

## EXTRACTION ET CARACTERISATION D'UN AGENT ANTIBACTERIEN DE TYPE HALOCINE PRODUIT PAR UNE SOUCHE BACTERIENNE HYPERHALOPHILE

Reçu le 02/03/2002 – Accepté le 12/05/2003

### Résumé

Les hyperhalophiles, représentants du domaine Archaea, produisent des composés antibactériens apparentés aux bactériocines, appelés halocines ou archaeocines.

Dans cette étude, une souche bactérienne productrice performante, désignée P3, sélectionnée parmi six autres souches bactériennes hyperhalophiles productrices, est utilisée pour produire, extraire, purifier et caractériser son agent antibactérien désigné BP3.

**Mots clés:** *Hyperhalophiles, Extremophiles, Halocines, Purification, Caractérisation.*

### Abstract

The hyperhalophiles, members of the domain Archaea, produce bacteriocin-like substances, termed halocins or archaeocins.

In this study, a bacterial performant producer strain, selected among six other producer strains assigned to P3, has been used to produce, extract, purify and characterise the inhibitory substance synthesised and secreted by P3.

**Keywords:** *Halophilic bacteria, Extremophils, Halocins, Purification, Characterization.*

**N. BOUKTIT  
S. BENALLAOUA  
N. IDRES  
A. BOULILA**

Laboratoire de Microbiologie  
Appliquée/ Biochimie Microbienne  
Département de Microbiologie  
Faculté des Sciences  
de la Nature et de la Vie  
Université A. Mira  
Béjaïa, 06000 (Algérie)

Les halocines sont des antibiotiques protéiques produits par les bactéries halophiles extrêmes, membres du domaine Archaea et sont excrétées dans l'environnement, où elles détruisent ou inhibent d'autres haloarchaeons [1]. Elles ont été découvertes pour la première fois par F. Rodriguez-Valera en 1982 [2].

Bien que la production d'halocines semble être une caractéristique universelle des halophiles extrêmes [3], seulement cinq halocines ont été caractérisées au niveau protéique. Trois d'entre elles se distinguent par leur haut poids moléculaire : l'halocine H4 produite par *Haloferax mediterranei* R4 d'environ 28 KDa [4,5], l'halocine H6 produite par *Haloferax gibbonsii* Ma 2,39 d'environ 32 KDa [6,7] et l'halocine H1 produite par *Haloferax mediterranei* M2a [8], autrefois appelée *Haloferax mediterranei* Xia3 [9] 31 KDa [8,9]. Toutefois, les deux microhalocines restantes s'avèrent de petit poids moléculaire soit 3 KDa pour l'halocine S8 de la souche archaeahalophile S8a [1,10] et moins de 2,5 KDa pour l'halocine hal R1 produite par *Halobacterium* sp. strain GN101 [10,11]. Cette dernière se complexe en culture avec une ou plusieurs protéines « carrier » qui augmente(ent) son poids moléculaire apparent à environ 30 KDa.

Le gène de structure de l'halocine H4 : hal H4 est cloné et séquencé par Cheung et collaborateurs [12]. Ce gène de 1.080 pb code pour un polypeptide de 359 acides aminés. En outre, celui de l'halocine S8 séquencé par Price et Shand [1] est de 933 pb et code pour une préprotéine de 311 acides aminés dont la forme active renferme 36 acides aminés.

Afin d'explorer la diversité des halocines à l'échelle protéique, plusieurs halocines devraient être caractérisées. Dans cette étude, nous avons décrit, purifié et caractérisé l'halocine BP3 produite par une souche bactérienne hyperhalophile locale.

### ملخص

الممثلون لمملكة Archaea، ينتجون مضادات حيوية مشابهة للبكتيريوسينات والمسماة بـ archaeocines، أو hyperhalophiles، halocines، أو archaeocines. خلال هذه الدراسة، قمنا باختيار عينة منتجة فعالة من بين ستة عينات منتجات أخرى، المسماة بـ P3 والتي استعملت لغرض إنتاج، استخراج، إستخلاص و تمييز المضاد الحيوي المعروف بـ BP3.

**الكلمات المفتاحية:** إستخلاص، تمييز، Halocines، Hyperhalophiles، Extremophiles

## MATERIELS ET METHODES

### Souches utilisées et conditions de culture

Deux souches bactériennes hyperhalophiles P3 et EM5 isolées à partir de poisson et d'eau de mer, respectivement, ont été utilisées dans cette étude, la première correspond au germe producteur et la seconde au germe cible. Elles font partie de la collection de souches de micro-organismes du laboratoire de Biochimie Microbienne (Université de Bejaïa).

Les souches sont cultivées à pH 7 sur le milieu 73 modifié [13].

