

**Université Abderrahmane MIRA de Bejaïa**  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Microbiologie**

# **MEMOIRE DE FIN DE CYCLE**

*En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master 2 en*  
*Biotechnologie Microbienne*

## **THÈME**

**Optimisation du milieu de culture pour la croissance et la  
production d'halocine par une *HALOARCHAEA* locale**

**Présenté par : Melle : AZAMOUM Meriem**

**Encadré par : Mme IDRES. N, MCA, Université de Bejaia.**

**Examinatrice 1 : Mme OUKIL. N, MCA, Université de Bejaia.**

**Examinatrice 2 : Mme ARKOUB. W, MCA, Université de Bejaia.**

**Présidente : Mme BOUROUINA. S, Professeur, Université de Bejaia.**

**Promotion 2013-2014**

## **Remerciements**

En prime, j'adresse mes remerciements les plus s'insère a dieu pour m'avoir guidé et illuminer, et ainsi me montrer la voie qui mène vers d'avantage de succès.

Je remercie en suite toutes les personnes ayant contribués à la réalisation de ce travail, notamment ;

- Ma promotrice Mme IDRES. N, car elle m'a précieusement orientée, et m'a transmise des valeurs sûres.

- Mme BOUROUINA. S la présidente, Mme OUKIL. N, Mme ARKOUB. W, les examinatrices de l'université de Bejaia, que je remercie infiniment d'avoir accepté d'évaluer ce travail et le rendre meilleur grâce à leurs connaissances et critiques constructives.

**M<sup>elle</sup> M. AZAMOUM**

# *Dédicace*

A la mémoire de ma mère

**A mon père,**

**A mon frère et à mes sœurs**

**Je dédie ce travail**

# *Sommaire*

# Sommaire

Remerciements

Dédicace

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Problématique ..... 1

## Chapitre I synthèse bibliographique

1. *Haloarchaea* ..... 2

2. Adaptation aux environnements hypersalins ..... 2

3. Métabolisme des *Haloarchaea* ..... 3

4. Les halocines ..... 4

5. Les plans d'expériences ..... 5

5.1 Terminologie ..... 6

5.2 Méthodologie des plans d'expériences ..... 6

5.3 Différent types de plans d'expériences ..... 6

A. Le plan factoriel complet ..... 7

B. Plans factoriels fractionnaires à deux niveaux  $2^{K-q}$  ..... 7

C. Plans composites ..... 7

6. Logiciels de plans d'expériences ..... 7

## Chapitre II Matériel et Méthodes

1. Le matériel ..... 9

1.1. Matériel biologique ..... 9

1.2. Milieux de culture ..... 9

A. Milieu Brown ..... 9

B. Milieu Brown optimisé ..... 9

C. Milieu Brown minimum ..... 10

1.3 Appareillages ..... 10

2. Méthodologie ..... 10

2.1. Réactivation des souches ..... 10

2.2. Culture en milieu liquides ..... 10

A. Pré-culture ..... 10

<b>B. Culture</b> .....	<b>10</b>
<b>2.3. Estimation de la croissance.</b> .....	<b>10</b>
<b>2.4. Mise en évidence de l'activité inhibitrice.</b> .....	<b>10</b>
<b>2.4.1 Préparation du germe cible</b> .....	<b>11</b>
<b>2.4.2. Ensemencement en double couche du germe cible.</b> .....	<b>11</b>
<b>2.4.3. Dépôt des échantillons</b> .....	<b>11</b>
<b>2.5. Etude de la croissance et la production d'halocine par quelques souches d'<i>Haloarchaea</i>.</b> .. .....	<b>11</b>
<b>2.6. Croissance et production d'halocine par la souche S1 sur milieux Br et Br optimisé.</b> .....	<b>11</b>
<b>2.7. Dégradation des sucres par la souche S1.</b> .....	<b>11</b>
<b>2.8. Optimisation du milieu de culture pour la croissance et la production d'halocine par un plan factoriel fractionnaire.</b> .....	<b>12</b>
<b>2.8.1. Principe</b> .....	<b>12</b>
<b>2.8.2. Choix des facteurs.</b> .....	<b>12</b>
<b>2.8.3. Choix des réponses</b> .....	<b>13</b>
<b>Chapitre III Résultats et Discussion</b>	
<b>1. Etude de la croissance et la production d'halocine par quelques souches d'<i>Haloarchaea</i>.</b> .....	<b>15</b>
<b>2. Croissance de la souche S1 sur milieu Br optimisé et à 45°C.</b> .....	<b>16</b>
<b>3. Utilisation des sucres par la souche S1.</b> .....	<b>17</b>
<b>4. Optimisation du milieu de culture pour la croissance et la production d'halocine par un plan factoriel fractionnaire</b> .....	<b>18</b>
<b>4.1. Signification des facteurs</b> .....	<b>18</b>
<b>A. Pour la croissance.</b> .....	<b>18</b>
<b>B. Pour l'activité</b> .....	<b>20</b>
<b>4.2. Etude des effets individuels des facteurs.</b> .....	<b>23</b>
<b>4.3. Etude des effets d'interaction des facteurs.</b> .....	<b>24</b>
<b>4.4. Exploitation et Optimisation des modèles.</b> .....	<b>26</b>
<b>Conclusion</b> .....	<b>29</b>
<b>Références bibliographique</b> .....	<b>30</b>
<b>Les annexes</b>	

## Liste des tableaux

Tableau I: Caractéristiques de quelques halocines (shand. 2006) .....	5
Tableau II : Les souches d'Archaea utilisées .....	9
Tableau III : Facteurs et domaine expérimental .....	13
Tableau IV : Matrice des expériences en unités réelles .....	14
Tableau V : Croissance et pigmentation de la souche S1 sur différents sucres .....	17
Tableau VI : Valeurs estimées des effets et des coefficients sur la réponse DO (unités codées) .....	18
Tableau VII : ANOVA pour la réponse DO .....	20
Tableau VIII : Valeurs estimées des effets et des coefficients sur la réponse activité (unités codées) .....	21
Tableau IX : ANOVA pour la réponse Activité antibiotique .....	22
Tableau X : Valeurs optimales des paramètres .....	28

## Liste des figures

Figure 1: Arbre phylogénique universel selon la comparaison des séquences d'ARNr (Prescott et al, 2003). . . . .	2
Figure 2 : Croissance (a) et activité (b) des souches S1, S3 et S7 sur milieu Brown . . . . .	15
Figure 3 : Croissance (a) et activité (b) des souches S2 et S4 sur milieu Brown . . . . .	15
Figure 4 : Croissance et activité de la souche S6 sur milieu Brown . . . . .	16
Figure 5 : Croissance de la souche S1 sur Br Optimisé, à 45°C et sur Br (Témoin) à 40°C . . . . .	16
Figure 6 : Croissance et production d'halocine dans le milieu Br optimisé et à 45°C . . . . .	17
Figure7 : Diagramme de Pareto des effets normalisés . . . . .	19
Figure 8 : Diagramme de pareto des effets normalisé . . . . .	21
Figure 9 : Diagramme des valeurs résiduelles pour la croissance (a) et pour l'activité (b). . . . .	23
Figure 10 : Effets individuels des facteurs sur la croissance . . . . .	23
Figure11 : Effets individuels des facteurs sur l'activité . . . . .	24
Figure12 : Effets d'interaction des facteurs sur la croissance . . . . .	25
Figure13 : Effets d'interaction des facteurs sur l'activité . . . . .	25
Figure 14 : Graphiques des iso-réponses de la croissance en fonction des niveaux des facteurs . . . . .	26
Figure15 : Graphiques des iso-réponses de la croissance en fonction des niveaux des facteurs . . . . .	27
Figure 16 : Graphiques des iso-réponses de l'activité en fonction des niveaux des facteurs . . . . .	27
Figure 17 : Graphiques des iso-réponses de l'activité en fonction des niveaux des facteurs . . . . .	28



## Liste des abréviations

ANOVA .....	Analyse de la variance.
Br.....	Brown.
DSM .....	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen.
nm .....	anomètre.
DO.....	Densité optique.
rpm.....	Rotation par minute.
v/v .....	Volume par volume.
ml .....	Millilitre.
h.....	Heure.
°C .....	Degré Celsius.
min .....	Minute.
µl .....	Microlitre
cm.....	Centimètre.
MM .....	Masse molaire.
pH.....	Potentiel d'hydrogène.
UV .....	Ultra viole.

## Problématique

Actuellement les antibiotiques représentent un des groupes de médicaments les plus employés en médecine, leur utilisation clinique au milieu du 20<sup>ème</sup> siècle a radicalement modifié le pronostic des maladies infectieuses d'origine bactérienne. Cependant, la recherche de nouvelles molécules s'avère nécessaire car, dès le début de l'ère de l'antibiothérapie, ces substances ont montré un certain nombre de limites suite à leur utilisation anarchique et abusive. En effet, de nombreuses bactéries sont actuellement devenues résistantes aux antibiotiques à large spectre de l'arsenal pharmaceutique.

Une des alternatives proposées pour réduire à long terme l'utilisation des antibiotiques fait appel à la capacité de certains microorganismes à produire des substances antibactériennes appelées bactériocines. De plus, l'utilisation de microorganismes capables de résister à des conditions extrêmes est une source potentielle de nouveaux composés bioactifs(Hal, 2003).

Les microorganismes extrêmophiles représentent une nouvelle frontière pour la biotechnologie, pour les applications biologiques déjà acquises et celles susceptibles de reposer sur des biomolécules aux propriétés nouvelles pouvant déboucher sur le développement de nouveaux produits en raison des pratiques en vigueur dans le laboratoire de recherche.

Les *archaea* halophiles appartiennent à l'ordre des *Halobactériales* et la famille des *Halobacteriaceae* sont des microorganismes qui peuplent des environnements hostiles limitant la croissance de la plupart d'autres organismes. Ils représentent une fraction importante du monde procaryote dont leurs propriétés les rendent une source précieuse pour le développement de nouveaux procédés biotechnologique d'application industrielle...etc (Litchfield . 2011).

La production d'halocines est une caractéristique universelle des *Archaea* halophiles, Cependant à l'heure actuelle très peu d'halocines sont caractérisées. L'optimisation de la croissance des souches productrices et la production d'halocines est donc une étape cruciale pour leurs mises en évidence. Notre travail s'inscrit dans cette optique, un plan factoriel fractionnaire a donc été appliqué dans le but d'optimiser le milieu de culture d'une souche d'*Archaea* halophile (S1) pour une croissance et une production d'halocines maximales.

Ainsi un plan fractionnaire type  $2^{K-P}$  a été utilisé, ou les six composants du milieu Brown ont été étudiés selon une combinaison de 35 expériences.

*Synthèse*  
*Bibliographique*

## 1. *Haloarchaea*

*Haloarchaea* ou archaea halophiles extrêmes sont des membres de la famille *Halobacteriaceae*, la seule famille de l'ordre *Halobacteriales* qui comprend 36 genres et 129 espèces (Oren, 2012). Ils constituent un groupe majeur des Archées, ces derniers représentent le troisième domaine du vivant (figure 1). Ils occupent des environnements hypersalins tels que les lacs salés les marais salants. Ils se développent à partir de 1.5 M de NaCl environ et atteignent l'optimum de croissance à des concentrations de [2 à 4,5] M de NaCl. Ce sont des procaryotes chimio hétérotrophe aérobies à métabolisme respiratoire et exigent des éléments nutritifs complexes pour leur développement (Oren, 2006 ; karekar, 2004).

