

République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de L'Enseignement Supérieurs et de la Recherche Scientifique
جامعة احمد بوقرة بومرداس
Université M'Hamed BOUGARA de Boumerdès



Faculté des Sciences
Département de Biologie

Mémoire de fin d'étude
En vue de l'obtention du diplôme de Master II

Filière : Biotechnologie
Spécialité : Biotechnologie Microbienne

**Production de caroténoïdes par les archées halophiles dans
diverses conditions de culture et évaluation de leur activité
antioxydante et antimicrobienne.**

Réalisé par

Melle DERRADJI Maria

Melle HADJARI Khaoula

Melle TACHTIOUI Manel

Soutenu le : 27/06/2024 devant le jury composé de :

Mme KEBBOUCHE-GANA Salima	Pr.	UMBB	Présidente
Mme KHEMILI-TALBI Souad	Pr.	UMBB	Examinatrice
Mme AKMOUSSI-TOUMI Siham	MCB	UMBB	Promotrice
Mr. SEMRI Mohamed Lounès	Chef de laboratoire	Institut Pasteur	Co-promoteur
Mme AISSAT Faiza	MAA	UMBB	Invité

Année universitaire 2023/2024

SOMMAIRE

Introduction générale1

Revue bibliographique	3
I. Haloarchaea.....	3
I.1 La taxonomie	3
I.2 Structures cellulaires	5
I.2.1 La morphologie.....	5
I.2.2 Paroi cellulaire	5
I.2.3 Lipides et membrane cytoplasmique	6
I.3 Adaptations moléculaires des halophiles aux environnements salins	6
I.3.1 Adaptation cellulaire	7
I.3.2 Adaptations des protéines halophiles	8
I.4 L'application biotechnologique des cellules et biomolécule d'haloarchaea.....	8
I.4.1 Utilisation des cellules Haloarchaea.....	9
• Bio-remédiation.....	9
• Utilisation des nanobiotechnologie.....	9
• Fermentation des aliments.....	10
• Augmentation de la production du sel	10
I.4.2 Utilisation des biomolécules des haloarchaea.....	10
• Les enzymes hydrolytique	10
• Halocines	11
• Caroténoïdes	11
I.5 Les Caroténoïdes.....	11
I.5.1 Caroténoïdes produits par les Archaea halophiles extrêmes	12
I.5.1.1 Les types et structure des Caroténoïdes.....	12
I.5.1.2 La biosynthèse.....	12
I.5.1.3 Fonction biologiques	13
I.5.1.4 La bactériorubérine	14
I.5. 2. Caractérisation des caroténoïdes produits par les haloarchaea	14
I.5.2.1 Extraction	14
I.5. 2. 2 Production des caroténoïdes par les haloarchaea.....	15
I.5. 3. Intérêt biotechnologique des caroténoïdes des haloarchaea.....	16
I.5. 3. 1 En industrie agroalimentaire.....	16
I.5. 3. 2 Contribution potentielle à la santé.....	17
I.5. 3. 3 En cosmétologie.....	17
I.5.3. 4 Production de sel	18
I.6 Optimisation de production de caroténoides par les plans d'expériences.....	18

