterns. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(20), 7429-7437.
- _ Boujelben, I., Martinez-Garcia, M., Van Pelt, J., & Maalej, S. (2014). Diversity of cultivable halophilic archaea and bacteria from superficial hypersaline sediments of Tunisian solar salterns. *Antonie van Leeuwenhoek*, 106(4), 675-692.
- _Bouktit N., Benallaoua S., Idres N et Boulila A., 2003 - Extraction et Caracterisation d'un Agent Antibacterien de type Halocine Produit par une Souche Bacterienne Hyperhalophile. *Sciences &Technologie, C – N°20* pp. 39-43.

- _Chen, S., Sun, S., Korfanty, G. A., Liu, J., & Xiang, H. (2019). A halocin promotes DNA uptake in *Haloferax mediterranei*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1960
- _Cheung, J., Danna, K. J., O'Connor, E. M., Price, L. B., & Shand, R. F. (1997). Isolation, Sequence, and Expression of the Gene Encoding Halocin H4, a Bacteriocin from the Halophilic Archaeon *Haloferax mediterranei* R4. *Journal of Bacteriology*, 179(2), 548-551.
- _Colwell, R. R., Litchfield, C. D., Vreeland, R., Kiefer, L. A., & Gibbons, N. E. (1979). Taxonomic Studies of Red Halophilic Bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 29(4), 379-399.
- _Echigo, A., Hino, M., Fukushima, T., Mizuki, T., Kamekura, M., & Usami, R. (2005). Endospores of halophilic bacteria of the family Bacillaceae isolated from non-saline Japanese soil may be transported by Kosa event (Asian dust storm). *Evolutionary Microbiology*, 52, 2271-2280.
- _Fernández González, A. B., Vera Gargallo, B., Sánchez-Porro Álvarez, C., Ghai, R., Papke, R. T., Rodríguez Valera, F., & Ventosa, A. (2014). Comparison of prokaryotic community structure from Mediterranean and Atlantic saltern concentrator ponds by a metagenomic approach. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1-12
- _García L. (2002). La vie dans les milieux extrêmes. Texte de la 433ème conférence de l'Université de tous les savoirs : 1
- _Gautier, E. F. (1914). Le rocher de sel de Djelfa. *Annales de Géographie*, 23(129), 245-260.
- _Ghai, R., L. Pašić, A. B. Fernández, A.-B. Martín-Cuadrado, C. M. Mizuno, K. D. McMahon, R. T. Papke, R. Stepanauskas, B. Rodríguez-Brito, et F. Rohwer. 2011. New abundant microbial groups in aquatic hypersaline environments. *Sci Rep* 1: 1-10.
- _Gunde-Cimerman, N., Plemenitaš, A., & Oren, A. (2018). Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentration. *FEMS Microbiology Reviews*, 42(3), 353-375.
- _Haseltine, C., Hill, T., Montalvo-Rodríguez, R., Kemper, S. K., Shand, R. F., & Blum, P. (2001). Secreted Euryarchaeal Microhalocins Kill Hyperthermophilic Crenarchaea. *Journal of Bacteriology*, 183(1), 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, cours et question de révision*, Sinauer Associates, Inc, Inc.p865

- _Hozzein, W. N. (2015). Biodiversity of halophilic and halotolerant Actinobacteria. In *Halophiles* (pp. 1-28). Springer
- _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.
- _ Kamekura, M. (1998). Diversity of extremely halophilic bacteria. *Extremophiles*, 2, 289-295.
- _Khallef S, Houali K (2019). Etude de la flore halophile cultivable des zones humides de Ouargla, Aalgérie. These de Doctorat en Sciences Biologiques. Option Microbiologie Appliquée. Univ. Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou.
- _ 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.
- _ Kushner, D. (2020). Growth and nutrition of halophilic bacteria. In *The Biology of Halophilic Bacteria* (pp. 87-103).
- _ Kumar, V., Singh, B., Van Belkum, M. J., Diep, D., Chikindas, M. L., Ermakov, A. M., & Tiwari, S. K. (2021). Halocins, natural antimicrobials of Archaea: Exotic or special or both? *Biotechnology Advances*, 53(1), 107834
- _Lee, H.-S. (2013). Diversity of halophilic archaea in fermented foods and human intestines and their application. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(12), 1645–1653
- _ Lequerica, J. L., O'Connor, J., Such, L., Alberola, A., Meseguer, I., Dolz, M., Torreblanca, M., Moya, A., Colom, F., & Soria, B. (2006). A halocin acting on Na⁺/H⁺ exchanger of Haloarchaea as a new type of inhibitor in NHE of mammals. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 62(4), 253-262.
- _ León, M. J., Fernández, A. B., Ghai, R., Sánchez-Porro, C., Rodriguez-Valera, F., & Ventosa, A. (2014). From Metagenomics to Pure Culture: Isolation and Characterization of the Moderately Halophilic Bacterium *Spiribacter salinus* gen. nov., sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(13), 3850–3857

