

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira – Béjaïa
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

Mémoire de fin de cycle

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie

Option : Biotechnologie Microbienne

Thème

**Optimisation par un plan factoriel de la croissance et
de la production d'halocines par une souche
d'*Haloarchaea* SWO25**

Présenté par

BOUDRIOUA Abdelhakim

Membres de jury

Président : Dr. BOUROUINA M.

Promotrice : M^{me} IDRES N.

Co-promotrice : Pr. BOUROUINA S.

Examinatrices : Pr. LOUAILACHE H.

M^{me} HAMAIDI N.

2012/2013

Remerciements

Avant toute chose, je tiens à témoigner ma gratitude :

A M^{me} IDRES N. pour sa qualité d'encadrement, son aide précieuse dans la réalisation des expériences, son suivi et sa disponibilité.

Au Prof. BOUROUINA S. pour son encadrement dans les calculs mathématiques et statistiques et dans l'interprétation des résultats.

Au Dr. BOUROUINA M. pour avoir accepté de présider le jury de soutenance et de m'avoir initié au logiciel Minitab.

Au Prof. LOUAILACHE H. et à M^{me} HAMAIDI N. pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Au Prof. Ait Saidi pour avoir donné son point de vue sur le modèle postulé.

Mes très sincères et chaleureux remerciements s'adressent aussi à tous les enseignants qui m'ont transmis leur savoir, et les connaissances indispensables pour accomplir ce travail.

Dédicaces

Ce modeste travail est dédié

A mes très chers parents qui m'ont constamment soutenus et orientés

A ma chère sœur Kenza

A mes petits frère et sœur Zinedine et Ikrame

A mes amis Yanis et Sofiane

Sommaire

	Pages
Remerciements	
Dédicaces	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Problématique	1
Introduction bibliographique	2
I. Les <i>Archaea</i>	3
I. 1 Les <i>Archaea</i> halophiles	3
I. 1. 1 Mécanisme d'adaptation au sel	3
I. 1. 2 Habitat	4
I. 1. 3 Classification et phylogénie	4
II. Les halocines	5
II. 1 Rôle des halocines dans l'environnement	5
II. 2 Spectre d'activité	5
II. 3 Caractéristiques communes des halocines	6
II. 4 Applications des halocines	6
III. Description du genre <i>haloarcu</i> et potentialités industrielles	7
IV. Modélisation par les plans d'expériences	10
IV. 1 Plan factoriel à deux niveaux	10
IV. 2 Analyse du plan factoriel	11

Matériel et méthodes	12
I. Matériel	13
I. 1 Microorganismes	13
I. 2 Milieux de culture	13
I. 3 Logiciel d'analyse des données	13
II. Méthodes	14
II.1 Culture de la souche SWO25	14
II. 2 Estimation de la croissance	14
II. 3 Mise en évidence de l'activité antibiotique	15
II. 3. 1 Préparation de l'inoculum du germe cible	15
II. 3. 2 Inoculation du germe cible en double couche	15
II. 3. 3 Dépôt des échantillons en sports	15
II. 4 Vérification de la production d'halocine	16
II. 5 Test des phages	16
II. 6 Action des protéases sur le surnagent actif	16
II. 7 Estimation des optima de croissance et de production d'halocines	16
II. 8 Optimisation de la croissance et de la production d'halocines	17
Résultats et discussion	19
I. Vérification de la production d'halocines	20
II. Test des phages et des protéases	20
III. Effet des sels sur la croissance et la production d'halocines	20
III. 1 Effet du NaCl	20
III. 2 Effet du MgSO ₄	21
IV. Optimisation de la croissance et de la production d'halocines	22
IV. 1 Elaboration du modèle pour la croissance	23
IV. 1. 1 Test de signification des coefficients	23
IV. 1. 2 Recherche de biais	25

IV. 1. 3 Validation de l'équation	25
IV. 1. 4 Coefficient de détermination	26
IV. 1. 5 Comparaison avec les essais au centre	26
IV. 2 Interprétation des interactions	26
IV. 3 Elaboration du modèle pour la production d'halocines	28
IV. 4 Optimisation de la croissance	29
V. Applicabilité	30
Conclusion	32
Références bibliographiques	33
Annexes	

Liste des tableaux

Tableau I : Caractéristiques des halocines décrites	8
Tableau II : Caractéristique des espèces décrites du genre <i>Haloarcula</i>	9
Tableau III : Facteurs et domaine expérimental	17
Tableau IV : Matrice d'expériences en unités centrées réduites	18
Tableau V : Matrice d'expériences et résultats expérimentaux	23
Tableau VI : ANOVA de la croissance	24
Tableau VII : ANOVA de la production d'halocines	28
Tableau VIII : Croissance en milieu témoin et en milieu optimisé	31

Liste des figures

Figure 1 : Représentation graphique de l'espace expérimental et des points expérimentaux	11
Figure 2 : Zone d'inhibition du germe cible autour du spot	20
Figure 3 : Croissance de la souche SWO25 à différentes concentrations de NaCl	21
Figure 4 : Croissance de la souche SWO25 à différentes concentrations de MgSO ₄	22
Figure 5 : Courbes de croissance des essais aux points expérimentaux	22
Figure 6 : Diagramme des effets	24
Figure 7 : Diagramme de contour dans le plan Température – NaCl	29
Figure 8 : Diagramme de contour dans le plan Température – MgSO ₄	29
Figure 9 : Diagramme de contour dans le plan MgSO ₄ – NaCl	30
Figure 10 : Courbes de croissance en milieu Br de base et en milieu optimisé	31

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ANOVA : Analyse de la variance

ARNr : Acide ribonucléique ribosomique

Br : Brown

°C : Degré Celsius

D : Diamètre de la zone d'inhibition

Da : Dalton

DO : Densité optique

DSM : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen

GC% : Pourcentage en Guanine + Cytosine

h : Heure

ICSP : International Committee on Systematics of Prokaryotes

kDa : Kilo Dalton

M : Molarité (mole/litre)

mg : Milligramme

ml : Millilitre

mm : Millimètre

nm : Nanomètre

N : Normalité

OFAT : One factor at a time

PHA : Polyhydroxyalkanoate

p/v : poids par volume

rpm : Rotations par minute

S : Svedberg

T : Température

tg : Temps de génération

UV : Ultra violet

v/v : Volume par volume

μ : Taux de croissance spécifique

μ l : Microlitre

Problématique

Les *Archaea* halophiles sont un groupe de microorganismes n'ayant pas été assez considérés pour leurs applications biotechnologiques, qui peuvent être hétéroclites et toucher les enzymes, les exo- et endopolymères et les biosurfactants.

Les applications biotechnologiques potentielles d'un microorganisme en général et des *Archaea* halophiles en particulier sont souvent entravées par de faibles taux de croissance et de production de métabolites. L'optimisation par les plans factoriels permet d'une part d'aboutir à une croissance rapide du microorganisme en réduisant son temps de génération, et d'autre part de déterminer les interactions qui existent entre les différents facteurs physico-chimiques supposés influencer la croissance.

L'administration excessive et souvent inappropriée d'antibiotiques a engendré une augmentation considérable de la résistance aux antibiotiques. Les *Archaea* halophiles commencent tout juste à être scrutées pour la production d'antibiotiques de nature protéiques appelés halocines. La production d'halocines est une caractéristique commune des *Archaea* halophiles. Néanmoins jusqu'à ce jour peu d'halocines sont caractérisées. L'optimisation de leur production permet d'aboutir à de grandes concentrations en un temps réduit ce qui rend leur étude plus pratique et moins onéreuse.

Dans ce travail, un plan factoriel a été appliqué dans le but d'optimiser le milieu et les conditions de culture d'une souche d'*Archaea* halophile SWO25 pour atteindre un taux de croissance et une production d'halocines maximales.

Introduction

Bibliographique

I. Les *Archaea*

Les *Archaea* sont des microorganismes procaryotes, reconnues comme un groupe à part du vivant grâce aux travaux de Woese *et al.* (1977) puis en 1990 reconnues par le même auteur comme le troisième domaine du vivant se distinguant de celui des *Bacteria* et des *Eucarya*.

L'arbre phylogénétique des *Archaea* se divise en deux principaux phyla : les *Crenarchaeota* et les *Euryarchaeota* (Woese *et al.* 1990). Parmi les *Archaea* cultivables, les *Crenarchaeota* sont représentés par des espèces hyperthermophiles et psychrophiles ayant la capacité de métaboliser le soufre (Prescott *et al.* 2003). Les *Euryarchaeota* regroupent des *Archaea* physiologiquement diverses et beaucoup sont endémiques des environnements extrêmes. Cette lignée inclut les méthanogènes et les *Haloarchaea* (Madigan et Martinko, 2007).

I.1 Les *Archaea* halophiles

Par définition un halophile extrême nécessite au moins 1,5 M (environ 9%) de NaCl pour sa croissance, et 2 à 4 M pour une croissance optimale, mais la plupart peuvent croître à des concentrations proches de la saturation (Madigan et Martinko, 2007). A de faible concentrations de sels, les cellules lysent (Schneegurt, 2012).

I.1.1 Mécanisme d'adaptation au sel

Du fait de la perméabilité de la membrane cytoplasmique, les halophiles extrêmes doivent maintenir de fortes concentrations en sels dans leur cytoplasme pour atteindre l'équilibre osmotique, cette stratégie est désignée sous le terme "salt-in" (Oren, 2006b). Les *Archaea* halophiles maintiennent cet équilibre en accumulant de fortes concentrations d'ions inorganiques. Dans la plupart des cas le K^+ comme cation et le Cl^- comme anion (Oren, 2013a). Ces conditions intracellulaires requièrent une adaptation spécifique des protéines, en effet les acides aminés acides (glutamate et aspartate) représentent jusqu'à 20% des acides aminés totaux des protéines halophiles (Danson et Hough, 1997). Ces dernières ont également un taux élevé d'acides aminés hydrophobes comparativement aux protéines non halophiles (Lanyi, 1974). Les *Archaea* halophiles sont donc une source importante de protéines naturellement halophiles et peuvent servir de modèle pour l'étude de la structure et du fonctionnement des enzymes dans ces conditions extrêmes.

I.1.2 Habitat

Les *Archaea* halophiles sont largement répartis dans les écosystèmes hypersalins. Les environnements aquatiques englobent les lacs salés naturels (Grand Lac Salé, Utah et la Mer Morte) et les marais salants (Oren, 2006b) où la densité des *Haloarchaea* est élevée, de l'ordre de 10^7 à 10^8 cellules par ml (Oren, 2006a). Cette forte densité fait que les environnements hypersalins sont colorés en rouge, par la présence de pigments de type caroténoïde (α -bactéroruberine C50) localisés dans la membrane cellulaire (DasSamra *et al.* 2009). Ces pigments protègent la cellule de la photooxydation (Kanekar *et al.* 2012), et absorbent les radiations solaires ce qui engendre une augmentation de la température. Cette hausse de température engendre une évaporation plus importante et donc augmente la production de sels (Oren, 2006a). La distribution des *Haloarchaea* dans la nature dépend de la concentration en sels, la composition ionique et la disponibilité des nutriments dans ces milieux hypersalins (Oren, 2006b).

Bien qu'unis par leur capacité à croître à de fortes salinités, les *Archaea* halophiles sont très variés du point de vue physiologique (alcalophiles, thermophiles facultatifs, thermoalcalophiles et psychrotolérants) et possèdent diverses voies métaboliques (Madigan et Martinko, 2007). Cette diversité physiologique et leur culture relativement facile, font qu'ils sont des organismes modèles pour l'étude de la biologie des *Archaea* (Lynch *et al.* 2012).