I.6.1 Définitions d'un plan d'expérience.....	18
I.6.2 Les éléments d'un plan d'expérience.....	19
I.6. 2.1. Réponse.....	19
I.6.2.2. Facteurs.....	19
I.6.2.3. Domaine d'étude	19
I.6.2.4. Cordonnées centrées réduites	19
I.6.2.5. Surface de réponse.....	20
I.6.3 Les principaux avantages des plans d'expériences.....	20
I.6.4 Différents types de plans d'expériences	21
I.6.4.1. Les plans de criblage	21
• Les plans de Plackett-Burman	21
• Les plans de Taguchi.....	22
I.6.4.2. Les plans d'optimisation.....	22
• Les plans de Box-Behnken	23
• Les plans composites centrés.....	24
Matériel et méthodes	25
II. Matériels et méthodes	25
II.1 Matériels.....	25
II.1.1 Matériels biologique.....	25
II.1.2 Matériels non biologiques.....	25
II.2 Méthodes	26
II.2.1 Revivification des souches archéennes.....	26
II.2.2 Vérification de la pureté de la souche.....	26
a. Etude macroscopique.....	22
b. Etude microscopique.....	22
II.2 .3 Étude des caractères biochimiques des isolats.....	28
• La galerie API 20 ^E	28
• Sensibilité aux antibiotiques.....	28
II.2 .4 Production du pigment caroténoïde produit par des souches halophiles extrêmes	29
II.2.4.1. suivi de la croissance et de la teneur totale en caroténoïdes.....	24
a. Suivi de la croissance cellulaire	29
b. Évaluation de la teneur totale en caroténoïdes.....	29
II.2 .4.2 Optimisation de la production du pigment par plans d'expériences	31
a. Criblage des paramètres influençant la production du pigment caroténoïde par l'utilisation du plan de Plackett-Burman.....	31
b. Optimisation par méthodologie de surface de réponse (RSM) basée sur le plan composite central (CCD).....	32

II.2.5 Application biotechnologique du pigment caroténoïdes des souches halophiles extrêmes MD15 et KH12.....	35
a.évaluation de l'activité antioxydante des caroténoïdes	35
• Le test DPPH	35
• Réduction de fer	36
• Le test ABTS.....	37
b.Évaluation de l'activité antibactérienne des caroténoïdes.....	38
• Souches microbiennes testées	38
• Préparation des suspensions bactériennes et ensemencement.....	38
Résultats et discussion	39
III.Résultats et discussions.....	39
III.1Revivification des souches archées halophiles.....	39
III.2Vérification de la pureté des souches archées halophiles	39
a. Etude macroscopique.	40
b. Étude microscopique.....	40
c. Étude des caractères biochimiques des souches.....	41
• La galerie API 20 ^E	41
• La sensibilité aux antibiotiques	42
III.3Production du pigment caroténoïde par des souches halophiles extrêmes.....	43
III.3.1. Production et identification du pigments caroténoïde... ..	43
III.3.2. Optimisation de la production du pigment caroténoïde par la méthode des plans D'expériences.....	45
III.3.2.1Criblage des facteurs influençant la production du pigment caroténoïde par conception de Placktt-burman.....	45
III.3.2.2Optimisation des paramètres déterminants la production du pigment carotenoïde par méthodologie de surface de réponse (RSM) basée sur le plan composite central (CCD).....	48
III.3.2.3 Effet des paramètres intervenant dans la production des caroténoïdes	53
III.3.2.4Mise en place des conditions optimales et validation du modèle.....	58
III.4 Évaluation de l'activité antioxydante des carotenoïdes.....	59
• Test DPPH.....	59
• Test ABTS.....	62
• Réduction de fer (FRAP)	63
III.5 L'évaluation de l'activité antimicrobienne des caroténoïdes.....	65
• Les souches bactériennes	66
• Les souches fongiques.....	68
Conclusion générale	70
Références Bibliographiques.....	72

Annexes

Résumé

Remerciement

Avant tout, nous exprimons notre gratitude envers **Dieu**, le Tout-Puissant, pour nous avoir donné la force, le courage et la patience nécessaires pour mener à bien ce travail.

Nous tenons ensuite à remercier chaleureusement notre promotrice, **Dr. AKMOUSSI-TOUMI Siham**, pour son encadrement précieux et ses conseils avisés tout au long de l'élaboration de ce mémoire. Sa rigueur intellectuelle, sa disponibilité et sa confiance nous ont permis de progresser considérablement et de mener à bien ce travail de recherche.

Nous remercions également les membres du jury, Pr. **GANAK-KEBBOUCHE Salima** et **Dr. KHEMILI-TALBI Souad**, pour l'honneur qu'ils nous font en acceptant de juger ce mémoire.