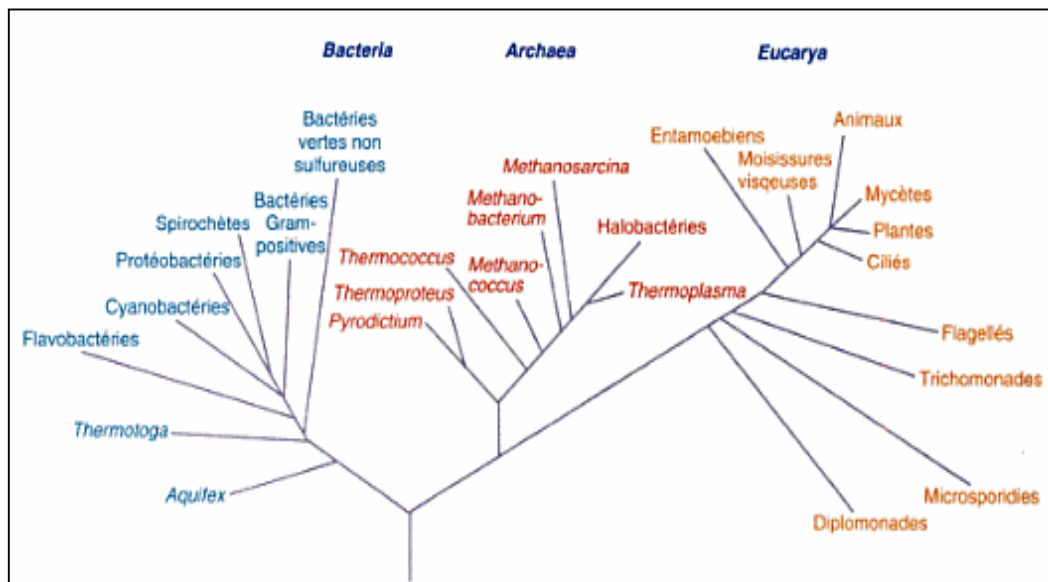


Figure 1: Arbre phylogénétique universel selon la comparaison des séquences d'ARNr (Prescott et al, 2003).

Les haloarchaea ont souvent une pigmentation rouge ou orange due aux caroténoïdes qu'elles utilisent probablement pour la protection contre la lumière. Ils sont largement étudiés pour leur biodiversité, leurs fonctions cellulaires et leurs activités métaboliques. Cependant, le potentiel industriel des enzymes halophiles demeure en grande partie encore inconnu.

## 2. *Adaptation aux environnements hypersalins*

La diversité existe aussi dans leur mode d'adaptation à des environnements hypersalins, les halophiles ont mis au point deux types de stratégies d'adaptation pour faire face à la pression osmotique induite par la forte concentration en NaCl (Oren 2002, Oren 2013).

Comme leurs membranes sont perméables, les ions de sodium sont exclus du cytoplasme. Tous les micro-organismes halophiles ont des mécanismes de transports efficaces basés sur les antiports  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  pour expulser les ions de sodium de l'intérieur de la cellule (Oren 2002, Oren 2013 ; Karekar 2004).

La première stratégie consiste en l'accumulation de KCl qui est nécessaire pour le maintien de la conformation des protéines et une bonne activité, sachant que ces protéines se dénaturent à faibles concentrations en sel (Oren 2008, Oren 2013).

La deuxième stratégie de l'adaptation osmotique est d'exclure des sels du cytoplasme autant que possible, et d'accumuler des solutés organiques compatibles tels que la glycine betaine, l'ectoïne, les dérivés d'acides aminés, les sucres (Oren 2008, Oren 2013).

### ***3. Métabolisme des Haloarchaea***

Etant donnée la variété de leur mode de vie, il n'est pas surprenant que les Haloarchaea présentent un métabolisme différent des autres groupes.

Les espèces d'Haloarchaease développent généralement dans des milieux riches contenant les acides aminés et l'extrait de levure et ont des capacités limitées à utiliser les sucres. Cependant, certaines espèces appartenant aux genres *Haloferax* et *Haloarcula*, peuvent se développer dans des milieux définis en utilisant une gamme de composés simples (sucres, acides organiques), comme seule et simple source de carbone et d'énergie. Ainsi, les différentes espèces (*Haloferax mediterranei*, *Haloarcula marismortui* et *Halococcus sacharolyticus*) sont capables de cataboliser des hexoses (glucose, fructose) des pentoses (arabinose et xylose), le saccharose et le lactose. Tandis que, d'autres Haloarchaea comme *Halobacterium salinarum* ne sont pas capables de dégrader les sucres, ces espèces sont plutôt orientées vers l'utilisation des acides aminés et le glycérol qui est considéré comme le composant typique des environnements hypersalins. Les *Haloferax volcanii* sont capables de croître dans des milieux contenant du glycérol et des acides organiques. Les haloarchaea se distinguent non seulement par leurs voies métaboliques mais aussi par leurs besoins nutritionnels. (Falb et al, 2008 ; DasSarma, 2012 ; Oren, 2013 ; Bonete et al, 2007).

#### 4. Les halocines

Les halophiles extrêmes du domaine *Archaea* produisent des substances protéiques excrétées dans l'environnement, appelées halocines. Elles ont été isolées pour la première fois par Francisco Rodriguez Valera et coll. en 1982. Elles sont généralement produites en phase stationnaire (Shand et Leyva 2007 ; Li et al, 2003 ; karekar 2004).

L'Halocine H4 est la première halocine à être caractérisée et est produite par *Haloferax mediterranei* R4 (ATTCC 33500) (Tableau 1). C'est une protéine d'environ de 28 KDa et agit au niveau de la membrane cellulaire. L' Halocine H6 est la deuxième halocine à être caractérisée, elle est produite par *Haloferax gibbonsii* (ATTCC 33989).

La H6 partage de diverses caractéristiques avec l' halocine H4, mais celle-ci semble plus robuste et peu sensible au dessalement, à la trypsine et au chauffage à 90°C. Le mode d'action semble être l'inhibition directe de l'antiport de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>. La cible spécifique du halocine H4 est toujours inconnue mais l'effet possible sur la perméabilité passive à H<sup>+</sup> sur la membrane a été suggéré (Kis-Papo et Oren 2000)

Actuellement, le mécanisme d'action est connu seulement pour le halocine H6/H7, qui inhibe l'antiport de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> des cellules d'*Haloarchaea* et de mammifères.

Les applications biotechnologiques potentielles d'autres halocines s'articuleront sur la découverte de leurs mécanismes d'action. (Shand et Leyva. 2007, O'Connor et Shand. 2002).

Tableau I: Caractéristiques de quelques halocines (shand 2006)

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

### 5. Les plans d'expériences

Le scientifique est souvent amené à comprendre comment réagit un système en fonction des facteurs susceptibles de le modifier. Pour visualiser cette évolution, il mesure une réponse et va ensuite essayer d'établir des relations de cause à effet entre les réponses et les facteurs (TRIBOULET, 2008)

Les plans d'expériences (design of experiments) sont un ensemble de techniques et de méthode ayant pour objectif l'obtention du maximum d'information au moindre coût. Les plans d'expérience sont de plus en plus utilisés dans l'industrie et dans les laboratoires de recherche.

Ils permettent en effet de modéliser au mieux un phénomène aléatoire, le plus souvent complexe, à l'aide d'un minimum d'essais. Ils s'inscrivent donc dans la démarche constante d'amélioration de la qualité ou de la productivité.

### 5.1. Terminologie

- ❖ **Un facteur** : est une grandeur le plus souvent mesurable mais il peut s'agir d'une grandeur qualitative. Les facteurs sont l'ensemble des variables d'entrées capables d'influer sur la réponse.
- ❖ **Une réponse** : c'est la grandeur mesurée à chaque essai, les plans visent à déterminer quels facteurs influents ou quelle est l'évolution de la réponse en fonction de ceux-ci.
- ❖ **L'interaction entre deux facteurs** : on parle de l'interaction entre deux facteurs A et B, quand l'effet du facteur A sur la réponse va dépendre de la valeur B.
- ❖ **Le surface de réponse** : à chaque point du domaine d'étude correspond une réponse, A l'ensemble de tous les points correspond un ensemble de réponses qui définissent une surface appelée la surface de réponse.

Par conséquent l'ensemble de tous les points expérimentaux constitue le plan d'expérience

- ❖ **La matrice d'expérience** : définit les essais à réaliser, le terme essai est l'équivalent de point expérimentale lorsque on emploie la représentation en tableau des plans d'expériences. la matrice d'expérience comprend une première colonne qui identifie les essais. Les colonnes suivantes indiquent les coordonnées des points représentatifs des expériences.

### 5.2. Méthodologie des plans d'expériences

Les principales étapes de la méthode des plans d'expériences peuvent être résumées en :

- ✓ La préparation de l'étude ;
- ✓ Le choix du plan d'expérience ;
- ✓ L'expérimentation ;
- ✓ L'interprétation des résultats ;
- ✓ Enfin, l'arrêt ou la poursuite de l'étude en fonction de l'objectif tracé par l'étude.

### 5.3. Différent types de plans d'expériences

Les plans d'expériences peuvent être classés en trois catégories

- Plans de criblage : permettent de découvrir les facteurs les plus influents, on distingue **les plans fractionnaires** et **les plans factoriel** complet a deux niveaux.



- Plans de modélisation : ils servent à donner une relation précise entre des facteurs retenus et celle de la réponse. **les plans composites** s'avèrent très pratiques pour maîtriser le nombre d'essais et une modélisation du second degré.
- Les plans de mélanges : ce sont des plans adaptés aux facteurs dépendants. Ils sont surtout utilisés pour étudier l'influence des proportions des constituants d'un produit sur une réponse donnée (faucher, 2006)

### A. Le plan factoriel complet

Il s'agit de réaliser toutes les combinaisons possibles des niveaux des facteurs. Il est à noter que pour  $k$  facteurs à 2 niveaux, ceci nécessite  $2^k$  essais. Le calcul de l'effet global du facteur A est alors simple, c'est la moyenne des réponses obtenues avec A au niveau +1 moins la moyenne des réponses obtenues avec A au niveau -1. L'intérêt est que l'on a une estimation précise des effets et une détermination directe de la meilleure combinaison.

### B. Plans factoriels fractionnaires à deux niveaux $2^{K-q}$

Les plans factoriels fractionnaires sont des plans factoriels qui permettent d'étudier tous les facteurs, mais dont le nombre d'essais est réduit par rapport aux plans factoriels complets. Un plan factoriel fractionnaire a 2 fois moins ou 4 fois moins ou  $2^q$  fois moins d'essais que le factoriel complet correspondant (GOUPY, 2000).

### C. Plans composites

Un plan composite est constitué de trois parties :

- un **plan factoriel** dont les facteurs prennent deux niveaux ;
- au moins, un **point** expérimental situé **au centre** du domaine d'étude ;
- des **points axiaux** ; ces points expérimentaux sont situés sur les axes de chacun des facteurs.

### 6. Logiciels de plans d'expériences

La construction des plans d'expériences est souvent facile et il suffit de choisir parmi les matrices déjà publiées. Les logiciels de plans d'expériences possèdent des bibliothèques de plans classiques et ils permettent aussi de construire les plans particuliers. On peut réaliser le calcul des coefficients avec un tableur, mais cela nécessite de la programmation et du temps.

Il est donc préférable d'utiliser un logiciel adapté qui effectue non seulement le calcul des coefficients mais aussi les calculs statistiques permettant d'évaluer la qualité du modèle mathématique.

Les logiciels de plans d'expériences sont aussi programmés pour calculer des réponses dans tous les domaines d'études, 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'effectuer de multiples analyses et de regarder ces données sous tous les angles. On arrive ainsi à extraire, en peu de temps, toute l'information présente dans les résultats d'un plan d'expériences. (GOUPY, 2000).