I.1.3 Classification et phylogénie

Les *Archaea* halophiles sont classés dans un unique ordre, *Halobacteriales*, qui compte l'unique famille des *Halobacteriaceae* (DasSamra *et al.* 2009). Actuellement (Mai 2013) et selon le sous-comité de taxonomie des *Halobacteriaceae* de L'ICSP, cette famille compte 33 genres. Oren *et al.* (1997) ont proposé des normes pour la description des nouvelles espèces au sein de l'ordre des *Halobacteriales*. La taille et la forme des colonies, morphologie des cellules, mobilité, pigmentation, conditions physico-chimiques de croissance, tests de dégradation de différents substrats, caractérisation des lipides polaires, le GC% de l'ADN, les séquences de l'ARNr 16S et l'hybridation ADN-ADN sont nécessaires pour la description de nouvelles espèces.

Comme pour les Bactéries et les Eucaryotes, il existe des virus spécifiques aux *Archaea* halophiles appelés halophages (Atanasova *et al.* 2012). Hs-1 est un phage qui provoque la lyse des cellules de *Halobacterium salinarum* (Sabet, 2012).

II. Les halocines

La production de peptides ou de protéines antibiotiques est connue dans les trois domaines du vivant ; les bactéries produisent des bactériocines, les eucaryotes des eucaryocines, les *Archaea* des archaeocines et les *Archaea* halophiles des halocines (O'Connor et Shand, 2002 ; Shand et Leyva, 2007).

Les halocines ont été découverte par Rodriguez-Valera *et al.* (1982) par une étude d'antagonisme faite sur plus de 40 souches d'halophiles extrêmes. Les travaux de Torreblanca *et al.* (1994) ont permis de conclure que "la production d'halocines est une caractéristique quasi universelle chez les *Archaea* halophiles de forme bâtonnet". Actuellement 11 halocines sont connues (Tableau I).

II. 1 Rôle des halocines dans l'environnement

L'ubiquité de la production d'halocines nous amène à supposer que ces dernières sont largement répandues dans les milieux hypersalins. Cette hypothèse soulève une autre question : "Les halocines sont-elles impliquées dans la compétition entre les *Haloarchaea* dans les marais salants ?" (Kis-Papo et Oren, 2000). Des échantillons, exempts de cellules, concentrés, prélevés de différents milieux hypersalins et à différentes périodes de l'année n'ont révélés aucune activité inhibitrice sur 12 souches cibles, tandis que les cellules des échantillons produisaient des halocines *in vitro*. Cette étude a permis de conclure que probablement en milieux naturels, les halocines n'étaient pas produites, et que ces dernières n'intervenaient pas dans la compétition entre les espèces. L'explication téléologique de la production d'halocines est la lyse du germe cible pour libérer des nutriments (Shand et Leyva, 2007).

II. 2 Spectre d'activité

Les bactériocines ont un spectre d'activité étroit, se limitant aux bactéries proches du germe producteur (Shand et Leyva, 2007). Les études d'antagonisme au sein des *Haloarchaea* (Rodriguez-Valez *et al.* 1982 ; Torreblanca *et al.* 1994 ; Kis-Papo et Oren, 2000) montrent que les halocines ont un spectre d'activité large, agissant sur des espèces de différents genres

et parfois même sur des souches d'autres phyla (Haseltine *et al.* 2001). En effet les halocines R1, A4 et S8 ont une activité inhibitrice sur *Sulfolobus* spp (hyperthermophiles du phylum des *Crenarchaeota*), mais actuellement aucune halocine décrite n'a d'activité inhibitrice sur des bactéries (Shand et Leyva, 2007).

II. 3 Caractéristiques communes des halocines

Les halocines sont des antibiotiques peptidique (≤ 10 kDa) ou protéiques (>10 kDa) produits principalement par les genres *Haloferax*, *Halobacterium* et *Haloarcula*. A l'exception de l'halocine H1 produite en phase exponentielle (Platas *et al.* 2002), toutes les halocines décrites sont produites en fin de phase exponentielle (Shand et Leyva, 2007).

Les gènes codant pour les halocines sont tous codés dans des mégaplasmides (Price et Shand, 2000 ; Li *et al.* 2003 ; Shand et Leyva, 2007)., avec une boîte TATA typique des *Archaea*. Les halocines matures sont inactivés par des protéases ce qui confirme leur nature protéique. Les microhalocines (≤ 10 kDa) sont hydrophobes et robustes, résistent au dessalage, sont insensibles aux solvants organiques (acétone et acétonitrile), résistent à la chaleur et peuvent être conservés plusieurs années à 4°C sans perte d'activité. Les halocines protéiques sont par contre moins robuste du fait de leur thermolabilité et leur perte d'activité au-dessous de 5% de NaCl (Shand et Leyva, 2007).

II. 4 Applications des halocines

Dans la recherche de nouvelles substances antibiotiques, les halocines sont en général négligées. La raison est sans doute l'absence d'activité antibiotique contre des souches pathogènes (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus* et *Sarcina luteus*), et leur inactivation par des protéases (Litchfield, 2011).

L'halocine H6/H7 a une action spécifique sur les antiports Na^+/H^+ de *Halobacterium salinarum* (anciennement *H. halobium*) (Meseguer *et al.* 1995) mais aussi sur ceux des mammifères (Shand et Leyva, 2007). Cette halocine pourrait avoir des applications non pas comme agent antibiotique mais comme agent de contrôle de la pression sanguine (Litchfield, 2011). La découverte de cette application s'est faite grâce à l'élucidation du mode d'action de l'halocine H7. Par conséquent, les applications éventuelles des autres halocines sont tributaires de l'élucidation de leur mode d'action.

III. Description du genre *Haloarcula* et potentialités industrielles

Le genre *Haloarcula* a été décrit pour la première fois par Torreblanca *et al.* (1986). Les neuf espèces décrites jusqu'à ce jour ainsi que leurs caractéristiques sont regroupées dans le Tableau II.

Les espèces du genre *Haloarcula* sont très sensibles aux détergents (Burns et Dyll-Smith, 2006), pourtant une α -amylase extracellulaire produite par une souche affiliée à ce genre est active en présence de solvants organiques, à 50°C et à 4,3 M de NaCl (Fukushima *et al.* 2005), et une autre α -amylase stable en présence d'urée et à des concentrations de NaCl proches de la saturation (Hutcheon *et al.* 2005).

L'analyse du génome de quatre espèces du genre *Haloarcula* (*H. vallismortis*, *H. sinaiensis*, *H. marismortui* et *H. californiae*) montre qu'aucune d'entre elles ne possède de gènes codant pour des cellulases (Lynch *et al.* 2012). Néanmoins, une cellulase thermostable et halotolérante est produite par une souche de *Haloarcula* 2TK2 par immobilisation sur Na-alginate (Ogan *et al.* 2012). Cette propriété peut être exploitée pour la production de bioéthanol à partir de déchets cellulosiques, ou pour la dégradation des composés cellulosiques dans les eaux usées hypersalines (Zhuang *et al.* 2010).

Les polyhydroxyalkanoates (PHA) sont des substituts potentiels des plastiques dérivés du pétrole. Trois souches appartenant au genre *Haloarcula* possèdent la propriété de produire du polyhydroxybutyrate et des exopolysaccharides (Nicolaus *et al.* 1999). Les quatre espèces du genre *Haloarcula* citées plus haut disposent d'un gène codant pour une PHA synthase (Lynch *et al.* 2012). Cette propriété a été mise en pratique par Mukhopadhyay et Mukherjee (2012) qui ont utilisé les vinasses pour la production de PHA par *H. marismortui*.

La bacteriorhodopsine est une protéine qui fonctionne comme une pompe à protons utilisant l'énergie lumineuse pour générer un gradient de protons à travers la membrane cellulaire (Oren, 2006a). Elle est synthétisée par diverses *Archaea* halophiles et notamment les espèces du genre *Haloarcula* (Lynch *et al.* 2012). Les halobacteriorhodopsines possèdent des applications dans des domaines variés telles que la conversion de l'énergie solaire en électricité (Litchfield, 2012).

Tableau I : Caractéristiques des halocines décrites (Shand, 2006)

Halocine	A4	C8	G1	H1	H2	H3	H4	H5	H6/H7 ¹	R1	S8
Poids moléculaire ² (kDa)	7,4	6,3	-	31	-	-	34,9	-	32	3,8	3,6
Dépendance au sel	Non	Non	-	Oui	-	-	Partiellement ³	-	Non	Non	Non
Spectre d'activité	Large ⁴ <i>Sulfolobus</i> spp.	Large	Large	Large	Large	Large	Etroit	Etroit	Etroit	Large <i>Sulfolobus</i> spp., <i>Methanosarcina thermophila</i>	Large <i>Sulfolobus</i> spp.
Souche productrice	Souche TuA4	<i>Halobacterium</i> souche AS7092	<i>Halobacterium</i> souche GRB	<i>Haloferax mediterranei</i> Xai3	Souche GLA22	Souche GAA12	<i>Haloferax mediterranei</i> R4	Souche MA220	<i>Haloferax gibbonsii</i> Ma2.39	<i>Halobacterium</i> souche GN101	Souche S8a
Milieu d'isolement	Saline, Tunisie	Grand lac salé Chaida, Chine	Saline, France	Saline, Espagne	Saline, Espagne	Saline, Espagne	Saline, Espagne	Saline, Espagne	Saline, Espagne	Saline, Mexique	Grand lac salé, Utah, USA

¹ L'halocine H7 est classée comme une halocline H6, mais produite par un mutant de *Haloferax gibbonsii* Ma 239 renommé *Haloferax gibbonsii* SPH7.

² Poids moléculaire de la protéine mature.

³ Perez (2000) : H4 résiste au dessalage jusqu'à 150mM de NaCl.

⁴ Activité inhibitrice sur les haloarchaea.

Tableau II : Caractéristique des espèces décrites du genre *Haloarcula* (Burns et Dyall-Smith, 2006 ; Oren, 2006a ; Oren *et al.* 2009 ; Bowers et Wiegel, 2011 ; Namwong *et al.*, 2011 ; Oren, 2011 ; Schneegurt, 2012 ; Kanekar *et al.*, 2012)

Espèces	<i>H. vallismortis</i>	<i>H. hispanica</i>	<i>H. marismortui</i>	<i>H. japonica</i>	<i>H. argentinensis</i>	<i>H. quadrata</i>	<i>H. amylytica</i>	<i>H. salaria</i>	<i>H. tradensis</i>
Morphologie	Bâtonnets pléomorphiques	Bâtonnets pléomorphiques	pléomorphique	pléomorphique	pléomorphique	Pléomorphique à carré	Bâtonnets	Bâtonnets pléomorphiques	Bâtonnets pléomorphiques
Taille (µm)	0,6–1 × 3–5	0,3 × 0,5-1	1-2 × 2-3	0,2-0,5 × 2-5	0,3 × 1,0	2,0-3,0	0,6-0,8 x 2,0-2,5	0,6-0,8 x 1.0-2.0	0,8-1,2 x 1,0-2,5
[NaCl] optimum %	20,4-25	15,2	19,8-22,8	19,8	14,6-17,5	19,8-25	16,9-18,7	20-25	20-25
Temp. optimale (°C)	40	35-40	40-50	42	40	53	41	37	37
pH optimum	7,4-7,5	7,0	7,0	7,0-7,5	7,0	6,5-7,0	7,0-7,5	7,0	7,0
Séquence ARNr 16S (code d'accèsion)	U17593 D50581	U68541	X61688 X61689	D28872	D50849	AB010964 AB010965	DQ826512 DQ826513 DQ854818	FJ429317 FJ429318	FJ429313 FJ429316 FJ429314
Milieux d'isolement	Bassin salé, Vallée de la Mort, CA. USA	Saline, Espagne	Mer Morte	Saline, Japon	Marais salant, Argentine	Sebkha, Sinaï, Egypte	Lac salé Aibi, Chine	sauce de poisson Thaïlandaise, Thaïlande	sauce de poisson Thaïlandaise, Thaïlande
Références	Torreblanca <i>et al.</i> (1986)	Juez <i>et al.</i> (1986)	Oren <i>et al.</i> (1990)	Takashina <i>et al.</i> (1991)	Ihara <i>et al.</i> (1997)	Oren <i>et al.</i> (1999)	Yang <i>et al.</i> (2007)	Namwong <i>et al.</i> (2011)	Namwong <i>et al.</i> (2011)

IV. Modélisation par les plans d'expérience

Les expériences sont primordiales pour toute étude scientifique. Tout travail s'appuyant sur un grand nombre d'expériences est considéré comme pertinent. Les méthodes d'étude des phénomènes biologiques sont améliorées grâce au développement de méthodes mathématiques et statistiques d'analyse (Vanot et Sergent, 2005).