Nous sommes également reconnaissants envers notre co-promoteur, **Monsieur SEMRI**, pour son soutien et ses encouragements. Sa connaissance approfondie du sujet a été un atout précieux pour nous.

Nous tenons à remercier particulièrement **Dr. HACHEMI Nabila**, INGM, Université M'HAMED BOUGARA de Boumerdès pour son écoute attentive, son aide précieuse et sa motivation constante. Sa présence bienveillante a été un véritable réconfort tout au long de ce parcours.

Enfin, nous tenons à remercier **Madame AMARAKORBA Anissa** pour sa présence et pour nous avoir fourni le matériel nécessaire à la réalisation de la partie pratique de ce mémoire à pasteur Ruisseau Annexe EL-Hamma. Son aide a été précieuse et nous a permis de mener à bien nos expérimentations.

Nous remercions également nos familles et nos amis pour leur soutien indéfectible tout au long de nos études. Nous sommes reconnaissants de leur présence et de leur amour.

Merci à tous et toutes !

Dédicace

"وكانت اخر دعواهم ان الحمد لله رب العالمين"

Le devoir de reconnaissance m'oblige de dédier ce modeste mémoire à tous qui sont chers, ce sont ceux à qui je dois mon succès

A notre « Dieu tout puissant » merci Dieu pour de m'avoir donné la vie, la foi, les prières exaucées pour m'y arriver.

A celui qui m'a dit un jour que je suis la prunelle de ses yeux, et qui voyait dans mon plus simple succès la plus grande réalisation, à l'homme qui a fait de moi ce que je suis aujourd'hui, celui dans les yeux duquel j'ai vu la fierté de moi, mon modèle de respect et d'amour, la compréhension et la générosité, à mon père **Mourad** « Paix a son âme ».

A celle dont ses paroles m'accompagnent depuis que j'étais petite, la première femme forte courageuse qui a souffert sans nous laisser souffrir, celle qui m'a encouragé à poursuivre mes rêves même les obstacles semblaient insurmontables. Mon ange gardien ton amour et ta présence dans ma vie, à ma mère **Farida**.

A mes sœurs **Racha** et **Feriel** qu'on a partagé ensemble les moments de joie et de tristesse, en écrivant ces lignes merci pour l'énergie positive que vous apportez dans mon existence.

A mes épaules solides, celui qui m'ont apporté le véritable sens de fraternité et les moments de bonheur mes pensées les plus profondes s'adresse aussi à vous, mes frères **Abdelmoumen** et **Amine**.

Je dédie cette réussite aussi à ma tante **Nabila** pour son soutien moral et sa présence constante.

A mon cher témoin des étapes de ma vie, dans mon succès, joie, tristesse, ma moitié **Sofia** je n'oublierai jamais ton encouragement permanent, votre présence dans mon cœur est un trésor précieux.

A ma famille ma grand-mère, mes oncles et mes cousins et cousines qui m'ont toujours soutenu et cru en moi.

A **Khaoula** et **Manel**, merci pour d'être les meilleures versions de vous-même, votre contribution a été essentielle à cette réussite

Merci de me rendre bien entourée !

Maria

Dédicace

A" ma chère maman,

Ce mémoire est dédié à toi, pour tout l'amour, le soutien et les sacrifices que tu as faits pour moi. Ton encouragement constant, ta patience et ta foi en mes capacités ont été des sources inestimables de force tout au long de mon parcours académique.

Merci de m'avoir inculqué la valeur de l'éducation et l'importance de persévérer malgré les obstacles. Ta sagesse et ton amour inconditionnel m'ont guidé et m'ont permis de réaliser ce projet.

A" ma famille élargie, à mon frères **Nedjmeddine** et mes sœurs **Rania** et **Malak**, à mon neveu **Anes** et ma nièce **Mayar**, qui m'a entouré d'amour et de bienveillance tout au long de ma vie, je voue ce travail en reconnaissance de leur présence précieuse.