*Matériel*

*et*

*Méthodes*

## Matériel et méthodes

### 1. Le matériel

#### 1.1. Matériel biologique

Les microorganismes utilisés pour la production des halocines sont des *archaea* halophiles isolées de la sebkha d'Ouargla et de la Saline d'Ichekaben (Tableau1) (Idres et al, 2013).

La souche de référence *Halobacterium salinarum* DSM 3754 est utilisée comme germe cible car elle présente une forte sensibilité aux halocines.

**Tableau II : Les souches d'Archaea utilisées**

Souches	Source	Année d'isolement	Conditions de culture	Genre affilié (Gène ARNr16S)
S1	Sebkha de Ouargla	1999	37°C, pH7	<i>Haloarcula</i>
S2	Sebkha de Ouargla	1999	43°C, pH7	<i>Halorubrum</i>
S3	Sebkha de Ouargla	1999	43°C, pH7	<i>Haloarcula</i>
S4	Sebkha de Ouargla	2010	40°C, pH7	<i>Halorubrum</i>
S6	Saline d'Ichekaben	2011	40°C, pH7	<i>Haloferax</i>
S7	Saline d'Ichekaben	2011	40°C, pH7	<i>Haloarcula</i>

#### 1.2. Milieux de culture

##### A. Milieu Brown

Le milieu utilisé pour la croissance des souches d'*archaea* est le milieu Brown (Br) liquide contenant en g/l : extrait de levure 5, NaCl 250, MgSo4 20, KCl 2, citrate trisodique 3. Des milieux solides et semi solides ont été préparés en ajoutant 20g et 10g d'agar respectivement.

##### B. Milieu Brown optimisé

Le milieu Br optimisé pour la croissance de la souche S1 (Boudrioua, 2013) contient la composition suivante en g/l : extrait de levure 5, NaCl 200, MgSo4 75, KCl 2, citrate trisodique 3.

### ***C. Milieu Brown minimum***

Pour l'étude de la dégradation des sucres par la souche S1, nous avons utilisé le milieu suivant (g/l) : 0,2 d'extrait de levure, 6,05 de Tris, 2,50 de NaCl, 20 de MgSO<sub>4</sub>, 2 de KCl et 3 de citrate trisodique, 0,05 de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,053 de NH<sub>4</sub>Cl.

Tous les milieux ont été ajustés à pH 7,2 avec du NaOH ou HCl à 1M puis stérilisés à 120C° pendant 20 minutes par autoclavage.

## **1.3 Appareillages en annexe I**

## **2. Méthodologie**

### **2.1. Réactivation des souches**

Les souches conservées +4C° ont été revivifiées par repiquage sur milieu liquide et incubation 40°C sous agitation. La pureté des souches a été ensuite vérifiée sur milieu solide.

### **2.2. Culture en milieu liquides**

#### ***A. Pré-culture***

A partir des boîtes de Petri contenant les souches pures, une colonie a été transférée dans le milieu Brown liquide puis incubée au bain-Marie agité à 120 rpm et à 40C° jusqu'à avoir une DO<sub>600</sub> de l'ordre de 0,2, dite de première génération. Une culture de deuxième génération a été préparée par transfert de 100µl de la culture précédente dans un milieu frais puis incubée dans les mêmes conditions que précédemment jusqu'à avoir une DO<sub>600</sub> de 0,2.

#### ***B. Culture***

Des Erlenmeyers de 100 ml contenant 20ml de milieu Brown ont été inoculés à 1% de la pré-culture précédente et incubés au bain-Marie agité à 120rpm et à 40C°. Des prélèvements ont été effectués à différents intervalles de temps allant de 3 à 6 heures.

### **2.3. Estimation de la croissance**

La croissance des souches a été mesurée par turbidimétrie. Les prélèvements effectués ont d'abord été dilués au 1 /10<sup>ème</sup> dans une solution saline à 20% de NaCl, 10% de Mg SO<sub>4</sub> puis leur absorbance a été mesurée à 600 nm ( $\lambda_{max}$ ) avec un spectrophotomètre UV-Visible (UV mini 1240, Shimadzu).

### **2.4. Mise en évidence de l'activité inhibitrice**

Il s'agit de mettre en évidence la capacité de la souche étudiée à produire ou non des substances antimicrobiennes telles que les halocines. La mise en évidence des activités antibiotiques a été réalisée selon la méthode décrite par (Shand, 2006).

### **2.4.1 Préparation du germe cible**

Une colonie de la souche *H. salinarum* DSM 3745 a été transférée dans 1ml de milieu Brown et incubée à 40°C avec agitation à 120rpm jusqu'à avoir une DO<sub>600</sub> de 0,2. 100µl de cette culture ont été inoculés à nouveau dans un milieu frais puis incubés dans les mêmes conditions que précédemment jusqu'à avoir une DO<sub>600</sub> de 0,2. Une dernière culture est lancée à partir de la culture précédente et incubée jusqu'à avoir une DO<sub>600</sub> de l'ordre de 0,6.

### **2.4.2 Ensemencement en double couche du germe cible**

Une couche de milieu solide a été coulée au préalable sur une boîte de Petri. Après solidification, 6 à 7ml de milieu semi- solide (1 % d'agar en surfusion) ensemencé avec le germe cible (DSM3754) ont été ajoutés en deuxième couche à la surface de la boîte.

### **2.4.3 Dépôt des échantillons**

Les échantillons prélevés ont été centrifugés à 10000 rpm pendant 10mn afin d'obtenir un surnageant exempt de cellules. 5µl de surnageant ont été déposés à la surface des boîtes contenant le germe cible. Après séchage des spots, les boîtes ont été mises dans des sacs en plastique et incubées à 40°C.

Après incubation le résultat positif se manifeste par l'apparition d'une zone claire ou d'un halo autour du spot, l'activité antimicrobienne est déterminée par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition (mm).

## **2.5. Etude de la croissance et la production d'halocine par quelques souches d'*Haloarchaea***

6 souches d'haloarchées ont été cultivées sur milieu Br afin de comparer leur croissance ainsi que la production d'halocine.

## **2.6. Croissance et production d'halocine par la souche S1 sur milieux Br et Br optimisé**

La souche S1 a été cultivée sur milieu Br et Br optimisé à 40 et 45°C respectivement. Des prélèvements ont été effectués afin de comparer la croissance et l'activité dans les deux milieux.

## **2.7. Dégradation des sucres par la souche S1**

Afin de déterminer sa capacité à dégrader les sucres, la souche S1a été cultivée sur milieu Brown minimum additionnés de 1% du sucre à tester : glucose ; sorbitol ; Rhamnose ;

glycerol ; Amidon ; Arabinose ; Dextrine ; Salicine ; Cellobiose ; Inositol ; Fructose. Ce test a été réalisé en présence d'un témoin positif (Br minimum à 1% d'extrait de levure) et d'un témoin négatif (Br minimum), la croissance est notée à l'œil nu par l'apparition de trouble.

## **2.8. Optimisation du milieu de culture pour la croissance et la production d'halocine par un plan factoriel fractionnaire**

Les plans d'expériences sont issus de méthodes mathématiques et statistiques appliquées à l'expérimentation.

### **2.8.1. Principe**

La différence capitale avec la méthode classique tient au fait que l'on fait varier les niveaux de tous les facteurs à la fois à chaque expérience, mais de manière programmée et raisonnée. La possibilité de faire varier tous les facteurs à la fois offre de nombreux avantages parmi lesquels :

- Diminution du nombre des essais
- Nombre de facteurs étudiés très grand
- Détection des interactions entre facteurs
- Détection des optimaux
- Meilleure précision sur les résultats
- Optimisation des résultats
- Modélisation des résultats

### **2.8.2. Choix des facteurs**

Dans le but d'optimiser le milieu de culture pour la croissance de la souche S1 ainsi que la production d'halocine, un plan factoriel fractionnaire à deux niveaux et à 6 facteurs soit un plan  $2^{6-1}$  a été adopté. Nous avons donc choisi de faire varier les concentrations des sels (les plus importants pour les *Haloarchaea*), de l'extrait de levure et de l'amidon.

Un essai pour chaque expérience a été réalisé avec les points aux centres en triplicata, soit un total de 35 expériences. Les variables (facteurs), supposées influencer la croissance et la production de l'halocine, ainsi que la matrice d'expériences sont présentées dans le tableau II.

**Tableau III : Facteurs et domaine expérimental**

Variables réelles	Variables centrées réduites	Niveau bas -1	Niveau moyen 0	Niveau haut +1
<b>Amidon (g/l)</b>	<b>X1</b>	1,25	2,5	3,75
<b>Extrait de levure (g/l)</b>	<b>X2</b>	7,5	10	12,5
<b>NaCl (%)</b>	<b>X3</b>	18,75	22,5	26,25
<b>MgSO4 (%)</b>	<b>X4</b>	3,25	5,5	7,75
<b>Temps (h)</b>	<b>X5</b>	25	30	35
<b>KCl (g/l)</b>	<b>X6</b>	6,5	11	15,5

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 et  $\Delta Z_j$  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 les niveaux maximal et minimal de la variable  $Z_j$  considérée (Tableau III).

### 2.8.3. Choix des réponses

La croissance exprimée par la  $DO_{600}$  est choisie comme réponse  $y_1$ , et la production de l'halocine exprimée par le diamètre de la zone d'inhibition (ZI) est la réponse  $y_2$ . L'analyse des résultats a été effectuée par le logiciel Minitab 16 (Minitab, Inc. Pennsylvania. USA).



Tableau IV : Matrice des expériences en unités réelles

StdOrder	RunOrder	CenterPt	blocks	amidon	levure	NaCl	MgSO4	temps	KCl
1	1	1	1	1,25	7,5	18,75	3,25	25	15,5
2	2	1	1	3,75	7,5	18,75	3,25	25	6,5
3	3	1	1	1,25	12,5	18,75	3,25	25	6,5
4	4	1	1	3,75	12,5	18,75	3,25	25	15,5
5	5	1	1	1,25	7,5	26,25	3,25	25	6,5
6	6	1	1	3,75	7,5	26,25	3,25	25	15,5
7	7	1	1	1,25	12,5	26,25	3,25	25	15,5
8	8	1	1	3,75	12,5	26,25	3,25	25	6,5
9	9	1	1	1,25	7,5	18,75	7,75	25	6,5
10	10	1	1	3,75	7,5	18,75	7,75	25	15,5
11	11	1	1	1,25	12,5	18,75	7,75	25	15,5
12	12	1	1	3,75	12,5	18,75	7,75	25	6,5
13	13	1	1	1,25	7,5	26,25	7,75	25	15,5
14	14	1	1	3,75	7,5	26,25	7,75	25	6,5
15	15	1	1	1,25	12,5	26,25	7,75	25	6,5
16	16	1	1	3,75	12,5	26,25	7,75	25	15,5
17	17	1	1	1,25	7,5	18,75	3,25	35	15,5
18	18	1	1	3,75	7,5	18,75	3,25	35	6,5
19	19	1	1	1,25	12,5	18,75	3,25	35	6,5
20	20	1	1	3,75	12,5	18,75	3,25	35	15,5
21	21	1	1	1,25	7,5	26,25	3,25	35	6,5
22	22	1	1	3,75	7,5	26,25	3,25	35	15,5
23	23	1	1	1,25	12,5	26,25	3,25	35	15,5
24	24	1	1	3,75	12,5	26,25	3,25	35	6,5
25	25	1	1	1,25	7,5	18,75	7,75	35	6,5
26	26	1	1	3,75	7,5	18,75	7,75	35	15,5
27	27	1	1	1,25	12,5	18,75	7,75	35	15,5
28	28	1	1	3,75	12,5	18,75	7,75	35	6,5
29	29	1	1	1,25	7,5	26,25	7,75	35	15,5
30	30	1	1	3,75	7,5	26,25	7,75	35	6,5
31	31	1	1	1,25	12,5	26,25	7,75	35	6,5
32	32	1	1	3,75	12,5	26,25	7,75	35	15,5
33	33	0	1	2,5	10	22,5	5,5	30	11
34	34	0	1	2,5	10	22,5	5,5	30	11
35	35	0	1	2,5	10	22,5	5,5	30	11