Une culture de la souche P3 est réalisée sur un bioréacteur de 2L (de type meredos Kika laborotechnik mbHD3006 Burgwedel) aéré et agité à 350 rpm durant 48h à 37°C.

### Caractérisation de l'agent antibactérien

L'interférence de bactériophages est testée suivant la méthode de Schved *et al.* [14].

Afin d'évaluer la nature chimique de l'agent antibactérien, le surnageant de culture dialysé et concentré est incubé avec des solutions d'enzymes, à savoir trypsine, papaïne et RNase (5 mg/ml chacune) pendant 1h à 37°C, puis testé pour son activité vis à vis du germe cible EM5.

L'adsorption de l'agent antibactérien aux cellules cibles est testée selon la méthode de Rodriguez-Valera *et al.* [2].

Le germe cible EM5 présentant une zone d'inhibition vis à vis du surnageant concentré et dialysé de P3 est incubé pendant 10 jours à 37°C. L'agent antibactérien aurait un effet cytotoxique si la zone d'inhibition persistait, et un effet cytostatique si la zone disparaissait.

### Concentration et purification de l'halocine BP3

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. Les précipités ainsi obtenus sont remis en suspension dans un tampon phosphate 50 mM (pH 7), dialysés contre le même tampon durant une nuit puis testés pour leur activité. La concentration est suivie d'une filtration sur gel de séphadex G-25, à travers une colonne de type Pharmacia (25x1,5 cm), les précipités présentant une activité sont concentrés par évaporation sous vide à 37°C et les 2 ml obtenus sont élués à un débit de 0,5 ml/min avec du tampon phosphate 50 mM (pH 7). 50 fractions de 1 ml chacune sont recueillies et testées pour leur activité vis à vis du germe cible EM5. La fraction active récoltée après désionisation sur gel de séphadex G-25 (1 ml), est éluee 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). 74 fractions de 1 ml chacune ont été récoltées et testées pour leur activité.

Afin d'estimer la masse moléculaire de l'agent antibactérien, la colonne chromatographique est étalonnée avec plusieurs marqueurs protéiques de PM connus : bleu de dextrane 2 MDa, BSA 68 KDa, pepsine 34,6 KDa,

trypsine 23,3 KDa, insuline 6 KDa.

La concentration protéique est mesurée selon la méthode de Bradford [15]. Le degré de pureté du composé antibactérien est évalué par SDS-PAGE à 12% d'acrylamide, selon la méthode de Torreblanca *et al.* [6].

L'activité des échantillons est estimée en unités arbitraires. Une unité arbitraire est définie comme étant la plus grande dilution pour laquelle l'activité commence à disparaître [1,16].

### Tests de stabilité de l'halocine BP3

L'halocine BP3 est soumise à des températures de 60, 70, 80, 90 et 100°C pendant 10min et à un cycle d'autoclavage à 120°C pendant 20 min; sa stabilité est également testée à des pH allant de 2 à 12.

## RESULTATS ET DISCUSSION

### Caractérisation 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 exclut 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.

### Interférence de bactériophages

L'interférence de bactériophages est écartée car aucune plage de lyse n'est obtenue après traitement du germe cible par le surnageant de culture de la souche P3. Des résultats similaires sont observés par Rodriguez-Valera *et al.* [2], qui confirment que l'activité antibactérienne n'est due qu'à la production de l'halocine H4 et non à l'interférence de bactériophages. Meseguer *et al.* [5] confirment également cette observation sur 79 souches bactériennes hyperhalophiles testées.

### Action des protéases et de la RNase

Des expériences impliquant le traitement du surnageant actif par une RNase ne diminuent pas l'activité du surnageant actif, excluant ainsi l'intervention d'ARN à activité catalytique (ribozyme) [17]. 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 [4].

### Adsorption au germe cible

Le surnageant obtenu après centrifugation du mélange surnageant de la culture P3 avec 10<sup>9</sup> cellules du germe cible, a beaucoup moins d'activité inhibitrice vis à vis de la souche cible EM5. Par ailleurs, le surnageant de la souche cible n'élimine pas l'activité inhibitrice du surnageant de la souche P3 quand ils sont en culture. Ces expériences

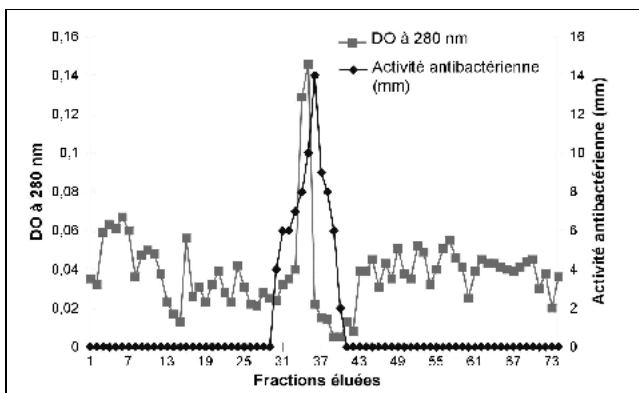
suggèrent comparativement aux travaux de Rodriguez-Valera *et al.* [2] que le composé BP3 est adsorbé à la souche cible EM5. Meseguer *et al.* [18] ont aussi décrit l'adsorption de l'halocine H4 aux cellules cibles avec une inactivation concomitante de H4.