Les plans d'expériences servent à organiser des essais expérimentaux pour obtenir le maximum de renseignements avec le minimum d'expériences et la meilleure précision possible sur les réponses calculées avec le modèle. Dans une étude, une grandeur est mesurée à chaque essai, c'est la réponse. Cette dernière dépend de plusieurs facteurs. A ces derniers sont attribués des valeurs appelées niveaux (Goupy, 2000).

IV. 1 Plan factoriel à deux niveaux

Pour ce plan le nombre de niveaux est restreint à deux : le niveau bas (-1) et le niveau haut (+1). Pour trois facteurs, le domaine d'étude est un cube (Figure 1). Le modèle mathématique postulé est un modèle du premier degré par rapport à chaque facteur. Le modèle est :

$$y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_{12}X_1X_2 + a_{13} X_1X_3 + a_{23} X_2X_3 + a_{123} X_1X_2X_3$$

avec y réponse,

x_i niveau attribué au facteur i ,

a_0 valeur de la réponse au centre du domaine d'étude,

a_i effet (ou effet principal) du facteur i ,

a_{ij} interaction entre les facteurs i et j .

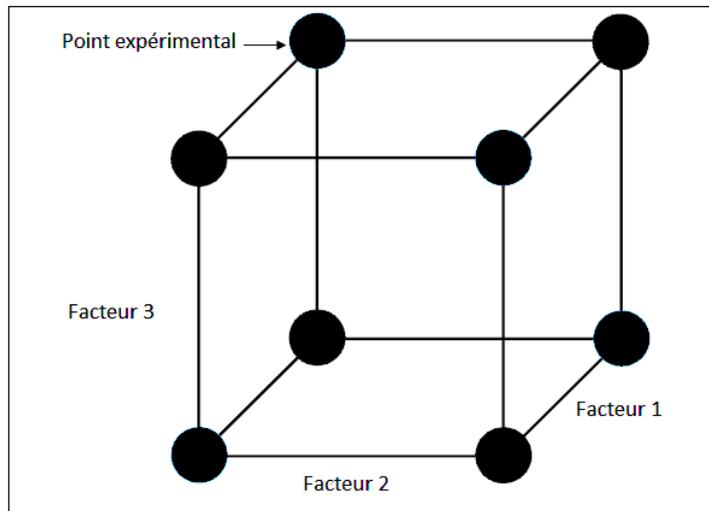


Figure 1 : Représentation graphique de l'espace expérimental et des points expérimentaux

IV. 2 Analyse du plan factoriel

Minitab est un logiciel adapté aux plans d'expériences, il effectue non seulement le calcul des coefficients mais aussi les calculs statistiques permettant d'évaluer la qualité du modèle mathématique. Le logiciel est aussi programmé pour effectuer les analyses de variance, pour tracer des courbes d'iso-réponses, pour construire les surfaces de réponse et pour déterminer les zones d'intérêt. Cet ensemble de possibilités permet d'extraire toute l'information présente dans les résultats d'un plan d'expérience (Goupy, 2000).

Matériel

et

Méthodes

I. Matériel

I. 1 Microorganismes

- Le microorganisme producteur d'halocine

La souche utilisée pour la production d'halocine, est une archée halophile (SWO25), isolée de la sebka d'Ouargla. L'analyse phylogénétique basée sur la comparaison des séquences de l'ARNr 16S a permis de classer cette souche dans le genre *Haloarcula* (Idres *et al.* données non publiées).

- La souche cible

Halobacterium salinarum étant sensible à la majorité des halocines décrites (Kis-Papo et Oren, 2000 ; Shand, 2006), la souche de référence *H. salinarum* DSM 3754 est utilisée pour la mise en évidence de l'halocine produite par la souche SWO25.

I. 2 Milieux de culture

Un milieu pour halobactérie est utilisé pour la croissance des deux souches de cette étude. La culture liquide est réalisée dans le milieu Brown (Br) contenant (p/v) : 25% de NaCl, 2% de MgSO₄, 0,2% de KCl, 0,3% de citrate trisodique et 0.5% d'extrait de levure. Le pH est ajusté à 7.2 par addition de NaOH à 1N. La stérilisation s'effectue par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

Les milieux solides et semi-solides sont additionnés de 1,5% et 1% (p/v) d'agar respectivement.

I. 3 Logiciel d'analyse des données

Le calcul des coefficients et les calculs statistiques permettant d'évaluer la qualité des modèles mathématiques sont effectués à l'aide du logiciel Minitab 15.1.30 (Minitab, Inc. Pennsylvania. USA). Le logiciel Minitab est un logiciel de statistiques dans lequel une partie est consacrée aux plans d'expériences.

II. Méthodes

II. 1 Culture de la souche SWO25

- **Préparation de la préculture**

La souche SWO25 est conservée au réfrigérateur à 4°C. Après un repiquage sur milieu solide afin de vérifier sa pureté, une colonie est ensemencée sur milieu Brown liquide. La culture est incubée à 40°C et est arrêtée en début de phase exponentielle (après environ 36h).

- **Culture en milieu liquide**

Des Erlenmeyer de 100 ml contenant 25 ml de milieu sont inoculés avec 1% (v/v) de la préculture, puis incubés dans un bain-marie (HS-B20 digital, IKA Labortechnik, Allemagne), à 40°C et une agitation de 120 rpm. Des prélèvements de 1,5ml sont effectués tout au long de la culture et sont conservés dans des Eppendorf au réfrigérateur à 4°C jusqu'à l'analyse.

II. 2 Estimation de la croissance

La croissance de la souche SWO25 est mesurée par turbidimétrie avec un spectrophotomètre UV-Visible (UV mini 1240, Shimadzu). L'absorbance maximale (λ_{\max}) est déterminée expérimentalement, après extraction par acétone/méthanol 1/1 (v/v) (Tao *et al.* 2007) et élimination des pigments, un balayage entre 700 et 400nm a permis d'estimer le λ_{\max} des cellules.

Les échantillons prélevés sont d'abord dilués au 1/10^{ème} dans une solution saline (15% NaCl et 2% MgSO₄ (p/v)), puis leurs absorbances sont mesurées à 610nm.

Le taux de croissance maximal (μ_{\max}) est tiré à partir de l'équation suivante :

$$\ln X = \ln X_0 + \mu (t - t_0)$$

Où X_0 est la DO₆₁₀ mesurée à t_0 , en début de phase exponentielle et X la DO₆₁₀ mesurée au temps t (h) qui correspond à la fin de la phase exponentielle (voir annexe 1).

II. 3 Mise en évidence de l'activité antibiotique

La détection de l'activité antibiotique est réalisée suivant la méthode décrite par Shand (2006) :

II. 3.1 Préparation de l'inoculum du germe cible

Afin d'accélérer la croissance relativement lente de *H. salinarum* sur milieu solide qui retarde l'apparition de zones d'inhibition, il est nécessaire de suivre les étapes suivantes :

1. A partir d'une culture en phase exponentielle, les cellules sont diluées dans le milieu Br de façon à avoir une DO_{600} de 0,01 ;
2. La culture ainsi diluée est incubée le temps nécessaire pour que la DO_{600} soit $\leq 0,2$ puis diluée de la même manière que dans l'étape (1) ;
3. La culture de l'étape (2) est incubée le temps nécessaire pour atteindre une DO_{600} entre 0,6 et 0,8.

II. 3.2 Inoculation du germe cible en double couche

Le milieu solide est d'abord coulé dans des boîtes de Petri. Après solidification de la gélose, le milieu semi-solide (en surfusion à 60°C) inoculé par le germe cible de manière à avoir une DO_{600} de 0,01 est étalé en surface.

II. 3.3 Dépôt des échantillons en spots

Les prélèvements sont centrifugés à 10 000 rpm pendant 10 min dans le but d'éliminer les cellules. A partir des surnagants de culture, des spots de 10 μ l sont déposés sur la gélose contenant le germe cible en présence du témoin négatif (milieu Br nonensemencé). Les boîtes de Petri doivent être délicatement mises dans des sacs en plastique scellés pour éviter la cristallisation des sels par évaporation, puis incubées à 40°C.

L'activité antibiotique est exprimée par le diamètre de la zone d'inhibition (D). Le germe cible *H. salinarum* produit un pigment de couleur rouge, les zones claires (non colorées) correspondant aux zones d'inhibition sont facilement observables.

II. 4 Vérification de la production d'halocine

Une culture de la souche SWO25 sur milieu liquide est réalisée dans le but de vérifier la production d'halocines. Des tests d'activité sont effectués sur le surnageant des prélèvements selon la méthode décrite dans la partie II. 3.

II. 5 Test des phages

Le test des phages est réalisé suivant la méthode décrite par Torreblanca *et al.* (1994). Un cylindre d'agar est découpé dans la zone d'inhibition puis mélangé à une suspension fraîche du germe cible. Après incubation à 40°C pendant une nuit, 10µl du surnageant de culture sont déposés sur milieu gélosé ensemencé par le germe cible. La présence de phages se traduit par une plage de lyse au niveau des spots.

II. 6 Action des protéases sur les surnageants actifs

Afin de confirmer la nature protéique de la substance active, un test d'inactivation de cette dernière par l'action de protéases est réalisé. Des solutions de protéinase K à 5 et 10 mg/ml sont préparées dans du tampon phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$), à 0,01M et à pH 7. 25µl de la solution mère de chaque enzyme sont mélangés à 75µl d'un extrait actif. Après 1h d'incubation à 37°C, les mélanges de chaque enzyme sont traités à la chaleur à 100°C pendant 10min dans le but de dénaturer les protéases et l'activité résiduelle est recherchée dans 10µl de chaque mixture. 10µl d'un témoin positif (75µl d'extrait actif + 25µl du tampon phosphate + traitement à la chaleur) et d'un témoin négatif (solution tampon + protéase + traitement à la chaleur) sont également testés.

II. 7 Estimation des optima de croissance et de production de l'halocine

Les effets des constituants du milieu, chacun indépendamment de l'autre, sur la croissance (exprimé par μ) et la production de l'halocine (D observé après 40h de culture) a été investigué par la méthode un seul facteur à la fois (OFAT). L'effet du NaCl a été étudié en cultivant la souche SWO25 sur le milieu Br à des concentrations de NaCl de 20, 25 et 30% (p/v). De même pour l'effet de la concentration du MgSO_4 , la souche a été cultivée sur milieu Br à des concentrations de MgSO_4 de 2,5, 5 et 7,5% (p/v).