*Résultats*  
*et*  
*Discussion*

### 1. Etude de la croissance et la production d'halocine par quelques souches d'*Haloarchaea*

La croissance des 6 souches d'*Haloarchaea* sur milieu Br montre que ce dernier est favorable au développement de toutes les souches utilisées (fig 1 a, fig 2a et fig 3). La meilleure croissance est obtenue avec les souches de *Haloarcula* (fig 1a), car elles atteignent des DO max de 2, 3 et 2,1 respectivement pour les souches S1 et S7. La croissance la plus faible est obtenue avec la souche de *Haloferax* (fig. 3)

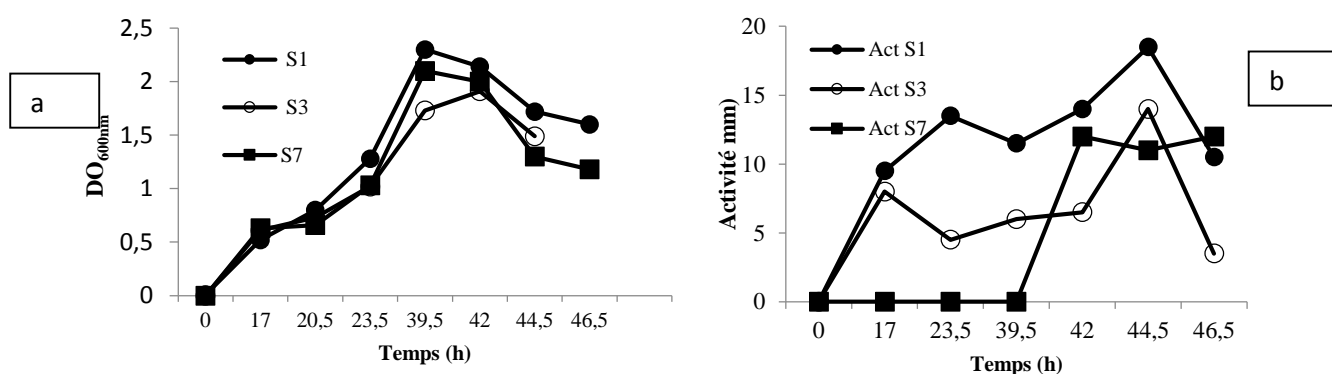


Figure 2 : Croissance (a) et activité (b) des souches S1, S3 et S7 sur milieu Brown

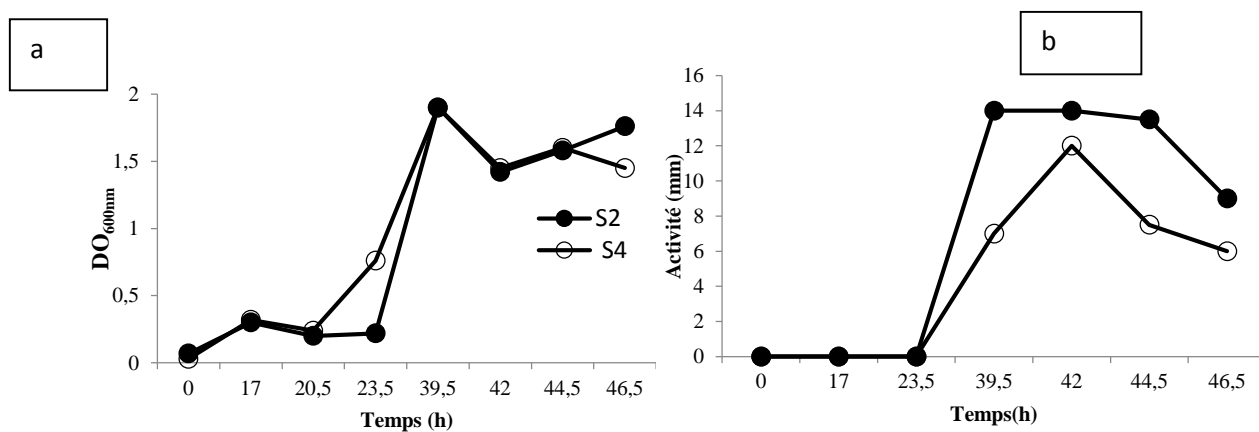


Figure 3 : Croissance (a) et activité (b) des souches S2 et S4 sur milieu Brown

L'activité antibiotique produite est décelée dans les 6 cultures, elle est précoce dans le cas des souches S1 et S3 et tardive pour les souches S2 ; S4 ; S6 et S7 (fig 1 b ; fig 2b et fig 3). La zone d'inhibition la plus élevée est obtenue dans la culture S1, c'est pourquoi nous avons sélectionné la souche S1 pour la suite des travaux.

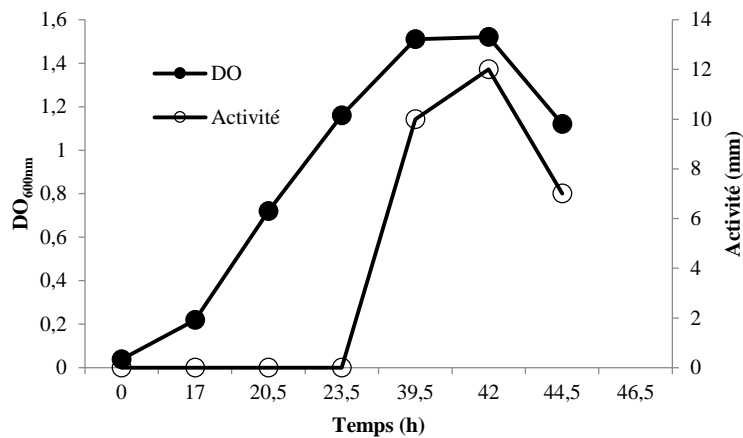


Figure 4 : Croissance et activité de la souche S6 sur milieu Brown

## 2. Croissance de la souche S1 sur milieu Br optimisé et à 45°C

Les concentrations en sels du milieu Br (NaCl et MgSO<sub>4</sub>) ainsi que la température de croissance ont été optimisées pour la croissance de la souche S1 (Boudrioua, 2013), nous avons voulu confirmer ces résultats en cultivant la souche S1 dans les conditions optimales de salinité et de température et dans le milieu témoin (Br) à 40°C. Les résultats montrent que la croissance est meilleure dans le milieu Br optimisé et à 45°C par rapport à celle du milieu témoin (Fig. 4), en effet la DO max obtenue dans les conditions optimales est de 2,8 alors que dans le milieu Br elle n'est que de 1,3.

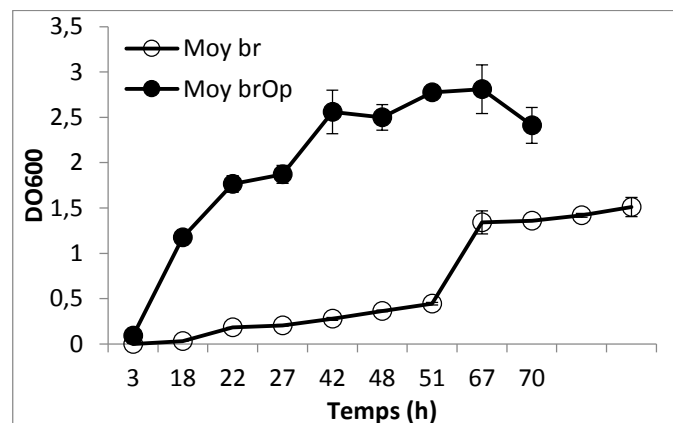


Figure 5 : Croissance de la souche S1 sur Br Optimisé, à 45°C et sur Br (Témoin) à 40°C

L'activité antibiotique n'a été détectée que dans les conditions optimales (fig. 5), ce qui confirme les résultats de Boudrioua (2013). Nous avons donc retenu la température de 45°C pour la croissance de la souche S1.

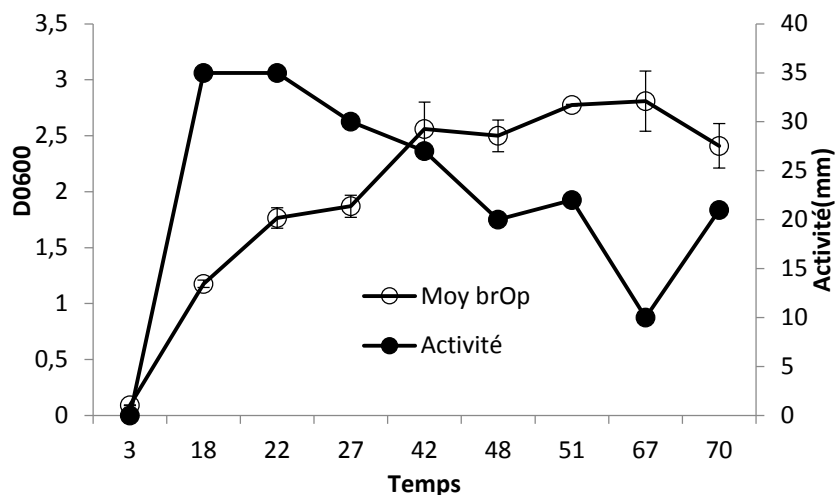


Figure 6 : Croissance et production d'halocine dans le milieu Br optimisé et à 45°C

### 3. Utilisation des sucres par la souche S1

La croissance de la souche S1 sur Br minimum avec différents sucres n'est visible que dans les milieux contenant le glucose, l'amidon, les dextrans, le glycerol ou le fructose (Tab.V). La croissance est plus importante en présence d'amidon.

Tableau V : Croissance et pigmentation de la souche S1 sur différents sucres

Les sucres	Croissance			Pigmentation
	7jours	15jours	21 jours	
Glucose	-	+	+	-
Amidon	+	++	+++	-
Sorbitol	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-
Dextrine	+	+	++	-
Salicine	-	-	-	-
Cellobiose	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-
glycérol	+	++	+++	+
Fructose	+	+	+	+

#### 4. Optimisation du milieu de culture pour la croissance et la production d'halocine par un plan factoriel fractionnaire

Les résultats du plan factoriel ont été analysés par le logiciel MINITAB sous Windows. Les principaux effets ainsi que les interactions entre les facteurs ont été déterminés.

##### 4.1. Signification des facteurs :

Sur le diagramme de pareto, sont indiqués sous forme de barres horizontales les effets des différents facteurs du modèle. Seules les effets correspondant aux barres qui dépassent la ligne verticale sont considérés comme significativement différents de zéro.