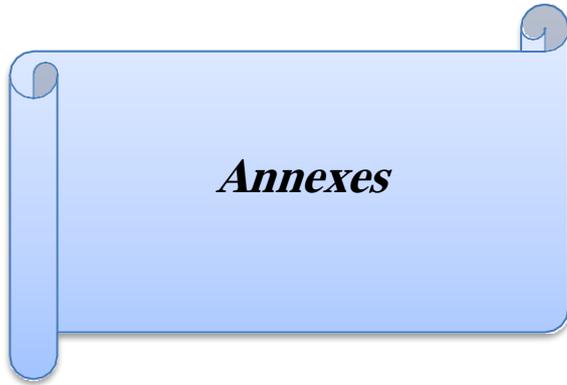
- _Li, Y., Xuan, H., Liu, J., Zhou, M., & Tan, H. (2003). Purification and biological characterization of halocin C8, a novel peptide antibiotic from Halobacterium strain AS7092. *Extremophiles*, 7, 401-407.
- _Mei, S., Sun, S., Liu, X., Lu, Q., Cai, L., Li, Y., & Xiang, H. (2008). The helix-loop-helix motif at the N terminus of Hal I is essential for its immunity function against halocin C8. *Journal of Bacteriology*, 190, 6501-6508.
- _ Meknaci, R., Philippe, L., Claudine, S., Jean-Pierre, L. C., Jean-Pierre, A., Hocine, H., & Jamal, O. (2014). Agar-supported cultivation of Halorubrum sp. SSR, and production of halocin C8 on the scale-up prototype Platotex. *Extremophiles*, 18:1049-1055
- _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, pp12-45
- _Meseguer, I., & Rodriguez-Valera, F. (1985). Production and purification of halocin H4. *FEMS Microbiology Letters*, 28, 177-182.
- _Meseguer I., Rodriguez –Valera F. and Ventosa A.(1986). Antagonistic interactions among halobacteria due to halocin production. *FEMS. Microbiol Lett*, 36:177-182.
- _Meseguer, I., Torreblanca, M., & Konishi, T. (1995). Specific inhibition of the halobacterial Na⁺/H⁺ antiporter by halocin H6. *Journal of Biological Chemistry*, 270(12), 6450-6455.
- _Motta, A. S., Cladera-Olivera, F., & Brandelli, A. (2004). Screening for antimicrobial activity among bacteria isolated from the Amazon Basin. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35, 307-310.
- _O'Connor, E. M., & Shand, R. F. (2002). Halocins and Sulfolobocins: The emerging story of archaeal protein and peptide antibiotics. In *Encyclopedia of Industrial Biotechnology* (Vol. 28, pp. 23-31
- _ Oren, A. (2002a). Halophilic microorganisms and their environments. Dordrecht: Kluwer Scientific Publishers.
- _ Oren, A. (2002b). Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 39, 1-7

Références bibliographique

- _ 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* (pp. 263-282). Springer New York.
- _ Oren, A. (2008). Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems*, 4(1), 2.
- Oren, A. (2009a). Microbial diversity and microbial abundance in salt saturated brines: why are the waters of hypersaline lakes red? *Natural Resources and Environmental Issues: Vol. 15*, Article 49.
- _Oren, A. (2009b). Saltra evaporation ponds as model systems for the study of primary production processes under hypersaline conditions. *Aquatic Microbial Ecology*, 56, 193-204
- _Oren, A. (2015). Halophilic microbial communities and their environments. *Current Opinion in Biotechnology*, 33, 119-124.
- _ Oren, A., Ventosa, A., & Grant, G. (1997). Proposed Minimal Standards for Description of New Taxa in the Order Halobacteriales. *International Union of Microbiological Societies*, 47, 233-238.
- _Paul Blum.(2008). *New Models For Prokaryotic Biology*. Caister Academic Press Norfolk, UK 233-234.
- _Peduzzi, R., Tonolla, M., & Boucher-Rodoni, R. (2006). Milieux extrêmes : Conditions de vie en milieu alpin et milieu marin. *Actes et contributions scientifiques*.
- _Platas, G., Meseguer, I., & Amils, R. (1996). Optimization of the production of a bacteriocin from *Haloferax mediterranei* Xia3. *Microbiology*, 12, 75-84.
- _Platas, G., Meseguer, I., & Amils, R. (2002). Purification and biological characterization of halocine H1 from *Haloferax mediterranei* M2a. *Int Microbiol*, 5, 15-19
- _ Pikuta, E. V., & Hoover, R. B. (2007). *Microbial Extremophiles at the Limits of Life*
- _ Prangishvili, D., Holz, I., Stieger, E., Nickell, S., Kristjansson, J. K., & Zillig, W. (2000). Sulfolobocins, specific proteinaceous toxins produced by strains of the extremely thermophilic archaeal genus *Sulfolobus*. *Journal of Bacteriology*, 182(10), 2985-2988