II. 8 Optimisation de la croissance et de la production de l'halocine

D'après les données de la littérature sur les caractéristiques des espèces du genre *Haloarcula* (Burns et Dyll-Smith, 2006 ; Oren, 2006a ; Bowers et Wiegel, 2011 ; Namwong et al, 2011 ; Oren, 2011 ; Schneegurt, 2012 ; Kanekar et al, 2012) et selon l'étude par la méthode OFAT, les concentrations de NaCl et de MgSO₄ dans le milieu ainsi que la température d'incubation sont les paramètres qui influencent la croissance et la production d'halocine.

Dans le but d'optimiser la croissance de la souche (réponse y_1 , exprimée par le taux de croissance μ) et d'accroître la production de l'halocine (réponse y_2 , exprimée par le diamètre de la zone d'inhibition D), un plan factoriel complet à deux niveaux et à trois facteurs, soit un plan 2^3 , a été adopté (Tableau III). Les expériences aux points centraux sont réalisées en triplicata, soit un total de 11 expériences. La matrice d'expériences est présentée dans le tableau IV.

Tableau III : Facteurs et domaine expérimental

Variables réelles	Variables centrées réduites	Niveau bas	Niveau moyen	Niveau haut
		-1	0	+1
[NaCl] (%) (ou Z_1)	X1	20	25	30
[MgSO ₄] (%) (ou Z_2)	X2	2,5	5	7,5
Température (°C) (ou Z_3)	X3	35	40	45

Le passage des variables d'origine aux variables centrées réduites x_j , et inversement, est donné par la formule :

$$x_j = \frac{Z_j - Z_j^0}{\Delta Z_j}$$

Z_j^0 est la valeur de la variable réelle Z_j correspondant au centre du domaine expérimental. ΔZ_j est l'unité ou l'intervalle de variation suivant l'axe des Z_j . Ces valeurs sont définies comme suit :

$$Z_j^0 = \frac{Z_j^{\max} + Z_j^{\min}}{2} ; \Delta Z_j = \frac{Z_j^{\max} - Z_j^{\min}}{2}$$

Z_j^{\max} et Z_j^{\min} sont respectivement le niveau maximal et minimal de la variable Z_j considérée. Sur le tableau IV sont regroupées les valeurs de ces paramètres.

Tableau IV : Matrice d'expériences en unités centrées réduites

Essais	X1	X2	X3
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	1	-1	-1
6	1	-1	1
7	1	1	-1
8	1	1	1

Résultats

et

Discussion

I. Vérification de la production d'halocines

Les tests d'activité des surageants de culture de la souche SWO25 révèlent des zones d'inhibitions autour des spots (Figure 2). Ce résultat montre que cette souche produit des antibiotiques qui inhibent la croissance du germe cible.



Figure 2 : Zone d'inhibition du germe cible autour du spot

II. Test des phages et des protéases

La recherche de phages a permis d'observer une croissance du germe cible *H. salinarum* sur milieu Br solide au lieu d'une plage de lyse ce qui élimine la possibilité que les zones d'inhibition soient dues à un phage.

L'effet des protéases a montré que l'activité antibiotique n'est plus détectable en présence de protéinase K. Ces observations démontrent que les zones d'inhibition autour des spots sont dues à une halocine.

III. Effet des sels sur la croissance et la production d'halocines

III.1 Effet du NaCl

La croissance de la souche SWO25 à différentes concentrations de NaCl (Figure 3) révèle qu'elle croît mieux à 20 et 25% de NaCl. A 30% de NaCl la croissance est relativement lente. Ces résultats nous permettent de conclure que la concentration de NaCl optimale se situe à probablement l'intervalle 20-25% ce qui est en accord avec les optima de croissance de *Haloarcula vallismortis*, *H. quadrata*, *H. salaria* et *H. tradensis* (Oren, 2006a ; Bowers et Wiegel, 2011 ; Namwong *et al*, 2011). Toutefois, ces résultats ne permettent pas d'exclure la

possibilité que l'optimum soit entre 25 et 30% car des interactions entre les différents constituants du milieu, et spécialement les sels, existent (Schneegurt, 2012).

Le diamètre des zones d'inhibition obtenues à différentes concentrations de NaCl sont plus faibles à 30% (13 mm) comparativement à 20 et 25% (17,5 et 18,5 mm respectivement). L'activité maximale de l'halocine Sech7a produite par *Haloferox mediterranei* est obtenue à 20% de NaCl (Pasic *et al.* 2008) et à moins de 20% pour l'halocine H1 produite par la souche *H. mediterranei* M2a (Platas *et al.* 2002).

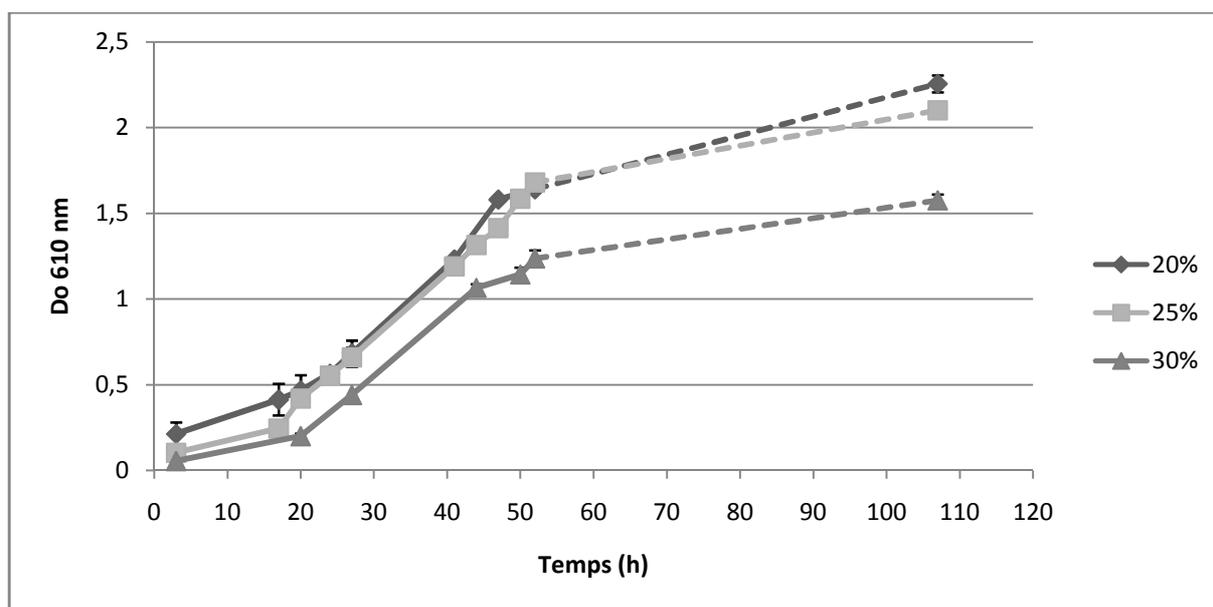


Figure 3 : Croissance de la souche SWO25 à différentes concentrations de NaCl

III.2 Effet du MgSO₄

La culture de la souche SWO25 sur milieu Br à différentes concentrations de MgSO₄ montre que des concentrations relativement élevées sont requises pour une meilleure croissance (Figure 4). Comparativement aux espèces du genre *Haloarcula* mais aussi à la plupart des *Haloarchaea*, cette souche tolère de fortes concentrations de MgSO₄ (Burns et Dyall-Smith, 2006 ; Oren *et al.* 2009 ; Bowers et Wiegel, 2011 ; Kanekar *et al.*, 2012). Dans les milieux hypersalins proposés par ATCC pour les microorganismes halophiles, seule deux d'entre eux ont une concentration de MgSO₄ supérieure à 5%.

Les résultats des tests d'activité n'ont révélé aucune influence de la concentration de MgSO₄ sur la production de l'halocine, le diamètre des zones d'inhibition étant de 14 mm dans les trois cas.

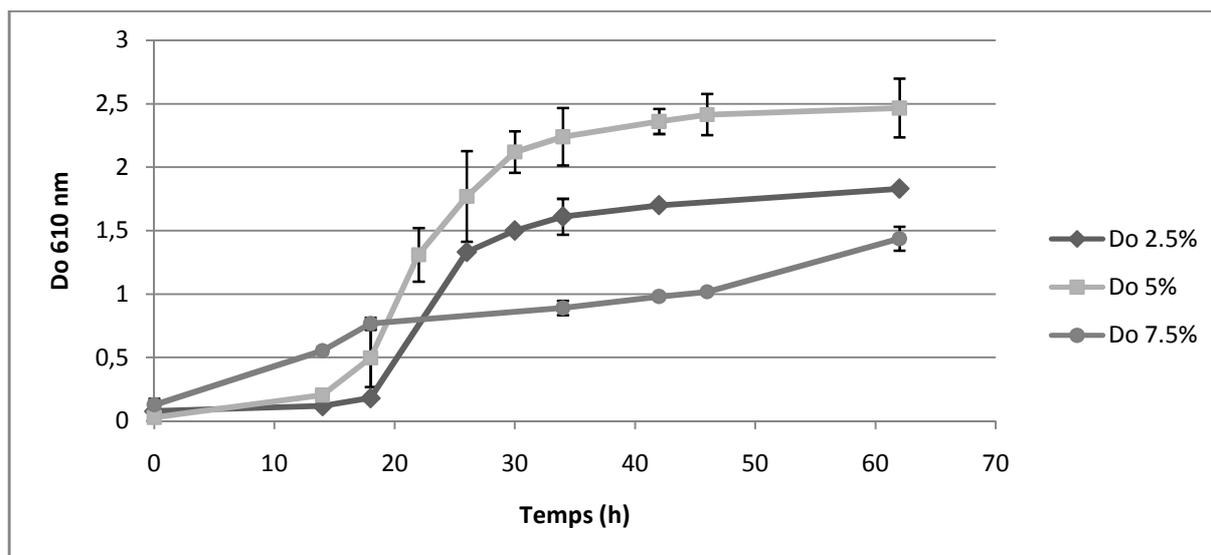


Figure 4 : Croissance de la souche SWO25 à différentes concentrations de $MgSO_4$

Le taux de croissance maximale obtenu en variant les concentrations du NaCl et du $MgSO_4$ dans le milieu est de $0,146\text{ h}^{-1}$ correspondant à un temps de génération de 4,75 h. Dans les conditions optimales, les *Halobacteriaceae* ont un temps de génération entre 1,5 h pour *Haloterrigena turkmenica* et 3,0 h pour *Haloarcula vallismortis* et *Halorubrum saccharovorum* (Robinson *et al.* 2005), ce qui signifie que le temps de génération de la souche SWO25 peut encore être réduit.

IV. Optimisation de la croissance et de la production de l'halocines

Les résultats de l'étude préliminaire, montrent que la concentration de NaCl dans le milieu de culture influençait la croissance et la production d'halocines par la souche SWO25, tandis que la concentration du $MgSO_4$ n'affectait que la croissance. Afin d'examiner les effets combinés de ces variables et de la température sur la croissance et la production d'halocines, 11 expériences sont réalisées suivant un plan factoriel complet et les résultats expérimentaux sont présentés dans le tableau V et dans la figure 5 (annexe 2).