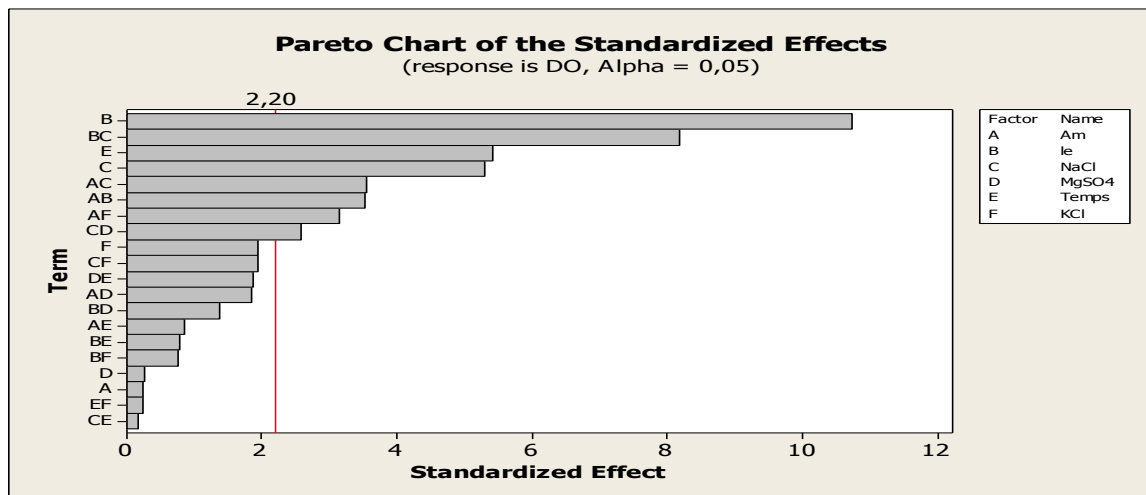
##### A. Pour la croissance

Tableau VI : Valeurs estimées des effets et des coefficients sur la réponse DO (unités codées)

Term	Effet	Coef	SE Coef	T	P
Constant		2,2542	0,05335	42,26	0,000
Am	0,0254	0,0127	0,05335	0,24	0,816
le	1,1439	0,5719	0,05335	10,72	0,000
NaCl	-0,5655	-0,2827	0,05335	-5,30	0,000
MgSO4	-0,0282	-0,0141	0,05335	-0,26	0,796
Temps	0,4282	0,2141	0,03956	5,41	0,000
KCl	0,2076	0,1038	0,05335	1,95	0,078
Am*le	-0,3746	-0,1873	0,05335	-3,51	0,005
Am*NaCl	-0,3788	-0,1894	0,05335	-3,55	0,005
Am*MgSO4	0,1965	0,0982	0,05335	1,84	0,093
Am*Temps	-0,0669	-0,0335	0,03956	-0,85	0,416
Am*KCl	-0,3344	-0,1672	0,05335	-3,13	0,010
le*NaCl	-0,8717	-0,4359	0,05335	-8,17	0,000
le*MgSO4	-0,1457	-0,0729	0,05335	-1,37	0,199
le*Temps	0,0621	0,0311	0,03956	0,78	0,449
le*KCl	-0,0806	-0,0403	0,05335	-0,76	0,466
NaCl*MgSO4	0,2749	0,1374	0,05335	2,58	0,026
NaCl*Temps	-0,0135	-0,0068	0,03956	-0,17	0,867
NaCl*KCl	0,2060	0,1030	0,05335	1,93	0,080
MgSO4*Temps	0,1473	0,0736	0,03956	1,86	0,090
Temps*KCl	0,0183	0,0092	0,03956	0,23	0,821
Ct Pt		0,9068	0,13425	6,75	0,000

Pour chaque coefficient, la comparaison de la valeur du test de Student avec la valeur tabulée (ou avec la p-value) permet de vérifier sa signification. Seuls les coefficients ayant une p-value inférieure à 0.05 (seuil de confiance) peuvent être supposés avoir une influence sur la réponse. On remarque aussi sur le tableau VII, que l'effet de la courbure possède une p-value inférieure à 0.05, ce qui signifie l'existence d'une courbure ou non linéarité au centre du domaine expérimental. Dans une approche plus précise, il convient à l'avenir de tenir compte des effets quadratiques des paramètres.

La représentation suivante de Pareto permet de classer les effets par ordre d'importance.



**Figure7 : Diagramme de Pareto des effets normalisés**

L'examen de ce diagramme montre que les coefficients les plus significatifs par ordre décroissant sont :

- 1- Effet principaux :
  - a. Extrait de levure
  - b. Temps
  - c. NaCl
- 2- Effets d'interaction :
  - a. Extrait de levure-NaCl
  - b. Amidon-NaCl
  - c. Amidon - extrait de levure
  - d. NaCl-MgSO4
  - e. Amidon - KCl

Les coefficients non significatifs sont exclus de l'équation de régression du modèle postulé, qui sous réserve de validation, s'écrit :

$$DO = 22542 + 0.5719 x_2 - 0.2827 x_3 + 0.2141 x_5 - 0.1873 x_1 x_2 - 0.1894 x_1 x_3 - 0.1672 x_1 x_6 - 0.4359 x_2 x_3 + 0.1374 x_3 x_4.$$

Tableau VII : ANOVA pour la réponse DO

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Main Effects	6	13,6685	13,7755	2,29592	50,42	0,000
2-Way Interactions	14	6,8783	7,2203	0,51574	11,33	0,000
Courbure	1	2,0774	2,0774	2,07741	45,62	0,000
Residual Error	11	0,5009	0,5009	0,04553		
Lack of Fit	9	0,4826	0,4826	0,05362	5,86	0,154
Pure Error	2	0,0183	0,0183	0,00916		
Total	32	23,1251				

$$R^2 = 97,83\% \quad R^2(\text{pred}) = 76,64\% \quad R^2(\text{adj}) = 93,70\%$$

De la valeur de la p-value correspondant au test F du lack of fit (manque d'ajustement), on peut avancer que l'équation du modèle postulé ne présente pas de biais, cad que l'erreur due au modèle est non significative devant l'erreur aléatoire (pure error). D'un autre côté, la comparaison de la variance de régression (effets principaux et d'interaction) à la variance résiduelle permet de vérifier que l'équation du modèle retenu est très significative. Le modèle de régression postulé est donc adéquat et explique 97.83 % des variations de la réponse.

## B. Pour l'activité

Sur le tableau suivant sont regroupées les valeurs des effets des différents paramètres variés au cours des essais.



Tableau VIII : Valeurs estimées des effets et des coefficients sur la réponse activité (unités codées)

Term	Effect	coef	SE	Coef	T	P
Constant		8,563	0,3069	27,90	0,000	
Am	-0,625	-0,313	0,3069	-1,02	0,329	
le	3,875	1,937	0,3069	6,31	0,000	
NaCl	-2,250	-1,125	0,3069	-3,67	0,003	
MgSO4	-1,875	-0,937	0,3069	-3,05	0,010	
Temps	1,125	0,563	0,3069	1,83	0,092	
KCl	-0,250	-0,125	0,3069	-0,41	0,691	
Am*le	0,125	0,063	0,3069	0,20	0,842	
Am*NaCl	1,000	0,500	0,3069	1,63	0,129	
Am*MgSO4	1,125	0,562	0,3069	1,83	0,092	
Am*Temps	0,125	0,062	0,3069	0,20	0,842	
Am*KCl	1,250	0,625	0,3069	2,04	0,064	
le*NaCl	4,000	2,000	0,3069	6,52	0,000	
le*MgSO4	2,125	1,063	0,3069	3,46	0,005	
le*Temps	-0,625	-0,312	0,3069	-1,02	0,329	
le*KCl	-0,750	-0,375	0,3069	-1,22	0,245	
NaCl*MgSO4	-1,750	-0,875	0,3069	-2,85	0,015	
NaCl*Temps	0,000	0,000	0,3069	0,00	1,000	
NaCl*KCl	0,125	0,063	0,3069	0,20	0,842	
MgSO4*Temps	-1,125	-0,563	0,3069	-1,83	0,092	
MgSO4*KCl	0,750	0,375	0,3069	1,22	0,245	
Temps*KCl	-0,500	-0,250	0,3069	-0,81	0,431	
courbure		1,771	1,0482	1,69	0,117	

Contrairement au modèle précédent, celui-ci ne présente aucune courbure au centre du domaine (la p-value >0.05)

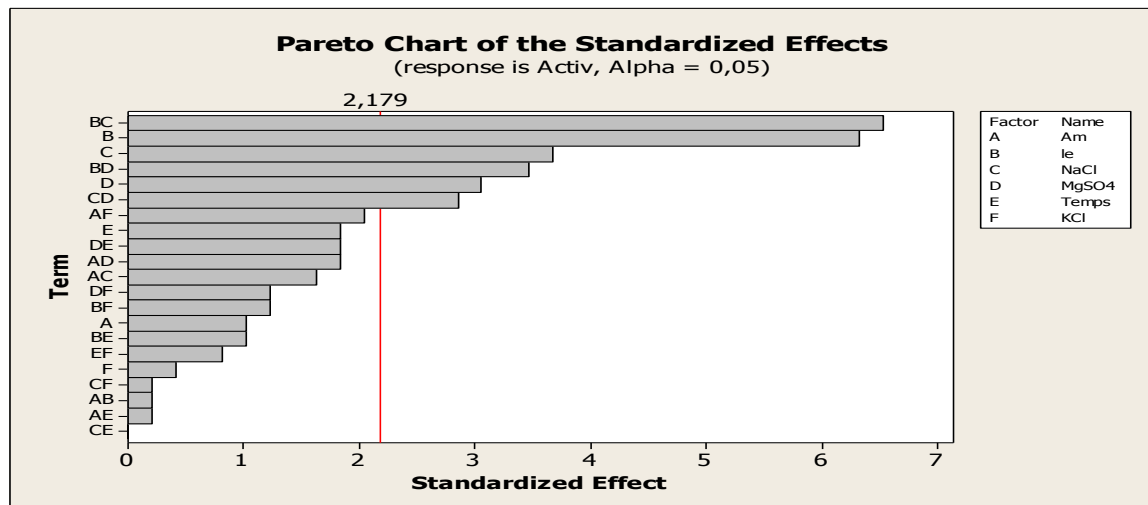


Figure 8 : Diagramme de pareto des effets normalisé

L'examen de ce diagramme montre que les coefficients les plus significatifs par ordre décroissant sont :

- 1- Effet principaux :
  - a. Extrait de levure
  - b. NaCl
  - c. MgSO<sub>4</sub>
- 2- Effets d'interaction :
  - a. Extrait de levure-NaCl
  - b. Extrait de levure-MgSO<sub>4</sub>
  - c. NaCl-MgSO<sub>4</sub>

Les coefficients non significatifs sont exclus de l'équation de régression du modèle postulé, qui sous réserve de validation, s'écrit :

$$Ac = 8.563 + 1.937x_2 - 1.125 x_3 - 0.937 x_4 + 2 x_2 x_3 + 1.063 x_2 x_4 - 0.875 x_3x_4.$$

**Tableau IX : ANOVA pour la réponse Activité antibiotique**

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Main Effects	6	202,500	202,500	33,750	11,20	0,000
2-Way Interactions	15	243,875	243,875	16,258	5,39	0,003
Curvature	1	8,601	8,601	8,601	2,85	0,117
ResidualError	12	36,167	36,167	3,014		
Lack of Fit	10	27,500	27,500	2,750	0,63	0,746
Pure Error	2	8,667	8,667	4,333		
Total	34	491,143				

$$R^2 = 92,64\% \quad R^2 = 79,14\%$$

Là aussi le modèle ne présente pas de biais (lack of fit non significative) et l'équation de régression retenue est adéquat. 92.64% des variations de l'activité sont expliquées par le modèle.

De l'observation des graphes de la figure 9 qui suivent, on peut finalement conclure que la distribution des résidus est aléatoire dans le cas de la croissance et l'activité antibiotique. Les deux modèles sont statistiquement adéquats et peuvent être utilisés pour la modélisation et l'optimisation des deux réponses.