Je dédie ce mémoire à mes amis chers **Maria** et **Manel**, qui ont partagé mes joies et mes peines, m'offrant un soutien indéfectible et une source d'inspiration inépuisable.

Enfin, je dédie ce mémoire à tous mes enseignants, qui m'ont guidé et inspiré durant mes années d'études.

Khaoula

Dédicace

Louange à Dieu seul,

Avec tous mes sentiments de respect, avec l'expérience de ma reconnaissance, je dédie ma remise de diplôme et ma joie à mon paradis, à la prunelle de mes yeux à la source de ma joie et mon bonheur, ma lune et le fil d'espoir qui allume mon chemin, ma moitié, ma maman **Samia**.

À celui qui m'a fait une femme, ma source de vie, d'amour et d'affection, à mon support qui était toujours à mes côtés pour me soutenir et m'encourager, à mon prince papa **Ahmed**.

A ma grande sœur **Nada** qui n'a pas cessée de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études.

À mon adorable petite sœur **Lyna** qui sait toujours comment procurer la joie et le bonheur pour toute la famille.

À celles qui m'ont soutenues avec amour quand j'étais faible, quand j'étais sur le point de trébucher, À mes compagnes et amies de cœur dans les jours bons et amers **Roumaissa** et **Hanine**

A mes chères cousines **Nihel**, **Rania** et **Chichi** merci pour votre amour et votre encouragement

A mes chères amies, Safa, Rania, **Kaouther**, **Khaoula** et **Maria** pour leurs aides et supports dans les moments difficiles

A toute ma famille

Manel

Liste des figures

		Page
Figure 01	Résumé de la classification actuelle du domaine Archaea.	04
Figure 02	Adaptations des halophiles aux environnements hypersalins.	08
Figure 03	Premières étapes de la biosynthèse des caroténoïdes C50 chez les haloarchaeae	15
Figure 04	Protocole de quantification des caroténoïdes	24
Figure 05	Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH entre l'espèce radicalaire DPPH et un antioxydant	28
Figure 06	Aspects des cultures liquides des deux souches halophiles extrêmes	31
Figure 07	Aspects macroscopiques des souches halophiles extrêmes MD15 et KH12	31
Figure 08	Résultats d'examen microscopique.	32
Figure 09	Résultats du système API 20 ^E	34
Figure 10	Résultats de la sensibilité aux antibiotiques testés.	35
Figure 11	Cinétique de croissance et de production des caroténoïdes par les souches halophiles extrêmes	36
Figure 12	Spectre UV/VIS d'extrait méthanolique obtenus à partir de souche halophile extrême MD15	37
Figure 13	Diagramme de Pareto et la droite d'Henry du plan Plackett-Burman	39
Figure 14	Plan de prédiction et observation des réponses par le plan d'expérience	42
Figure 15	Effet de la concentration d'amidon et d'extrait de levure sur la production des caroténoïdes	46
Figure 16	Effet de la concentration d'amidon et pH sur la production des caroténoïdes	47
Figure 17	Effet de la concentration d'amidon et de NaCl sur la production des caroténoïdes	48
Figure 18	Effet de la concentration en extrait de levure et du NaCl sur la production des caroténoïdes	48
Figure 19	Effet de la concentration en extrait de levure et du pH sur la production des caroténoïdes	49
Figure 20	Effet de la concentration en NaCl et du pH sur la production des caroténoïdes	49
Figure 21	Optimisation des conditions de production des caroténoïdes	50
Figure 22	Pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction des concentrations d'extrait caroténoïdique	52
Figure 23	Variation de la couleur du réactif DPPH	53
Figure 24	Pourcentage d'inhibition du radical ABTS+	54

Liste des figures

Figure 25	variation de la couleur du réactif ABTS+.	Page 55
Figure 26	Activité réductrice des extraits caroténoidique	56
Figure 27	variation de la couleur du réactif de FRAP	57
Figure 28	Le pouvoir antibactérien en fonction de la concentration d'extrait	60
Figure 29	Exemples de pouvoir antibactérien des extraits caroténoïdiques	61
Figure 30	Le contrôle négatif du pouvoir anti bactérien de solvant chlorometanolique contre les souches testées	62