Tableau V : Matrice d'expériences et résultats expérimentaux

	[NaCl]	[MgSO ₄]	T	μ	D
OrdEssai	X1	X2	X3	Y1	Y2
1	-1	-1	-1	0,09923	15
2	-1	-1	1	0,18777	13
3	-1	1	-1	0,13064	15
4	-1	1	1	0,26720	18
5	1	-1	-1	0,15804	17
6	1	-1	1	0,08951	18
7	1	1	-1	0,10286	17
8	1	1	1	0,07100	16
9	0	0	0	0,14020	16
10	0	0	0	0,14330	16
11	0	0	0	0,14960	17

IV. 1 Elaboration du modèle pour la croissance

Le calcul des coefficients est effectué par le Logiciel Minitab et les résultats sont présentés dans le tableau VI. Dans le domaine expérimental, une croissance maximale est observée lorsque la concentration de NaCl est minimale (-1), la concentration du MgSO₄ maximale (+1) et la température maximale (+1).

IV. 1. 1 Test de signification des coefficients

La signification des coefficients est vérifiée grâce au test de Student. Dans ce but, il est nécessaire de disposer d'une estimation de l'erreur aléatoire ou expérimentale. Les valeurs calculées du test de Student (Tcal) de chaque coefficient sont présentées dans le tableau VI. La valeur tabulée (Ttab) est de 4,3 pour $\alpha=0,05$ et nombre de degré de liberté 2 (Table de Student. annexe 3).

Dans le cas de X2 et de l'interaction X1X2X3, le Tcal est inférieur au Ttab, ce qui veut dire que ces deux coefficients ont un effet non significatif sur la croissance. L'équation du modèle postulé s'écrit donc :

$$\mu = 0,13828 - 0,03293 x_1 + 0,01559 x_3 - 0,02307 x_1x_2 - 0,04069 x_1x_3 + 0,01059 x_2x_3$$

Tableau VI : ANOVA de la croissance

Terme	Coefficients	T	P
Constante	0,13828	81,65	<0,001
X1	-0,03293	19,44	0,003
X2	0,00464	2,74	0,111
X3	0,01559	9,2	0,012
X1X2	-0,02307	13,62	0,005
X1X3	-0,04069	24,02	0,002
X2X3	0,01059	6,25	0,025
X1X2X3	-0,00142	0,84	0,49

Le digramme en barres de la figure 6 permet de visualiser la signification de chaque effet. Les barres qui dépassent des lignes rouges correspondant à l'incertitude absolue Δa_j sont significatives :

$\Delta a_j = +$ ou $-$ (T.saj) où T est la valeur tabulée (4,3) et saj est l'écart type pour les coefficients :
 saj = 0.00169

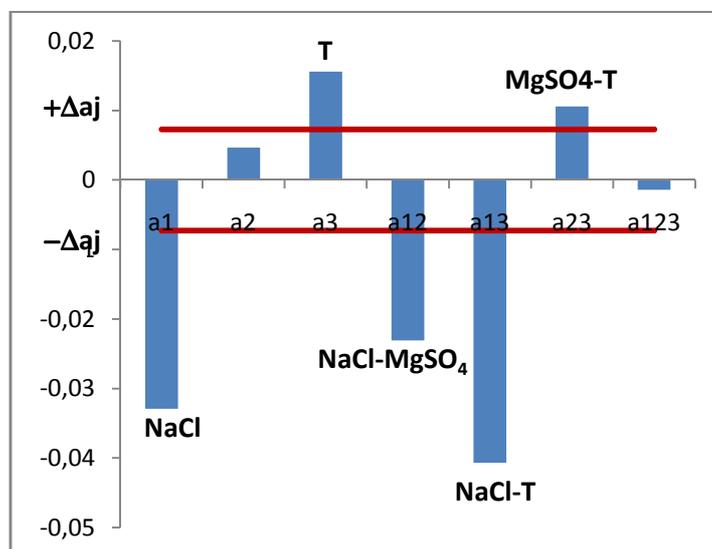


Figure 6 : Diagramme des effets

IV. 1. 2 Recherche de biais

La recherche de biais se fait à l'aide du test de Fisher-Snedecor, en comparant la variance résiduelle à la variance de reproductibilité :

$$F = S^2_{\text{rés}} / S^2_{\text{repr}}$$

La variance résiduelle est estimée par l'expression suivante (ddl=N-p=8-6=2):

$$S^2_{\text{rés}} = \frac{\sum_{i=1}^N (\mu_i - \hat{\mu}_i)^2}{N - p}$$

μ_i et $\hat{\mu}_i$ sont respectivement les valeurs des réponses mesurée et estimée par le modèle. Le nombre des essais ayant servi à estimer les coefficients $N = 8$ et p le nombre de coefficients significatifs, $p=6$.

Comme la valeur calculée du test de Fisher-Snedecor est inférieure à la valeur tabulée (Table de Fisher-Snedecor. Annexe 3) pour le niveau de signification $\alpha = 0,05$ et les degrés de liberté $N-p=2$ ($F_{\text{tab}} = 19,00$), le modèle postulé est sans biais. Cela veut dire que l'erreur dû à l'ajustement du modèle est inférieure à l'erreur expérimentale.

IV. 1. 3 Validation de l'équation

Comme le modèle ne présente pas de biais, on peut alors vérifier la signification de la régression en comparant la variance de régression à la variance due aux résidus.

La variance due à la régression est estimée par la somme des carrés des écarts :

$$S^2_{\text{rég}} = \frac{\sum_{i=1}^N (\hat{\mu}_i - \mu_{\text{moy}})^2}{p - 1}$$

μ_{moy} est la valeur moyenne des réponses mesurées aux sommets du domaine.

$$\mu_{\text{moy}} = 0,13828175 \text{ h}^{-1}$$

Comme la valeur calculée du test de Fisher : $F_{\text{cal}} = 61,523$ est supérieure à la valeur tabulée pour $\alpha=0,05$ et les degrés de liberté $p-1=5$ et $N-p=2$ ($F_{\text{tab}} = 19,30$), l'équation de régression est adéquate. Cela signifie que la part des variations expliquées par le modèle (ou par la régression) est significativement plus grande que celle due aux erreurs aléatoires (expérimentales). L'équation du modèle est donc valide à 95% et elle s'écrit :

$$\mu = 0,13828 - 0,03293 x_1 + 0,01559 x_3 - 0,02307 x_1 x_2 - 0,04069 x_1 x_3 + 0,01059 x_2 x_3$$

IV. 1. 4 Coefficients de détermination

La valeur du coefficient de détermination est calculée à l'aide du rapport suivant :

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (\hat{\mu}_i - \mu_{\text{moy}})^2}{\sum_{i=1}^N (\mu_i - \mu_{\text{moy}})^2} > 99\%$$

Cette valeur confirme un bon degré d'alignement des réponses. L'équation de 1^{er} degré est donc adéquate.

IV. 1. 5 Comparaison avec les essais au centre

La valeur estimée du taux de croissance au centre du domaine est de 0,138282 h⁻¹ alors que la valeur moyenne des réponses mesurées au centre est de 0,143667 h⁻¹. L'écart relatif entre ces deux valeurs étant inférieur à 5% (= 4,2%), le modèle linéaire de 1^{er} degré simule bien la croissance de la souche SWO25 et la courbure au centre du domaine peut être négligée.

IV. 2 Interprétation des interactions

Les résultats de l'effet du MgSO₄ par la méthode OFAT montrent qu'une concentration élevée de ce sel affectait négativement la croissance, ceci est probablement dû à l'effet chaotropique des ions Mg⁺⁺ (Hallsworth *et al.* 2007). Toutefois, la combinaison de 7,5% de MgSO₄ avec 20% de NaCl dans le milieu à 45°C a donné la meilleure croissance de la souche. À de faibles concentrations de NaCl, le MgSO₄ aide la cellule de *Halobacterium cutirubrum* à maintenir sa morphologie intacte (Schneegurt *et al.* 2012). Les ions Mg⁺⁺ ont un effet stabilisant de l'ADN et de la structure secondaire de l'ARN (Oren, 2013b)

À de fortes concentrations de NaCl, la croissance de la souche SWO25 est plus lente comparativement à 20% de NaCl. Ceci peut s'expliquer par l'effet qu'a le NaCl sur la solubilité de l'oxygène dans le milieu de culture. En effet, à 30% de salinité la solubilité de l'oxygène diminue de 80% (Schneegurt *et al.* 2012), or des espèces telles que *Haloarcula salaria* et *H. tradensis* sont aérobies strictes (Namwong *et al.* 2011). *H. vallismortis* et *H.marismortui* ont toutefois la capacité de croître en anaérobiose en présence de

nitrate (Oren, 2006a). *H. quadrata* est la seule espèce anaérobie stricte connue du genre *Haloarcula* (Bowers et Wiegel, 2011).

Le coefficient d'interaction NaCl – Température est très élevé et influe négativement sur la croissance. En effet la combinaison d'une concentration de NaCl de 20% et d'une température d'incubation de 45°C donne le meilleur taux de croissance dans le domaine expérimental. Ce qui est en accord avec la conclusion de Schneegurt (2012) que l'effet du NaCl sur les microorganismes halophiles et halotolérants est affecté par la température de croissance et la température optimale est affectée par la salinité. L'un des effets de la salinité est qu'elle peut réguler l'expression des gènes de *Haloferax volcanii* (Bidle, 2003).

A des températures élevées, la membrane cellulaire des microorganismes thermophiles devient plus perméable aux protons et à la diffusion des ions Na⁺ (Vossenberget al. 1995). Cet effet est plus important à de fortes concentrations en NaCl (Bowers et Wiegel, 2011), ce qui rend plus difficile le maintien de faibles concentrations intracellulaires de Na⁺ alors que cette dernière est très élevée dans le milieu extracellulaire. Cette difficulté est probablement la raison pour laquelle, jusqu'à aujourd'hui, aucun microorganisme hyperthermophile et halophile extrême n'a été isolé (Bowers et Wiegel, 2011). Ces informations permettent d'expliquer le diagramme de contour de la figure 7 qui montre clairement qu'une forte salinité couplée à une température élevée n'est pas une condition optimale pour la souche SWO25, au contraire la croissance de la souche dans ces conditions est minimale ($0,08 < \mu < 0,10 \text{ h}^{-1}$).

IV. 3 Elaboration du modèle pour la production d'halocine

Les résultats du calcul des coefficients et des testes statistiques sont présentés dans le tableau VII

Tableau VII : ANOVA de la production de l'halocine

Terme	Coefficients	T	P
Constante	16,125	79	<0,001
X1	0,875	4,29	0,05
X2	0,375	1,84	0,208
X3	0,125	0,61	0,603
X1X2	-0,875	4,29	0,05
X1X3	-0,125	0,61	0,603
X2X3	0,375	1,84	0,208
X1X2X3	-0,875	4,29	0,05

Comme toutes les valeurs des T correspondants aux effets linéaires et d'interactions sont inférieures à 4,3 (T tabulé), l'équation de ce modèle ne peut être utilisée pour la simulation de l'activité.

Cette absence de facteurs ayant un effet significatif sur la production de l'halocine est sans doute lié à la difficulté de déterminer la quantité réelle d'halocines produites par la souche SWO25 dans les conditions expérimentales, car une partie d'entre elles reste adsorbée à la paroi.

IV. 4 Optimisation de la croissance

Sur les graphiques de contour suivants, sont représenté les zones de croissances obtenues pour les interactions les plus influentes.