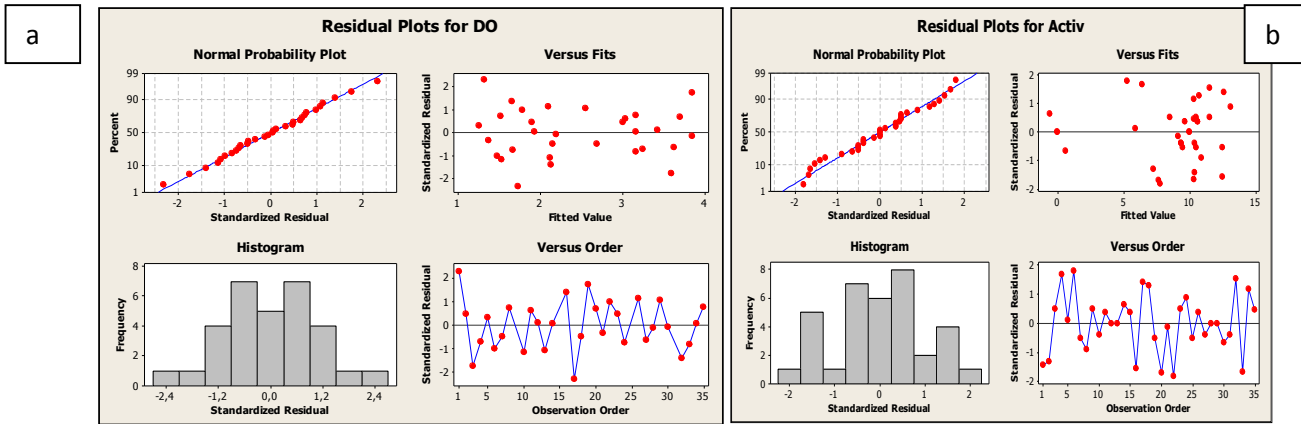


Figure 9 : Diagramme des valeurs résiduelles pour la croissance (a) et pour l'activité (b).

### 4.2. Etude des effets individuels des facteurs

#### 1- Sur la croissance

L'extrait de levure et le temps d'incubation ont une influence positive sur la croissance alors que l'augmentation de la concentration de NaCl possède un effet contraire.

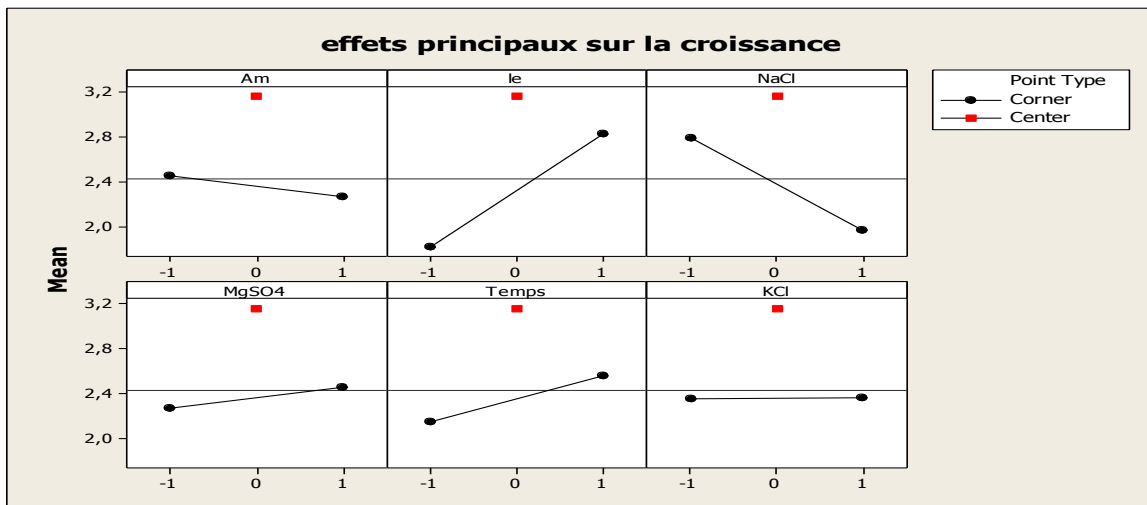
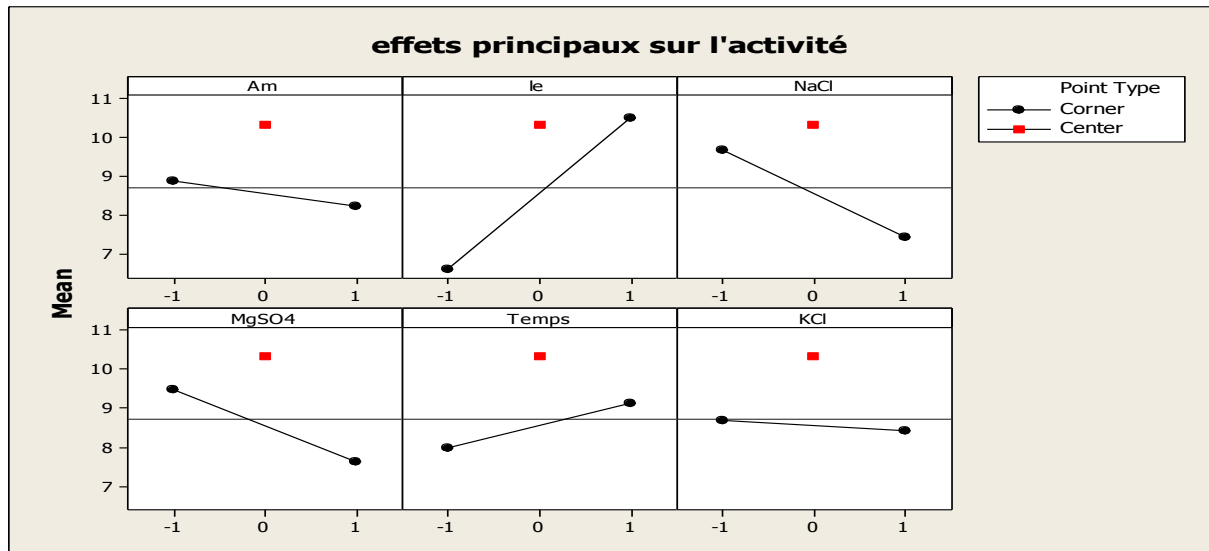


Figure 10 : Effets individuels des facteurs sur la croissance



**Figure11 : Effets individuels des facteurs sur l'activité**

## 2- Sur l'activité

Le NaCl et le MgSO<sub>4</sub> présentent des effets négatifs considérables.

L'extrait de levure présente une influence intense et positive. De façon générale, pour améliorer l'activité, il convient d'assurer un milieu contenant une grande concentration en extrait de levure et de faibles taux en NaCl et MgSO<sub>4</sub>.

### 4.3. Etude des effets d'interaction des facteurs

Sur les deux figures qui suivent, sont représentés tous les effets d'interaction double entre chacun des facteurs considérés. Les interactions les plus faibles sont visualisées par des droites parallèles alors que quand les droites se coupent, l'interaction considérée est très forte.

De l'examen de ces figures, il ressort les points importants suivants :

- 1- La plus forte interaction sur la croissance est enregistrée entre : l'amidon- l'extrait de levure suivie des interactions entre l'extrait de levure- NaCl et entre l'amidon-NaCl
- 2- Sur l'activité, une forte interaction positive semble exister : levure-NaCl et , levure - MgSO<sub>4</sub>, la variation des deux effets doit se faire dans le même sens.
- 3- Le signe négatif de l'effet de l'interaction NaCl – MgSO<sub>4</sub> peut signifier que le choix d'une solution concentrée de NaCl doit s'accompagner d'une valeur faible de celle de MgSO<sub>4</sub> pour assurer une certaine activité.