Liste des tableaux

	Page
Tableau 01	Souches bactériennes et fongique testées 21
Tableau 02	Niveau expérimentaux des quatre facteurs utilisés dans le plan Plackett-Burman 26
Tableau 03	La matrice expérimentale utilisée pour mettre en place les expériences du plan Plackett-Burman 27
Tableau 04	Niveaux des facteurs choisis pour le plan d'expérience. 28
Tableau 05	Matrice du plan composite central (CCD) 28
Tableau 06	Caractères macroscopiques des souches halophiles extrêmes étudiées 32
Tableau 07	caractères d'étude morphologique 33
Tableau 08	Plan Plackett-Burman pour le criblage des variables affectant la production des caroténoïdes 38
Tableau 09	Les coefficients utilisés dans le plan Plackett-Burman. 40
Tableau 10	Matrice du plan composite centré (CCD) 41
Tableau 11	Résultats de l'étude statistique de l'effet des facteurs testés sur la production des caroténoïdes 43
Tableau 12	Résultats de l'analyse de la variance (ANOVA) du modèle obtenu 44
Tableau 13	Valeurs d'EC50 d'activité antioxydante des extraits caroténoïdiques 53
Tableau 14	Valeurs d'EC50 d'activité antioxydante des extraits caroténoïdiqu 55
Tableau 15	EC50 en (ug/ml) des extraits méthanoïques de caroténoïdes et l'acide ascorbique 56

Introduction générale

Introduction générale

Les additifs alimentaires sont essentiels pour améliorer la qualité des aliments en influençant leur goût, leur texture et leur durée de conservation. Malgré leur utilisation répandue, avec plus de 300 variantes réparties dans diverses catégories fonctionnelles et un marché estimé à plus de 36,16 milliards de dollars en 2024 (Mordor Intelligence, 2024), des inquiétudes croissantes concernant leur sûreté émergent. Des experts suggèrent de restreindre le nombre d'additifs à 48 en raison de leur origine synthétique et des risques potentiels pour la santé, notamment des allergies, de l'hyperactivité chez les enfants et des risques de cancer (Gallen et Pla, 2013 ; Kumar et *al.*, 2019 ; Martins et *al.*, 2019).

Une approche prometteuse dans la recherche de composés bioactifs consiste à explorer les microorganismes qui prospèrent dans des environnements extrêmes, une méthode appelée bioprospection. Ces microorganismes, appelés extrémophiles, ont développé diverses stratégies d'adaptation au fil de l'évolution. Leur diversité métabolique et la présence de biomolécules uniques leur permettent non seulement de survivre dans des conditions extrêmes, mais également de se développer de manière optimale (Rampelotto, 2013 ; Giddings et Newman, 2015 ; Schröder et *al.*, 2020).

Les haloarchaea sont capables de synthétiser des pigments, principalement des caroténoïdes de type C50, qui jouent un rôle crucial dans leurs processus physiologiques et moléculaires, tels que la protection contre le rayonnement solaire et l'adaptation aux environnements extrêmes (Torregrosa-Crespo et *al.*, 2018). Ces substances présentent un fort potentiel biotechnologique et offrent des alternatives plus sûres aux additifs chimiques. En 2024, le marché mondial des caroténoïdes produits par divers organismes est estimé à 10,52 milliard de dollars et devrait atteindre 12,56 milliards de dollars d'ici 2029 (Farkas et *al.*, 2020 ; Mordor Intelligence, 2024).