- _Price, L. B., & Shand, R. F. (2000). Halocin S8: a 36-amino-acid microhalocin from the haloarchaea strain S8a. *Journal of Bacteriology*, 182(17), 4951-4958.
- _Riley, M. A., & Wertz, J. E. (2002). Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie*, 84, 357-364.
- _ Riley, M. A. (1998). Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. *Annual Review of Genetics*, 32, 255-278.
- _Rodriguez-Valera, F., Juez, G., & Kushner, D. J. (1982). Halocins: Salt-dependent bacteriocins produced by extremely halophilic rods. *Canadian Journal of Microbiology*, 28, 151-154.
- _Romano, L. B., Nicolaus, L., Lama, M. C., Manca, M. C., & Gambacorta, A. (1996). Characterization of a haloalkalophilic strictly aerobic bacterium, isolated from Pantelleria island. *Systematic and Applied Microbiology*, 19, 326-333.
- _ Rothschild, L. J. et R. L. Mancinelli. (2001). Life in extreme environments. *Nature* 409:1092- 1101.
- _ Satyanarayana, T., C. Raghukumar, et S. Shivaji. (2005). Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *Current Sci* 89:78-90.
- _Shand, R. F., Price, L. B., & O'Connor, E. M. (1999). Halocins: protein antibiotics from hypersaline environments. In: Oren A (ed) *Microbiology and biogeochemistry of hypersaline environments*, CRS Press, Boca Raton, pp. 295-306
- _Shand R.F. and Levya K.J. (2007). Peptide and protein antibiotics from the domain Archaea : halocins and sulfolobocins. In *Bacteriocins Ecology and Evolution*, M.A. Riley, and M.A.Chavan, eds. (New York : Springer) , p. 150.
- _ Sorokin, D. Y., T. Tourova, E. Galinski, C. Belloch, et B. Tindall, (2006). Extremely halophilic denitrifying bacteria from hypersaline inland lakes, *Halovibrio denitrificans* sp. nov. and *Halospina denitrificans* gen. nov., sp. nov., and evidence that the genus name *Halovibrio* Fendrich 1989 with the type species *Halovibrio variabilis* should be associated with DSM 3050. *Int J Syst Evol Microbiol.* 56:379-388.

- _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.
- _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.
- _Taale, E., Savadogo, A., Zongo, C., & Tapsoba, F.,Karou,D,S .(2016). Les peptides antimicrobiens d'origine microbienne: cas des bactériocines [Antimicrobial peptides from microbes: case of bacteriocins]. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 10(1), 384-399. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v10i1.29>
- _Tamar K.P., Oren A., 2000- Halocins: are they involved in the competition between halobacteria in saltern ponds?. *Extremophiles*, Springer-Verlag., 4 : 35-41.
- _Tazi, L., Breakwell, D. P., Harker, A. R., & Crandall, K. A. (2014). Life in extreme environments: microbial diversity in Great Salt Lake, Utah. *Extremophiles*, 18(4), 525-535.
- _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., & Ventosa, A. (1994). Production of halocin is a practically universal feature of archaeal halophilic rods. *Letters in Applied Microbiology*, 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.
- _ Ventosa, A., J. J. Nieto, et A. Oren. (1998). Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol R* 62:504-544.
- _ Woese, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the NationalAcademyofSciences*,87(12),4576-4579.