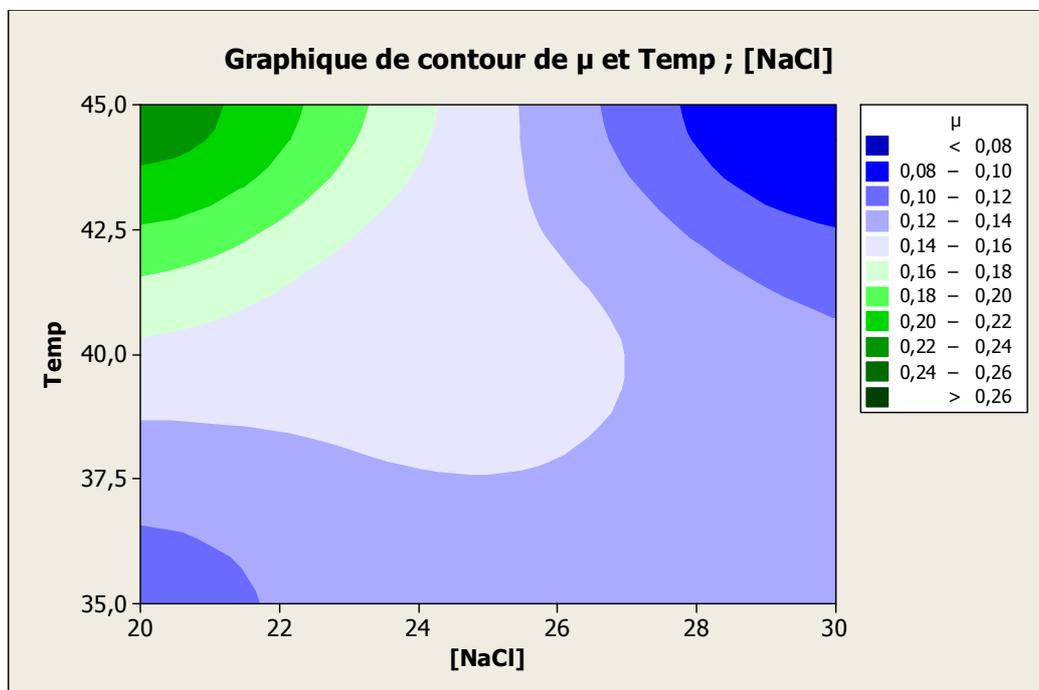


Figure 7 : Diagramme de contour dans le plan Température –NaCl

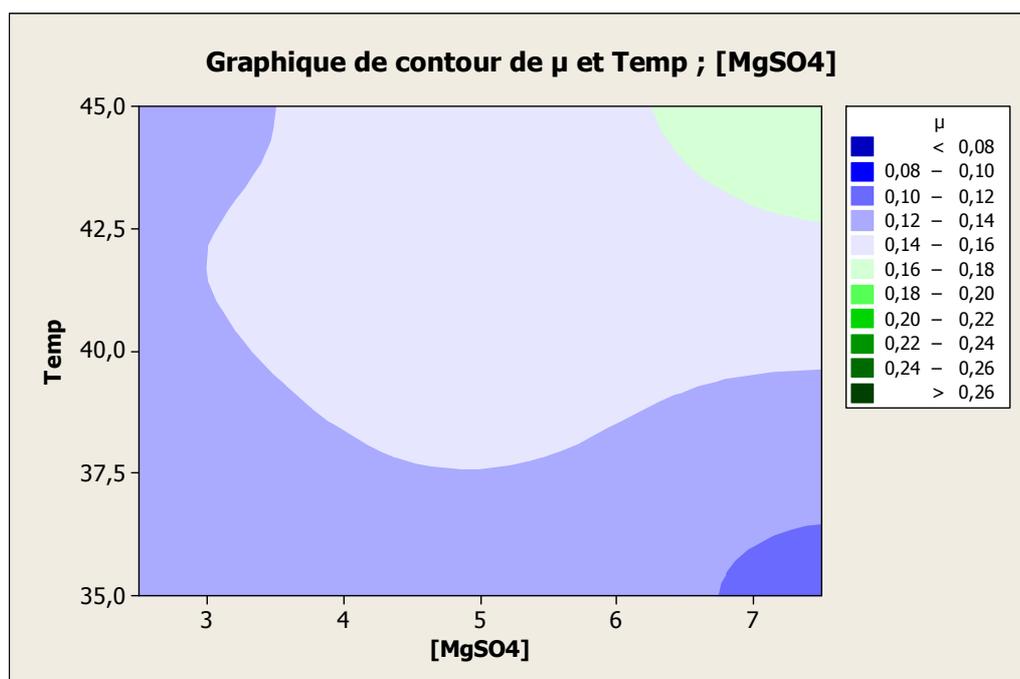


Figure 8 : Diagramme de contour dans le plan Température –MgSO4

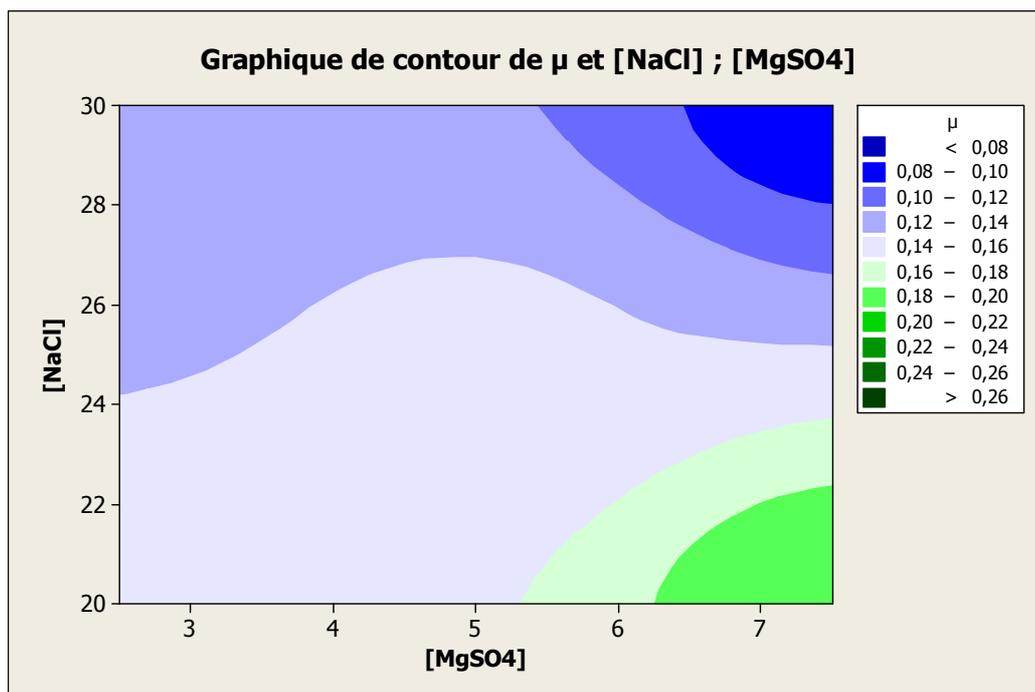


Figure 9 : Diagramme de contour dans le plan MgSO_4 –NaCl

L’observation des diagrammes ci-dessus permet de confirmer les constatations expérimentales concernant la croissance de la souche SWO25. En effet, un taux de croissance de $0,18$ à $0,24 \text{ h}^{-1}$ est obtenue à une température de 45°C , à une teneur en MgSO_4 de 7.5% et une concentration en NaCl de 20% .

V. Applicabilité

Pour confirmer l’applicabilité du modèle, la souche SWO25 est cultivée dans le milieu optimal de croissance. Une culture témoin en milieu Br non optimisé est également réalisée (Figure 10). Les taux de croissance obtenus ainsi que les temps de génération (tg) correspondants sont présentés dans le tableau VIII.

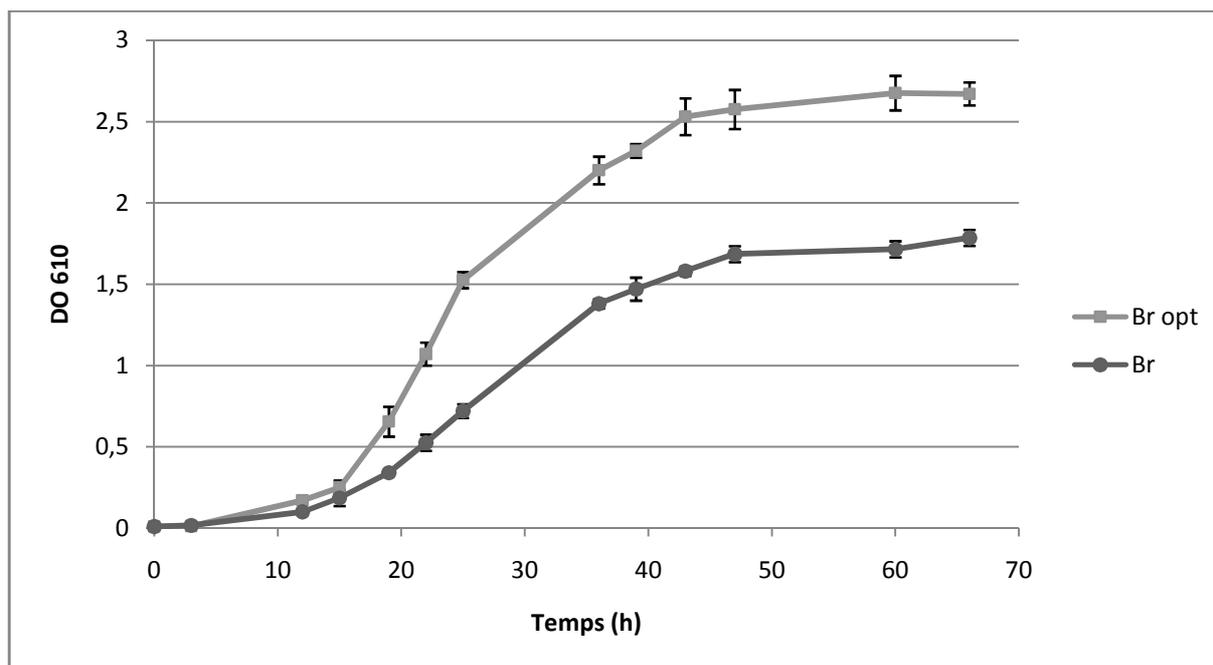


Figure 10 : Courbes de croissance en milieu témoin (●) et en milieu optimisé (■).

Tableau VIII : Croissance en milieu témoin et en milieu optimisé

Milieus	μ (h^{-1})	tg (h)
Br	0,125	5,54
Br opt.	0,238	2,91

La culture de la souche SWO25 dans le milieu optimisé a permis de passer d'un μ de $0,125 h^{-1}$ à un μ de $0,238 h^{-1}$. Le taux de croissance est ainsi multiplié par un facteur de 1,9.

Dans les conditions optimales, la souche S8a productrice de l'halocine S8 a un temps de génération de 3,75 h (Price et Shand, 2000). L'optimisation de la croissance de la souche de référence *Halobacterium salinaum* VKMM 013 a permis d'atteindre un taux de croissance de $0,185 h^{-1}$ correspondant à un tg de 3,75 h (Manikandan *et al.* 2009). L'espèce type *Haloarcula vallismortis* à un tg de $3,04 h \pm 0,2$ aux températures optimales entre 43 et 49°C (Robinson *et al.* 2005). A partir de ces résultats, le tg de 2,91 h de la souche SWO25 montre que la méthode employée pour optimiser la croissance est pratique et effective.