### Effet de l'agent antibactérien sur le germe cible

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.* [17], par l'effet cytotocal 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.

### Purification de l'halocine BP3

La précipitation au sulfate d'ammonium révèle que l'halocine BP3 précipite entre 40 et 60% de saturation en  $(NH_4)_2SO_4$ . Des études entreprises par James *et al.* [19] pour purifier une nouvelle protéine à activité antibactérienne à partir d'une bactérie marine D2, montrent que cette protéine précipite à 60% de saturation en sulfate d'ammonium. L'activité spécifique du composé BP3 est 12 fois supérieure à celle du surnageant concentré (Tab. 1). 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 50 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 5000 Da.



**Figure 1:** Profil d'élution du composé BP3 après chromatographie sur gel de séphadex G-75.

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

#### LEGENDES:

UA : Activité totale.

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

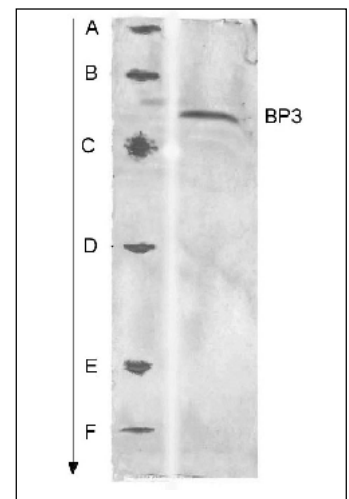
Purification (fois) : Activité spécifique après chaque étape de purification/ Activité spécifique du surnageant brut.

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

**Tableau 1:** Degré de pureté du composé BP3 durant les étapes de purification.

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 (Tab. 1).

Le profil d'élution de la fraction BP3 désionisée après chromatographie sur gel de séphadex G-75, montre que la substance BP3 s'élué entre la fraction 30 et 40 (Fig. 1). Les tests d'activités effectués sur les 74 fractions collectées révèlent que l'activité est concentrée au niveau de ce pic (Fig. 1); l'activité spécifique du composé BP3 après cette étape de purification est 15 fois supérieure à celle du surnageant concentré (Tab. 1). 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 [4], H1 dont le PM est déterminé à 31 KDa [8,9] et H6 dont le PM est estimé à 32 KDa [6,10,16]. 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 (Fig. 2). Un haut degré de pureté est donc probable car la protéine apparaît comme homogène dans les



#### LEGENDES:

- 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 2:** Profil électrophorétique de l'halocine BP3.

étapes précédentes.

L'estimation de la masse moléculaire du composé BP3 après SDS-PAGE est déterminée par extrapolation sur la courbe d'étalonnage préétablie des protéines standards ( $\text{Log PM} = f(\text{Rf})$  avec  $\text{Rf} = \text{distance parcourue par la protéine} / \text{distance de migration du bleu de bromophénol}$ ). Le composé BP3 a un Rf de 0,22 voisin de celui de l'ovalbumine et sa masse moléculaire est alors estimée à environ 52 KDa, ce qui confirme l'estimation effectuée par filtration sur gel de séphadex G-75.

### Stabilité de l'halocine BP3

L'halocine BP3 est stable à pH allant de 6 à 9. Cependant son activité est altérée à 75% à pH 10 et 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 (Tab. 2). Contrairement à l'halocine H4 dont l'activité s'avère thermolabile puisqu'elle est complètement altérée après traitement à 80°C pendant 10 min [2] et aux halocines H6 et S8 thermorésistantes [1,6,10,16], l'halocine BP3 s'apparente à l'halocine HalR1, vu leur thermostabilité [16].

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

**Tableau 2:** Récapitulatif des propriétés physico-chimiques du composé BP3.

### CONCLUSION

Dans cette étude, une souche productrice d'halocine est utilisée afin d'extraire, de caractériser et de purifier l'agent antibactérien produit, appelé BP3.

Les résultats de la caractérisation du composé BP3 excluent la possibilité d'interférence de bactériophages, d'ARN à activité catalytique, de peroxyde d'oxygène et d'acides organiques. Ils révèlent sa nature protéique, son indépendance au sel, sa thermostabilité et sa stabilité au voisinage de la neutralité. Il s'adsorbe aux récepteurs membranaires du germe cible et exerce un effet cytotoxic vis-à-vis de ce dernier. Ces résultats concordent avec la définition d'une bactériocine produite par les

hyperhalophiles; le composé BP3 serait donc une halocine.