Annexes

Matériel utilisé:

- Agitateur plaque chauffante
- Pied à coulisse
- Centrifugeuse
- Vortex
- Balance analytique
- Balance de paillasse
- Hotte
- Spectromètre
- Incubateur à 40°C
- Incubateur-agitateur
- Autoclave
- Etuve
- Bain marie
- Loupe
- Chauffe ballon
- Réfrigérateur
- Bec Benzène
- Portoirs de tubes
- Micro pipettes (1ml)
- Embouts jaunes
- Embouts bleus
- Micro-tubes 1,5ml Eppendorf
- Anse de platine
- Spatule
- Papier aluminium
- Para-film
- Sac en plastique
- Tubes à essai (20ml)
- Boîtes Pétri
- Erlenmeyer (500ml; 1l)
- Becher
- Flacons (125ml; 250ml; 500ml)
- Seringues (5ml)
- Pipettes Pasteur
- Micropipettes (200µl)

➤ Réfrigérateur



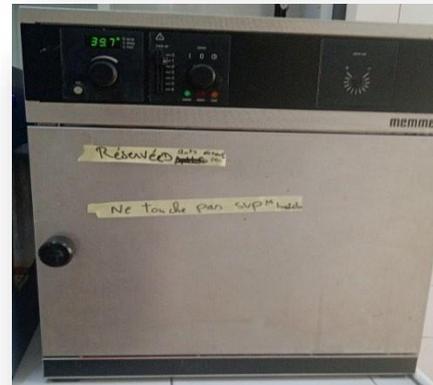
➤ Autoclave



➤ Agitateur plaque chauffante



➤ Etuve



➤ Spectromètre



➤ Incubateur-
agitateur



➤ Hotte



➤ Vortex



➤ Chauffe ballon



➤ Pied à coulisse



➤ Balance de pailasse



➤ Balance analytique



➤ Bain-marie



➤ Centrifugeuse



ملخص :

الكائنات الحية الدقيقة المحبة للملوحة تزدهر في البيئات شديدة الملوحة وتمتلك تكيفات فريدة تمكنها من البقاء على قيد الحياة. تنتج هذه الكائنات لدقيقة مواد مضادة للميكروبات تسمى بالهالوسينات ، والتي تمنح ميزة تنافسية. تبحث هذه الدراسة في إنتاج الهالوسينات من ثلاث سلالات (S3P2 , S3P1 , S5A1) معزولة من منطقة حجر الملح بولاية الجلفة. الهدف هو تحديد السلالة الأكثر إنتاجية ضد البكتيريا المستهدفة في كل من الوسائط السائلة والصلبة. تشير النتائج إلى أن السلالة S3P2 أظهر أعلى نشاط مثبط يقدر بـ 17.86 ملي مولار. يساهم هذا البحث في فهم الكائنات الدقيقة المحبة للملوحة وتطبيقاتها المحتملة في البيئات شديدة الملوحة.

الكلمات المفتاحية: الكائنات الحية الدقيقة المحبة للملوحة ، هالوسينات، بيئات شديدة الملوحة، بيتيدات ميكروبية، مضاد للميكروبات.

Résumé

Les micro-organismes halophiles prospèrent dans des environnements hautement salins et possèdent des adaptations uniques qui permettent leur survie. Ces micro-organismes produisent des substances antimicrobiennes appelées halocines, qui confèrent un avantage concurrentiel. Cette étude étudie la production d'halocines à partir de trois souches (S3P2, S3P1, S5A1) isolées de la région de rocher de sel dans l'état de Djelfa. L'objectif est de déterminer la souche la plus productive contre la bactérie cible S1PA4 dans les milieux liquides et solides. Les résultats indiquent que la souche S3P2 présente l'activité inhibitrice la plus élevée, estimée à 17,86mm. Cette recherche contribue à la compréhension des micro-organismes halophiles et de leurs applications potentielles en milieu hypersalin .

Mots clés: Halophiles, Halocines, Milieux hypersalins, Peptides microbiens, Antimicrobiens.

Abstract:

Halophilic microorganisms thrive in highly saline environments and possess unique adaptations that enable their survival. These microorganisms produce antimicrobial substances known as halocins, which confer a competitive advantage. This study investigates the production of halocins from three strains (S3P2,S3P1,S5A1) isolated from the salt rock region in Djelfa state .The aim is to determine the most productive strain against the target bacteria S1PA4 in both liquid and solid media. Results indicate that strain S3P2 exhibits the highest inhibitory activity, estimated at 17.86mm. This research contributes to understanding halophilic microorganisms and their potential applications in hypersaline environments.

Key words: Halophilic, Halocines, Hypersaline environments, Microbial peptides, Antimicrobial.