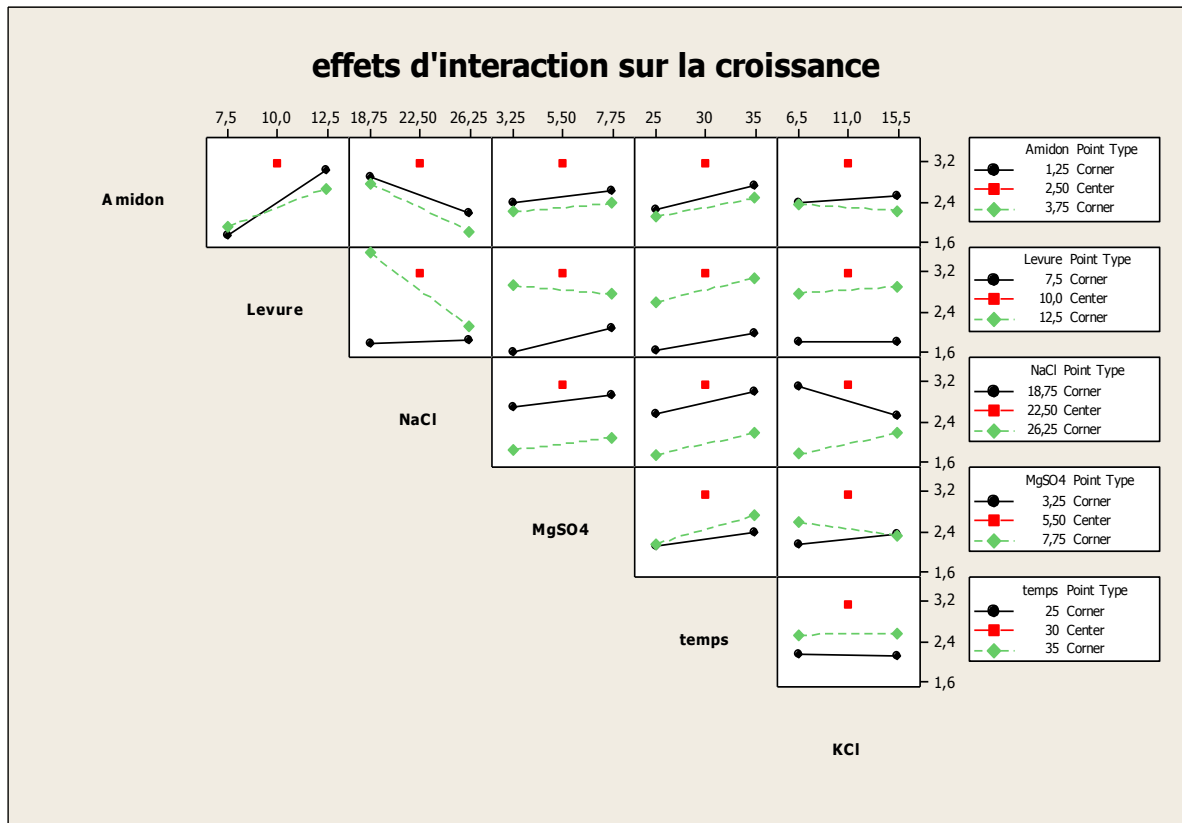


Figure12 : Effets d'interaction des facteurs sur la croissance

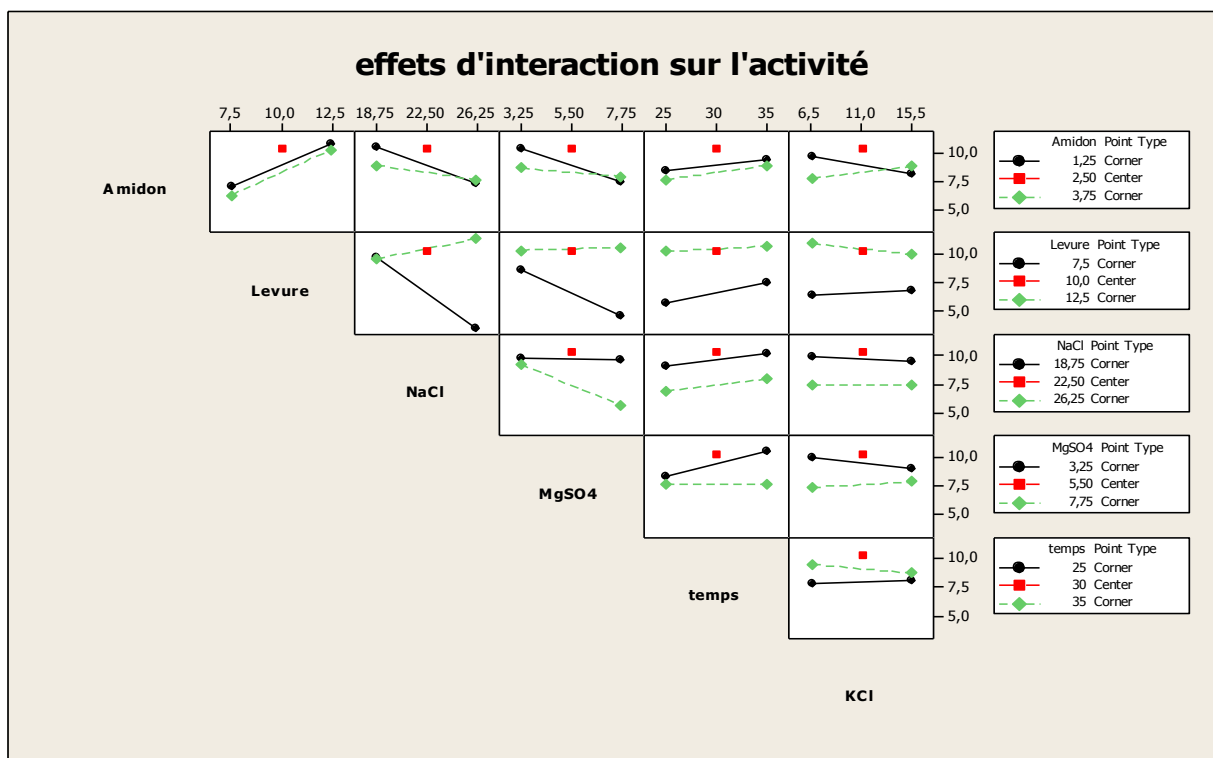


Figure13 : Effets d'interaction des facteurs sur l'activité

### 4.4.. Exploitation et Optimisation des modèles

La figure ci-dessous donne les tracés des iso-réponses de la croissance. On remarque que la croissance maximale dépend fortement des niveaux des facteurs considérés comme influents. On observe ainsi que la position des zones optimales (en vert foncé) changent en fonction des valeurs fixées des autres variables.

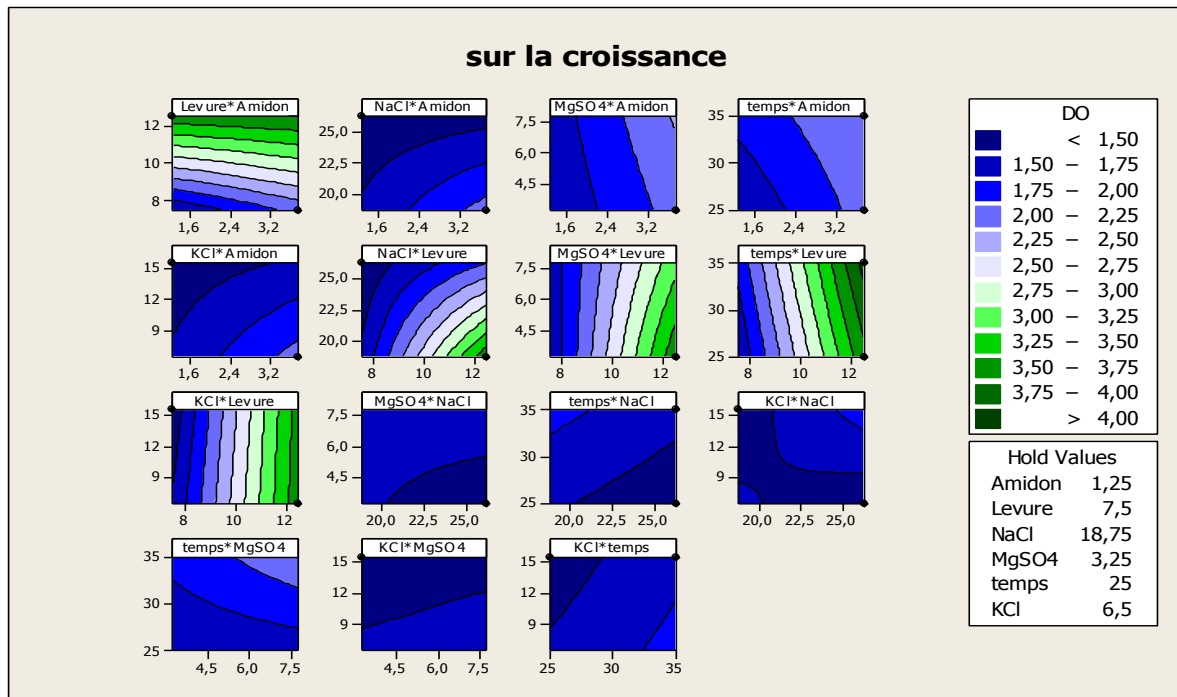


Figure 14 : Graphiques des iso-réponses de la croissance en fonction des niveaux des facteurs

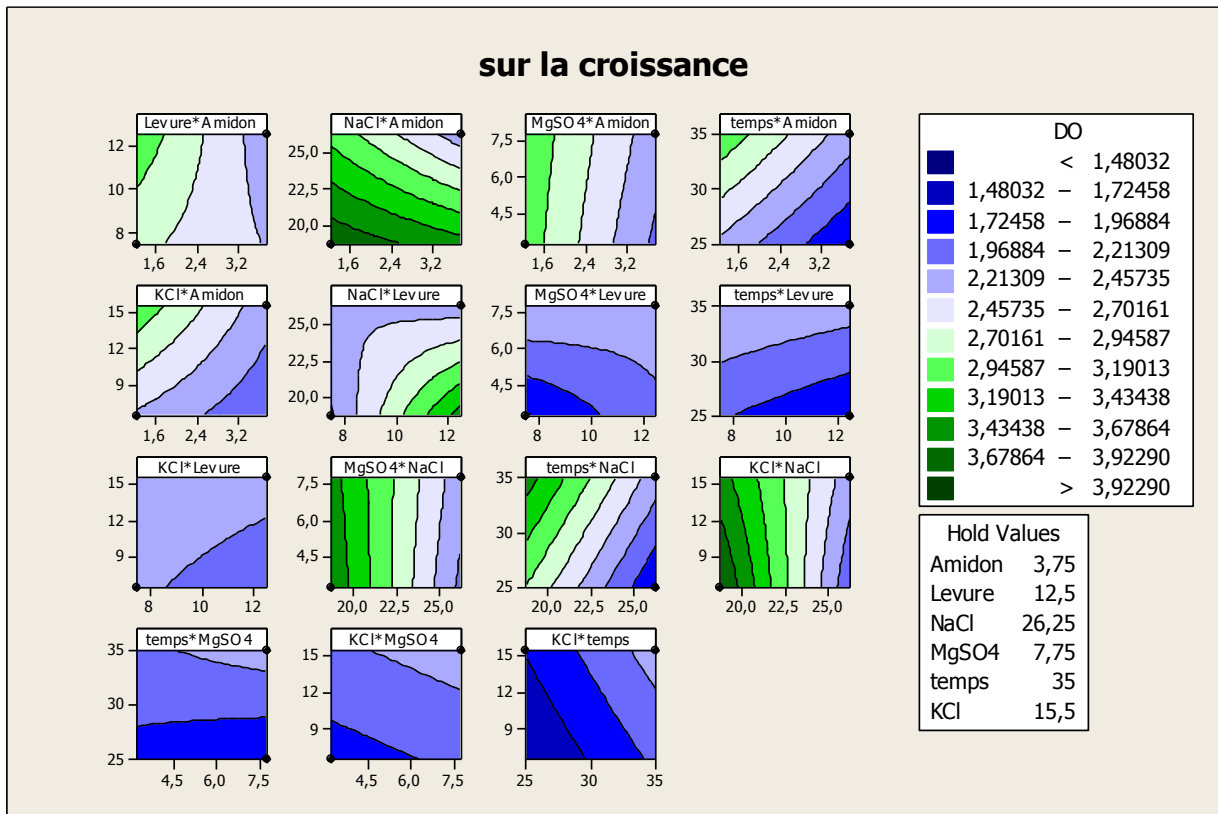


Figure15 : Graphiques des iso-réponses de la croissance en fonction des niveaux des facteurs