La purification de l'halocine BP3 révèle que ce composé précipite entre 40 et 60% de saturation en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  par précipitation au sulfate d'ammonium; il s'élue dans la fraction 29 par filtration sur gel de séphadex G-25, entre la fraction 30 et 40 par chromatographie d'exclusion sur gel de séphadex G-75. L'estimation du PM de cette halocine, par étalonnage de la colonne chromatographique, à environ 50 KDa, est confirmé par une SDS-PAGE qui montre également que l'halocine BP3 est constituée d'une seule chaîne polypeptidique.

Cette halocine étant sel non dépendant, son implication biotechnologique et pharmaceutique peut être envisagée.

### REFERENCES

- [1]- Price L.B. and Shand R.F., "Halocin S8: a 36-amino-acid microhalocin from the Haloarchaeal strain S8a", *J. Bacteriol.*, vol. 182 (2000), pp.4951-1958.
- [2]- Rodriguez-Valera F., Juez G. and Kushner D.J., "Halocins : salt-dependant bacteriocin produced by extremely halophilic rods", *Can. J. Microbiol.*, vol. 28 (1982), pp.151-154.
- [3]- Torreblanca M., Meseguer I. and Ventosa A., "Production of halocin is a practically universal feature of archaeal halophilic rods", *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 19 (1994), pp.201-205.
- [4]- Meseguer I. and Rodriguez-Valera F., "Production and purification of halocin H4", *FEMS. Microbiol. Lett.*, vol. 28 (1985), pp.177-182.
- [5]- Meseguer I., Rodriguez-Valera F. and Ventosa A., "Antagonistic interactions among halobacteria due to halocin production", *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 36 (1986), pp.177-182.
- [6]- Torreblanca M., Meseguer I. and Rodriguez-Valera F., "Halocin H6, a bacteriocin from *Haloferax gibbonsii*", *J. Gen. Microbiol.*, vol. 135 (1989), pp.2655-2661.
- [7]- Torreblanca M., Meseguer I. and Rodriguez-Valera F., "Effects of halocin H6 on the morphology of sensitive cells", *Biochem. Cell. Biol.*, vol. 68 (1990), pp.396-399.
- [8]- Platas G., Meseguer I. and Amils R., "Purification and biological characterization of halocin H1 from *Haloferax mediterranei* M2a", *Int. Microbiol.*, vol. 5 (2002), pp.15-19.
- [9]- Platas G., Meseguer I. and Amils R., "Optimisation of the production of a bacteriocin from *Haloferax mediterranei* Xia3", *Microbiologia SEM.*, vol. 12 (1996), pp.75-84.
- [10]- Shand R.F., Price L.B. and O'Connor E.M., "Halocins : protein antibiotics from hypersaline environments", *In: Oren A (ed) Microbiology and biogeochemistry of hyper saline environments*, CRS Press, Boca Raton, (1999), pp. 295-306.
- [11]- 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.
- [12]- Cheung J., Danna K.J., O'Connor E.M., Price L.B. and Shand R.F., "Isolation, sequence, and expression of the gene encoding halocin H4, a bacteriocin from halophilic archaeon *Haloferax mediterranei* R4", *J. Bacteriol.*, vol. 179 (1997), pp.548-551.
- [13]- Bouktit N., "Contribution à la purification et caractérisation d'une halocline à partir d'une souche hyperhalophile locale", thèse de magister, Université de Béjaïa (2001), p.68.
- [14]- Schved F., Lalazar Y., Henis Y. and Juven B.J., "Purification, partial characterization and plasmid-linkage of pediocin SJ-1, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*", *J. Appl. Bacteriol.*, vol. 7 (1993), pp.67-77.
- [15]- Bradford M., "A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing

- the principle of protein dye binding", *Anal. Bioch.*, vol. 72 (1976), pp.248-254.
- [16]-O'Connor E.M. and Shand R.F., "Halocins and sulfobiocins: The emerging story of archaeal protein and peptide antibiotics", *J. Ind. Microbiol. Biotech.*, vol. 28 (2002), pp.23-31.
- [17]-Haseltine C., Hill T., Montalvo-Rodriguez R., Kemper S.K., Shand R.F. and Blum P., "Secreted Euryarchaeal microhalocins kill hyperthermophilic Crenarchaea", *J. Bacteriol.*, vol. 183 (2001), pp.287-291.
- [18]- Meseguer I. and Rodriguez-Valera F., "Effect of halocin H4 on cells of *Halobacterium halobium*", *J. Gen. Microbiol.*, vol. 132 (1986), pp. 3061-3068.
- [19]-James S.G., Holmstrom C. and Kjelleberg S., "Purification and characterization of a novel antimicrobial protein from the marine bacterium D2", *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 62 (1996), pp.2783-2788. □