Conclusion

L'objectif de cette étude était d'optimiser la croissance et la production d'halocine par une souche d'*Haloarchaea* SWO25. La méthode des plans factoriels employée a permis d'aboutir à la modélisation de la croissance du microorganisme en fonction de la concentration de NaCl, de MgSO₄ et de la température, de concevoir des relations simples et fiables entre ces trois facteurs et la croissance de la souche, et enfin de déterminer les plages de variation optimales. Les tests statistiques ont permis de valider ce modèle. Une croissance optimale est atteinte lorsque les concentrations de NaCl et de MgSO₄ dans le milieu de culture sont respectivement de 20% et 7,5% et à une température d'incubation de 45°C.

Grâce à cette optimisation, le temps de génération de la souche SWO25 est passé de 5,54 h à 2,91h, soit une multiplication du taux de croissance par un facteur de 1,9. Cela permettra à l'avenir d'aboutir à de grandes concentrations de cellules dans le milieu en un temps réduit, ce qui ouvre d'autres perspectives de recherche dans le domaine de la biotechnologie incluant les enzymes actives dans les conditions extrême, les polyhydroxyalcanoates, les exopolysaccharides et les bacterioruberines.

Le modèle postulé pour la production de l'halocine n'est pas validé par les tests statistiques, et donc ce modèle ne peut être utilisé pour la simulation de la production de l'halocine. Une méthode plus fiable de quantification de l'halocine doit être mise au point. La perspective est de postuler un modèle quadratique par exemple à l'aide d'un plan isovariant par rotation. Dans ce cas, des essais en étoile et des essais supplémentaires au centre du domaine doivent être réalisés.

Références bibliographiques

- Atanasova NS, Roine E, Oren A, Bamford DH et Oksanen HM. (2012). Global network of specific virus-host interactions in hypersaline environments. *Environment Microbiology*. 14, 426–440.
- Bidle KA. (2003). Differential expression of genes influenced by changing salinity using RNA arbitrarily primed PCR in the archaeal halophile *Haloferax volcanii*. *Extremophiles*. 1, 1–7.
- Bowers KJ et Wiegel J. (2011). Temperature and pH optima of extremely halophilic archaea: a mini review. *Extremophiles*. 15, 119-128.
- Brown HJ et Gibbons NE. (1955). The effect of magnesium, potassium, and iron on the growth and morphology of red halophilic bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 1, 486–494.
- Burns D et Dyall-Smith M. (2006). Cultivation of Haloarchaea. *Methods in Microbiology*. 35, 535-552.
- Danson MJ et Hough DW. (1997). The structural basis of protein halophilicity. *Comparative Biochemistry & Physiology*. 117A, 307-312.
- DasSamra S, Coker JA et DasSamra P. (2009). Archaea (overview). In : Schaechter M (Eds.), *The Desk Encyclopedia of Microbiology*, pp. 118-139.
- De la Haba RR, Sanchez-Porro C, Marquez MC et Ventosa A. (2011). In : Koki Horikoshi (Eds.), *Extremophiles Handbook*, pp. 256-283.
- Fukushima T, Mizuki T, Echigo A, Inoue A et Usami R. (2005). Organic solvent tolerance of halophilic α -amylase from a Haloarchaeon, *Haloarcula* sp. strain S-1. *Extremophiles*. 9, 85-89.
- Gibbons NE. (1974). Family V. Halobacteriaceae fam. nov. In: Buchanan RE et Gibbons NE (Eds.), *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8^{ème} eds. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 269–273.
- Goupy J. (2000). Modélisation par les plans d'expériences. *Techniques de l'Ingénieur*. R275, 1-23.
- Goupy J. Manuel d'utilisation du logiciel Minitab. <<http://www.plansdexpériences.com>> (accessed 02.03.2013)

- Haseltine C, Hill T, Montalvo-Rodriguez R, Kemper SK, Shand RF et Blum P. (2001). Secreted Euryarchaeal microhalocins kill hyperthermophilic Crenarchaea. *Journal of Bacteriology*. 183, 287-291.
- Hutcheon GW, Vasisht N et Bolhuis A. (2005). Characterisation of a highly stable α -amylase from the halophilic archaeon *Haloarcula hispanica*. *Extremophiles*. 9, 487-495.
- Ihara K, Watanabe S et Tamura T. (1997). *Haloarcula argentinensis* sp. nov. and *Haloarcula mukohataei* sp. nov., Two New Extremely Halophilic Archaea Collected in Argentina. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 47, 73-77.
- Kanekar PP, Kanekar SP, Kelkar AS et Dhakephalkar PK. (2012). Halophiles – Taxonomy, diversity, physiology and applications. In: Satyanarayana T. *et al.* (Eds.), *Microorganisms in Environmental Management*, pp. 1-34.
- Kis-Papo T et Oren A. (2000). Halocins: are they involved in the competition between halobacteria insaltern ponds. *Extremophiles*. 4, 35-41.
- Lanyi JK. (1974). Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 272-290.
- Li Y, Xiang H, Liu J, Zhou M et Tan H. (2003). Purification and biological characterization of halocin C8, a novel peptide antibiotic from *Halobacterium* strain AS7092. *Extremophiles*. 7, 401-407.
- Litchfield CD. (2011). Potential for industrial products from the halophilic *Archaea*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 38, 1635-1647.
- Lynch EA, Langille MGI, Darling A, Wilbanks EG, Haltiner C, Shao KSY, Starr MO, Teiling C, Harkins TT, Edwards RA, Eisen JA et Facciotti MT. (2012). Sequencing of seven Haloarchaeal genomes reveals patterns of genomic flux. *PLoS ONE*. 7.
- Madigan TM et Martinko MJ. (2007). *Brock, Biologie des microorganismes*. Edition : Pearson. New Jersey. 1047p
- Manikandan M, Pasic L et Kannan V. (2009). Optimization of growth media for obtaining high-cell density cultures of halophilic archaea (family *Halobacteriaceae*) by response surface methodology. *Bioresource Technology*. 100, 3107-3112.
- Meseguer I, Torreblanca M et Konishi T. (1995). Specific inhibition of the Haloarcheal Na^+/H^+ antiporter by halocin H6. *The Journal of Biological Chemistry*. 270, 6450-6455.

- Namwong S, Tanasupawat S, Kudo T et Itoh T. (2011). *Haloarcula salaria* sp. nov. and *Haloarcula tradensis* sp. nov., isolated from salt in Thai fish sauce. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 61, 231-236.
- Nicolaus B, Lama L, Esposito E, Manca MC, Importa R, Bellitti MR, Duckworth AW, Grant WD et Gambocorta A. (1999). *Haloarcula* spp able to biosynthesize exo- and endopolymers. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 23, 489-496.
- O'Connor EM et Shand RF. (2002). Halocins and sulfolobocins: The emerging story of archaeal protein and peptide antibiotics. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 28, 23-31.
- Ogan A, Danis O, Gozuacik A, Cakmar E et Birbir M. (2012). Production of cellulase by immobilized whole cells of *Haloarcula*. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 48, 440-443.
- Oren A, Ginzburg M, Ginzburg BZ, Hochstein LI et Volcani BE. (1990). *Haloarcula marismortui* (Volcani) sp. nov. nom. rev. an extremely halophilic bacterium from the Dead Sea. . *International Journal of Systematic Bacteriology*. 40, 209-210.
- Oren A, Ventosa A et Grant WD. (1997). Proposed minimal standards for description of new taxa in the order Halobacteriales. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47:233–238
- Oren A, Ventosa A, Gutiérrez MC et Kamekura M. (1999). *Haloarcula quadrata* sp. nov., a square, motile archaeon isolated from a brine pool in Sinai (Egypt). *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49, 1149-1155.
- Oren A. (2006a). The Order Halobacteriales. *Prokaryotes*. 3, 113-164.
- Oren A. (2006b). Life at high salt concentrations. *Prokaryotes*. 2, 263-282.
- Oren A. (2013a). Life at high salt concentrations. In : E. Rosenberg et al. (Eds.), *The Prokaryotes - Prokaryotic Communities and Ecophysiology*, pp. 421-436.
- Oren A. (2013b). Life in Magnesium- and Calcium-rich hypersaline environments: Salt stress by chaotropic ions. In : Seckbach J *et al.* (Eds.). *Polyextremophiles: Life Under Multiple Forms of Stress*. 27, 215-232.
- Oren A, Arahal DR et Ventosa A. (2009). Emended descriptions of genera of the family *Halobacteriaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59, 637–642.
- Pasic L, Velikonja BH et Ulrich NP. (2008). Optimization of the culture conditions for the production of a bacteriocin from halophilic Archaeon Sech7a. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. 38, 229-245.

- Platas G, Meseguer I et Amils R. (2002). Purification and biological characterization of halocin H1 from *Haloferax mediterranei* M2a. *International Microbiology*. 5, 15-19.
- Pramanik A, Mitra A, Arumugam M, Bhattacharyya A, Sadhukhan S, Ray A, Haldar S, Mukhopadhyay UK et Mukherjee J. (2012). Utilization of vinasse for the production of polyhydroxybutyrate by *Haloarcula marismortui*. *Folia Microbiologica*. 57, 71-79.
- Prescott LM, Harley JP et Klein D. (2003). *Microbiologie*. Edition : deboeck. Bruxelles. 1137p.
- Price LB et Shand RF. (2000). Halocin S8: a 36-amino-acid microhalocin from the haloarchaeal strain S8a. *Journal of Bacteriology*. 182, 4951–4958.
- Rodriguez-Valera F, Juez G et Kushner DJ. (1982). Halocins: salt-dependent bacteriocins produced by extremely halophilic rods. *Canadian Journal of Microbiology*. 28, 151-154.
- Sabet S. (2012). Halophilic viruses. In: Vreeland RH (Eds.), *Advances in Understanding the Biology of Halophilic Microorganisms*, 81-116.
- Schneegurt MA. (2012). Media and conditions for the growth of halophilic and halotolerant bacteria and Archaea. In: Vreeland RH. (Eds.), *Advances in Understanding the Biology of Halophilic Microorganisms*.
- Shand RF. (2006). Detection, quantification and purification of halocins: Peptide antibiotics from haloarchaeal extremophiles. *Methods in Microbiology*. 35.
- Shand RF et Leyva K. (2007). Peptide and protein antibiotics from the domain Archaea: Halocins and Sulfolobocins. *Bacteriocins: Ecology and Evolution*, 93-109.
- Tao L, Yao H et Cheng Q. (2007). Genes from a *Dietzia* sp. For synthesis of C₄₀ and C₅₀ β-cyclic carotenoids. *Gene*. 386, 90-97.
- Torreblanca M, Rodriguez-Valera F, Juez G, Ventosa A, Kamekura M et Kates M. (1986). Classification of non-alkaliphilic Halobacteria based on numerical taxonomy and polar lipid composition, and description of *Haloarcula* gen. nov. and *Haloferax* gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology*. 8, 89-99.
- Torreblanca M, Meseguer I et Ventosa A. (1994). Production of halocin is a practically universal feature of archaeal halophilic rods. *Letters in Applied Microbiology*. 19, 201-205.
- Vanot GE et Sargent M. (2005). Experimental design in microbiology. *Microbial Processes and Products*. In: Barrodo JL. (Eds.), *Methods in Biotechnology*. 18, 25-39.

Vossenberg JLCM, Ubbink-Kok T, Elferink MGL, Driessen AJM et Konings WN. (1995). Ion permeability of the cytoplasmic membrane limits the maximum growth temperature of Bacteria and Archaea. *Molecular Microbiology*. 18, 925-932.

Woese CR et Fox GE. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences*. 74, 5088-5090.