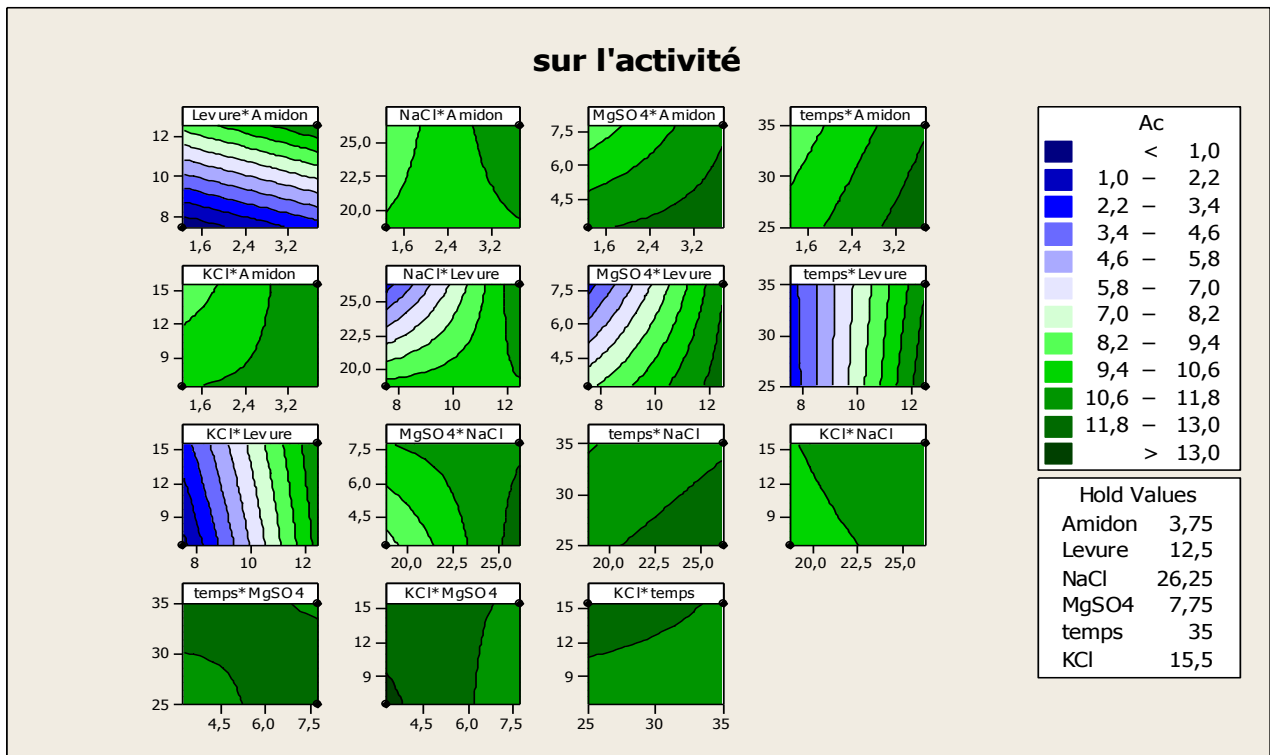
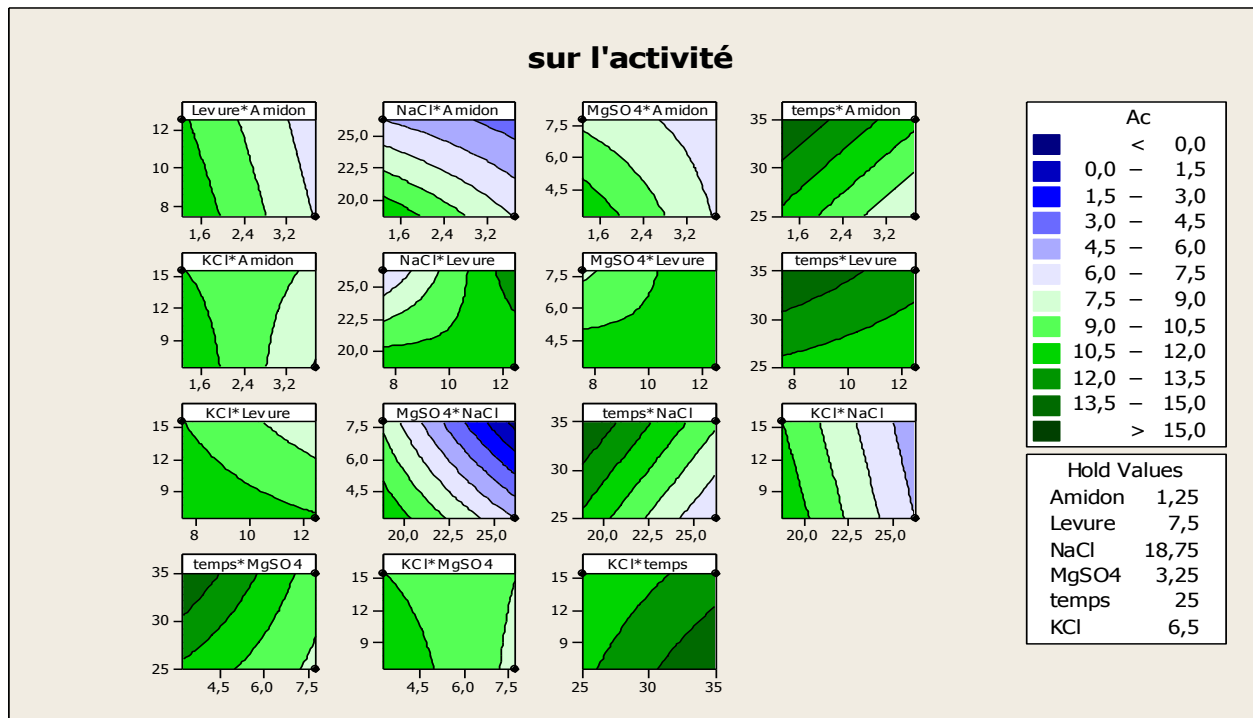


Figure 16 : Graphiques des iso-réponses de l'activité en fonction des niveaux des facteurs



**Figure 17 : Graphiques des iso-réponses de l'activité en fonction des niveaux des facteurs**

En conclusion, la recherche de l'optimum n'est pas aisée si l'on tente de l'exécuter manuellement. Grâce au logiciel Minitab, la recherche des valeurs des paramètres est possible. Il suffit de fixer les limites de variation min et max et le résultat de cette recherche a conduit aux valeurs suivantes :

**Tableau X : Valeurs optimales des paramètres**

paramètres	Valeurs opt	DO	Activité
<b>Amidon</b>	<b>1,25</b>	<b>3,4119</b>	<b>13,3109</b>
<b>Levure</b>	<b>11,0354</b>		
<b>NaCl</b>	<b>18,75</b>		
<b>MgSO4</b>	<b>3,25</b>		
<b>temps</b>	<b>35</b>		
<b>KCl</b>	<b>6,5</b>		



# *Conclusion*

### Conclusion

L'objectif de ce travail était d'optimiser le milieu de culture pour la croissance et la production d'halocine par la souche de *Haloarchaea* SI.

La planification des expériences selon un plan fractionnaire nous a permis de mettre en évidence les facteurs les plus influents sur la croissance et la production d'halocines.

Au terme des expériences et de l'analyse statistique, nous pouvons conclure :

- La croissance et la production d'halocines requièrent différents facteurs nutritionnels.

Les modèles pour la croissance et la production d'halocine peuvent s'écrire selon les équations respectives :

$$\text{DO} = 2.2542 + 0.5719 x_2 - 0.2827x_3 + 0.2141 x_5 - 0.1873 x_1x_2 - 0.1894 x_1x_3 - 0.1672 x_1x_6 - 0.4359 x_2x_3 + 0.1374 x_3x_4 .$$

$$\text{Activité} = 8.563 + 1.937x_2 - 1.125 x_3 - 0.937 x_4 + 2 x_2 x_3 + 1.063 x_2 x_4 - 0.875 x_3x_4 .$$

L'amidon présente un effet négatif sur la croissance et reste non significatif sur la production d'halocine.

- Les valeurs optimales pour la croissance et la production d'halocines sont : 1,25g/l d'amidon ; 11,0354g/l d'extrait de levure ; 18,75% de NaCl ; 3,25% de MgSO<sub>4</sub> ; 6,5 g/l de KCl et après 35 h d'incubation.

*Références*

*Bibliographiques*

## Références bibliographiques

**Bonete M.J., Camacho M., Martínez-Espinosa R.M., Esclapez J., Bautista V, Pire C, Zafrilla B, Díaz S, Pérez-Pomares F and Llorca F.** 2007. In the light of the haloarchaea metabolism. Trends in Applied Microbiology. pp 170-183.

**Casamayor, E O et Borrego C M.** (2009). PROTISTS, BACTERIA AND FUNGI: PLANKTONIC AND ATTACHED.

**Falb M, Müller K, Königsmair L, Oberwinkler T, Horn P, von Gronau S, Gonzalez O, Pfeiffer F, Bornberg-Bauer E, Oesterhelt D** (2008) Metabolism of halophile archaea. Extremophiles 12:177–196.

**Faucher J.** (2006) « Les plans d'expériences pour le réglage de commandes à base de logique floue » Thèse de doctorat, institut national polytechnique de Toulouse.

**Goupy J.** (2000). Modélisation par les plans d'expériences. Techniques de l'Ingénieur. R275, 1-23.

**HAL. V. B.** (2003). Alternative Sources of Biologically Active Substances. Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, 142 20 Prague Vol 48:563–571.

**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.

**Kerker S.** (2004). Ecology of Hypersaline Microorganisms. *In: marine microbiology: Facets opportunities.* Ed. Bookchapter. 37-47.

**Kis-Papo T et Oren A.** (2000). Halocins: are they involved in the competition between halobacteria in saltern ponds. Extremophiles. 4, 35-41.

**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.

**Meseguer I, Torreblanca M et Konishi T.** (1995). Specific inhibition of the Haloarchaeal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter by halocin H6. The Journal of Biological Chemistry. 270, 6450-6455.

**O'Connor E Met Shand RF.** (2002). Halocins and sulfolobocins: The emerging story of archaeal protein and peptide antibiotics. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 28, 23-31.

**Oren A.**(2012)Taxonomy of the family Halobacteriaceae:a paradigm for changing concepts in prokaryote systematics.*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2012), 62, 263–271

**Oren A.**(2011 ).3.4 Ecology of Halophiles.in *Extremophiles Handbook*. Koki Horikoshi (ed),p 344-351.

**Oren A.** (2006a). The Order Halobacteriales. *Prokaryotes*. 3, 113-164.

**Oren A.** (2013). Life at high salt concentrations. *Prokaryotes*. 2, 263-282.

**Oren A.** (2008). Microbial life at high concentrations: phylogenetic and metabolic diversity.*Bio Med Central*.pp: 1-13.

**Oren A.** (2013a). Life at high salt concentrations. In : E. Rosenberg et al. (Eds.), *The Prokaryotes - Prokaryotic Communities and Ecophysiology*, pp. 421-436.

**Prescott L. M., Harley J.P. et Klein D.A. (2003).** *Microbiologie*. 2e édition française. Ed. De Boeck, Bruxelles. 1101p.

**Shand RF et Leyva K.** (2007). Peptide and protein antibiotics from the domain Archaea: Halocins andSulfolobocins. *Bacteriocins: Ecology and Evolution*, 93-109.

**Shand RF.** (2006). Detection, quantification and purification of halocins: Peptide antibiotics from haloarchaeal extremophiles. *Methods in Microbiology*. 35.

# *Annexes*

**Annexe 1 : Appareillage**

- Balance
- Plaque chauffante et agitation magnétique TRADE Raypa AG-2 et AG-5
- Bain marie HS-B20 digital, IKA labortechnik, Allemagne
- pH-mètre Eutech pH 700
- Autoclave ALFA-10-Plus
- Etuve Venticell MMM
- Vortex VELP SCIENTIFIC, Italy
- Spectrophotomètre UV mini 1240 SHIMADZU
- Centrifugeuses : SIGMA 1-14
- Bain marie
- Four pasteur RADE Raypa
- Micropipettes
- Pipettes
- Réfrigérateur
- Plaque agitatrice VBRAMAX 100

## Annexe II : Pigmentation des cultures



Figure : Croissance et pigmentation de la souche S1 en erlens sur des milieux différents.



## Résumé

Une souche d'*Haloarchaea* (S1) isolée de la sebkha d'Ouargla a été retenue pour son activité antibiotique intéressante. L'optimisation du milieu de culture pour la croissance et la production d'halocine par un plan factoriel fractionnaire à deux niveaux type  $2^{k-p}$  à montrer que les facteurs requis pour la croissance et la production d'halocine sont différents.

L'extrait de levure influe positivement aussi bien sur la croissance que sur la production d'halocine alors que le NaCl présente un effet négatif sur les deux réponses avec un effet marqué pour l'activité antibiotique pour les deux facteurs. Cependant, l'interaction entre les facteurs est négative sur la croissance et positive sur la production d'halocine.

L'amidon présente un effet négatif sur la croissance et reste non significatif sur la production d'halocine. Les valeurs optimales pour la croissance et la production d'halocine sont : 1,25g/l d'amidon ; 11,0354 g/l d'extrait de levure ; 18,75% de NaCl ; 3,25% de MgSO<sub>4</sub> ; 6,5 g/l de KCl et après 35 h d'incubation.

**Mots clés :** *Haloarchaea*, optimisation, plan factoriel fractionnaire, croissance, halocine.

## Abstract

A strain of *Haloarchaea* (S1) isolated from the sebkha of Ouargla was retained for its interesting antibiotic activity. The optimization of the culture medium for the growth and the production of halocin by a two levels fractional factorial design  $2^{K-p}$  shows that the factors necessary for the growth and the production of halocin are different.

The yeast extract influences positively the growth as well as the production of halocin, whereas NaCl presents a negative effect on the two answers with a marked effect for the antibiotic activity for the two factors. However, the interaction between the factors is negative on the growth and positive on the production of halocin. The optimal values for the growth and the production of halocin are: starch 1,25g/l; 11,0354g/l of yeast extract; 18,75% of NaCl ; 3,25% of MgSO<sub>4</sub>; 6,5 g/l of KCl and after 35 h of incubation.

**Keywords:** *Haloarchaea*, optimization, fractional factorial design, growth, halocin.