Woese CR, Kandler O, et Wheelis ML. (1990). Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences*. 87, 4567-4579.

Yang Y, Cui H-L, Zhou P-J et Liu S-J. (2007). *Haloarcula amylolytica* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from Aibi salt lake in Xin-Jiang, China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57, 103-106.

Zhuang X, Han Z, Bai Z, Zhuang G et Shim H. (2010). Progress in decontamination by halophilic microorganisms in saline wastewater and soil. *Environmental Pollution*. 158, 1119-1126.

Annexe 1. Calcul du taux de croissance spécifique

Equation de la vitesse de croissance : $r_x = \frac{dX}{dt}$

Où X est la concentration cellulaire dans le milieu à l'instant t , déterminée par la loi de Beer-Lambert en mesurant l'absorbance à la longueur d'onde λ selon l'équation suivante : $A_\lambda = \varepsilon \cdot \ell \cdot X$ où ε est le coefficient d'extinction molaire ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$), et ℓ la longueur du trajet optique dans la solution traversée (cm).

On définit le taux de croissance spécifique μ par la rapport $\frac{r_x}{X} \Leftrightarrow r_x = \mu X$

$$\mu X = \frac{dX}{dt} \Leftrightarrow \mu \int_{t_0}^t dt = \int_{X_0}^X \frac{dX}{X} \Leftrightarrow \mu (t - t_0) = \ln X - \ln X_0$$

$$\boxed{\ln X = \ln X_0 + \mu (t - t_0)}$$

Annexe 2. Courbes de croissance aux points expérimentaux

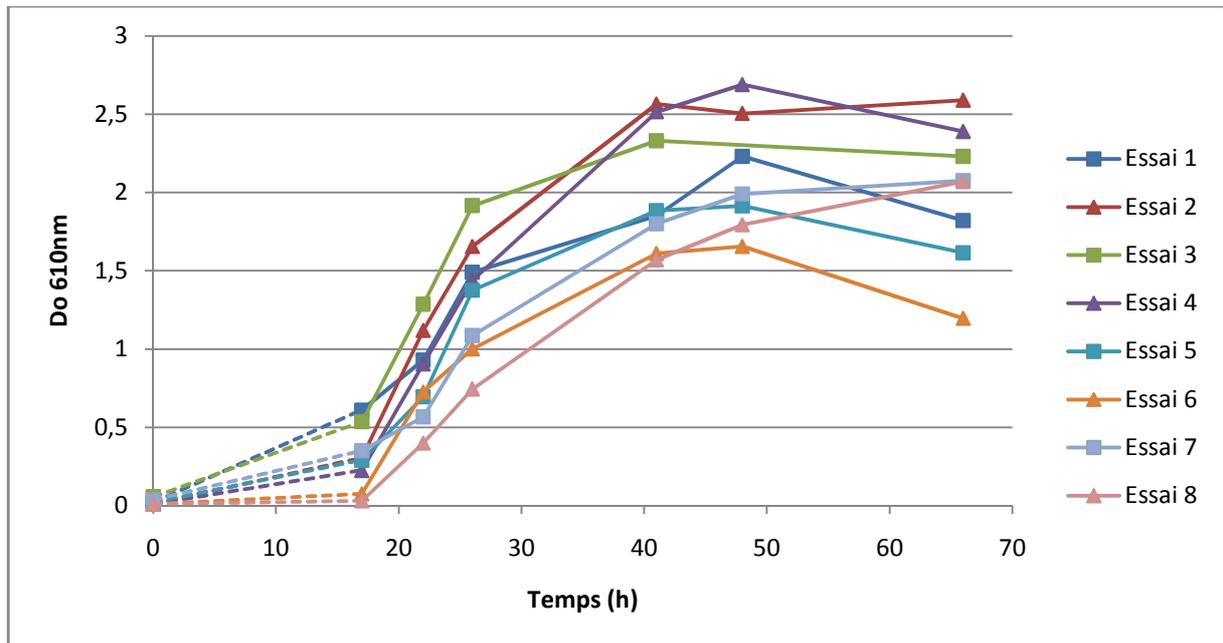
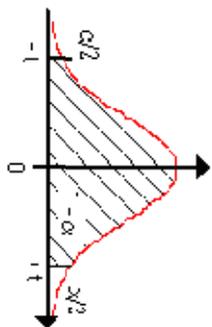


Figure 5 : Courbes de croissance des essais aux points expérimentaux

Annexe 3. Tables statistiques

Table de la Loi de Student

Cette table donne les fractiles de la loi de Student à v degrés de liberté : valeur t ayant la probabilité α d'être dépassée en valeur absolue : $P_{(\alpha)}(t < T < t) = 1 - \alpha$.
 Ou : $P_{(\alpha)}(T < -t) = \alpha/2 = P(T > t)$

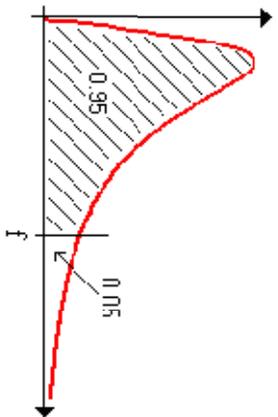


α bilatéral
1 - α / 2 (unilatéral)
v (degré de liberté)

	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0.05	0.02	0.01	0.005	0.001
	0.55	0.6	0.65	0.7	0.75	0.8	0.85	0.9	0.95	0.975	0.99	0.995	0.9975	0.9995
1	0.1584	0.3249	0.5095	0.7265	1	1.3764	1.9626	3.0777	6.3137	12.706	31.821	63.656	127.32	636.58
2	0.1421	0.2887	0.4447	0.6172	0.8165	1.0607	1.3852	1.8856	2.92	4.3027	6.9645	9.925	14.089	31.6
3	0.1366	0.2767	0.4242	0.5844	0.7649	0.9785	1.2498	1.6377	2.3534	3.1824	4.5407	5.8408	7.4532	12.924
4	0.1338	0.2707	0.4142	0.5686	0.7407	0.941	1.1896	1.5332	2.1318	2.7765	3.7469	4.6041	5.5975	8.6101
5	0.1322	0.2672	0.4082	0.5594	0.7267	0.9195	1.1558	1.4759	2.015	2.5706	3.3649	4.0321	4.7733	6.8685
6	0.1311	0.2648	0.4043	0.5534	0.7176	0.9057	1.1342	1.4398	1.9432	2.4469	3.1427	3.7074	4.3168	5.9587
7	0.1303	0.2632	0.4015	0.5491	0.7111	0.896	1.1192	1.4149	1.8946	2.3646	2.9979	3.4895	4.0294	5.4081
8	0.1297	0.2619	0.3995	0.5459	0.7064	0.8889	1.1081	1.3968	1.8595	2.306	2.8965	3.3554	3.8325	5.0414
9	0.1293	0.261	0.3979	0.5435	0.7027	0.8834	1.0997	1.385	1.8331	2.2622	2.8214	3.2498	3.6896	4.7809
10	0.1289	0.2602	0.3966	0.5415	0.6998	0.8791	1.0931	1.3722	1.8125	2.2281	2.7638	3.1693	3.5814	4.5868
11	0.1286	0.2596	0.3956	0.5399	0.6974	0.8755	1.0877	1.3634	1.7959	2.201	2.7181	3.1058	3.4966	4.4369
12	0.1283	0.259	0.3947	0.5386	0.6955	0.8726	1.0832	1.3562	1.7823	2.1788	2.681	3.0545	3.4294	4.3178
13	0.1281	0.2586	0.394	0.5375	0.6938	0.8702	1.0795	1.3502	1.7709	2.1604	2.6503	3.0123	3.3725	4.2309
14	0.128	0.2582	0.3933	0.5366	0.6924	0.8681	1.0753	1.345	1.7613	2.1448	2.6245	2.9768	3.3257	4.1403

Table : Loi de Fisher-Snedecor

Valeur F de la variable de Fisher-Snedecor $F(v_1, v_2)$ ayant la probabilité 0.05 d'être dépassée



v_1 : degrés de liberté du numérateur
 v_2 : degrés de liberté du dénominateur

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	22	24	26	28	30	35	40	45	50	60	80	100	200	500	1000	
1	161.43	199.50	215.71	224.28	230.16	233.99	236.77	238.88	240.34	241.88	242.98	243.90	244.69	245.36	245.93	246.47	246.92	247.32	247.69	248.02	248.28	249.03	249.43	249.80	250.10	250.69	251.14	251.49	251.77	252.00	252.20	252.37	253.04	253.68	254.06	254.19
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.40	19.41	19.42	19.42	19.43	19.43	19.44	19.44	19.44	19.45	19.45	19.45	19.46	19.46	19.46	19.47	19.47	19.47	19.48	19.48	19.48	19.49	19.49	19.49	19.49	
3	10.13	9.5	9.2	9.1	9.0	8.9	8.8	8.8	8.8	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5
4	7.7	6.9	6.5	6.3	6.2	6.1	6.0	6.0	6.0	5.9	5.9	5.9	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6
5	6.6	5.7	5.4	5.1	5.0	4.9	4.8	4.8	4.7	4.7	4.7	4.6	4.6	4.6	4.6	4.6	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4	4.3	4.3	4.3
6	5.9	5.1	4.7	4.5	4.3	4.2	4.2	4.1	4.1	4.0	4.0	4.0	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.7	3.7	3.7	3.7	3.7	3.7	3.7	3.7	3.6	3.6	3.6
9	4.9	4.4	4.6	3.9	3.9	3.8	3.7	3.7	3.6	3.6	3.6	3.5	3.5	3.5	3.5	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2
7	5.5	4.7	4.3	4.1	3.9	3.8	3.7	3.7	3.6	3.6	3.6	3.5	3.5	3.5	3.5	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2

Résumé

Dans le but d'optimiser la croissance et la production d'halocines par une souche d'*Haloarchaea* SWO25, un plan factoriel complet à deux niveaux et à trois facteurs a été adopté. L'étude statistique a permis de valider le modèle de la croissance et de déterminer les interactions qui existent entre les trois facteurs, Tandis que dans le cas de l'activité de l'halocine, aucun des trois facteurs n'influençait significativement la production d'halocines.

Une croissance optimale est atteinte à 20% de NaCl, 7,5% de MgSO₄ et à une température de 45°C. Ces conditions de culture ont permis à la souche SWO25 de passer d'un temps de génération de 5,54 h ($\mu = 0.125 \text{ h}^{-1}$) à 2,91 h ($\mu = 0.238 \text{ h}^{-1}$), le taux de croissance a été ainsi multiplier par un facteur de 1,9. Considérant ces résultats, cette méthode est efficace pour l'optimisation de la croissance de la souche.

Mots-clés : *Archaea* halophiles, *Haloarcula*, optimisation, plan factoriel, croissance, halocline.

Abstract

Optimization of medium components and culture conditions for growth and production of halocin by a halophilic *Archaea* SWO25 was carried out using two levels factorial design with three factors. The statistical analysis showed that the three variables and their interactions had a significant effect on the growth of the microorganism whereas none of these variables had a significant impact on the production of halocins.

The optimal growth conditions were found to be at 20% NaCl, 7.5% MgSO₄ and incubation temperature at 45°C. These conditions allowed the SWO25 strain to exhibit a generation time of 2.91 h rather than 5.54 h obtained with non optimized medium. The optimized medium resulted in a 1.9 fold-increase of the specific growth rate. Considering the results, the factorial design provided a useful tool for the optimization of the strain's growth.

Keywords : Halophilic *Archaea*, *Haloarcula*, optimization, factorial design, growth, halocin.