La production de caroténoïdes par les haloarchaea présente des avantages uniques en raison de la tolérance de ces microorganismes aux environnements salins, ce qui facilite une culture à grande échelle dans des conditions non stériles et réduit les coûts de production. Leur extraction est également relativement simple, rapide et économique (Rodrigo-Baños et *al.*, 2015 ; Torregrosa-Crespo et *al.*, 2018). Malgré ces avantages, les applications biotechnologiques des caroténoïdes haloarchéens restent peu explorées en raison du manque

d'informations sur leur métabolisme et leur biosynthèse, ainsi que du manque de recherches sur leur production et leurs propriétés biologiques (Giani et *al.*, 2019).

Les recherches sur les molécules bioactives des Archaea halophiles extrêmes algériennes ont été peu nombreuses (Kebbouche-Gana et *al.*, 2009 ; Khemili et *al.*, 2015; Quadri et *al.*, 2016 ; Menasria et *al.*, 2018; Akmoussi et *al.*, 2018), mais les recherches antérieures se sont focalisées sur la diversité microbienne des environnements hypersalins en Algérie (Hacène et *al.*, 2004 ; Kharroub, 2007 ; Khellaf, 2019 ; Menasria et *al.*, 2018). Selon Sahli et *al.* (2020), seules quelques recherches ont étudié les caroténoïdes produits par ces microorganismes, leurs propriétés biologiques et leur potentiel biotechnologique.

L'objectif de cette étude est d'optimiser les conditions de production de caroténoïdes totale par les souches halophiles extrêmes, en utilisant des plans d'expériences, et étude de leurs propriétés antioxydantes et antimicrobiennes.

Pour ce faire, nous avons opté pour la division de ce travail en trois grandes parties :

La première partie est consacrée à la synthèse bibliographique relative au sujet, la deuxième partie est réservée à la présentation de l'ensemble des tests effectués *in vitro* et la troisième partie représente les résultats obtenus et leur discussion suivie d'une conclusion et de perspectives.

Revue bibliographique

I. *L'Halobacteria*

Il s'agit de micro-organismes qui se distinguent par leur mode de vie halophile obligatoire, aérobies facultatifs, hétérotrophes ou phototrophes. Outre leur capacité à satisfaire les critères de salinité les plus élevés, ils présentent diverses caractéristiques chimiques spécifiques (Kharroub et *al.*, 2014 ; Stan-Lotter et Fendrihan, 2015). Ils sont également considérés comme des polyextremophiles car ils sont adaptés non seulement à ces concentrations de sel élevées, mais aussi à d'autres paramètres écologiques extrêmes tels que des pH ou des températures extrêmement élevées et faibles (Bowers et *al.*, 2009).

La plupart des haloarchées se développent dans des conditions optimales à une concentration de 20 ou 25 % (p/v) de NaCl (3,4-4,3 M), tandis que l'épuisement du sel à des concentrations inférieures à 6 % (p/v) entraîne des dommages permanents et la mort cellulaire. Néanmoins, quelques variétés sont moins exigeantes et peuvent prospérer à des niveaux de NaCl inférieurs à 1 M (Ventosa, 2006 ; Andrei et *al.*, 2012). Outre le NaCl, certaines espèces nécessitent des quantités importantes d'ions Mg^{+2} (20 à 50 mM), comme par exemple *halorubrum sodomense* ou les cations divalents Ca trouvés dans *Haloferax volcanii* afin de maintenir la stabilité structurelle de leur paroi cellulaire et sa morphologie (Abrevaya, 2012). Bien que les *haloarchaea* soient généralement des neutrophiles, certains genres sont alcalophiles comme le cas de *Natronobacterium* et *Natronococcus* qui se développent à un pH de 10 à 11 (Enache et *al.*, 2017). Malgré cela, seul un nombre limité d'espèces ont été identifiées comme acidophiles, notamment *Halarchaeum Acidiphilum*, obtenu à partir de sel australien (Minegishi et *al.*, 2010). Les températures comprises entre 35°C et 50°C sont idéales pour la croissance de la plupart des espèces (Oren et *al.*, 2017). Cependant les espèces tels que *Natronolimnobius aegyptiacus* et *Haloferax mediterranei* peuvent se développer lorsqu'ils sont exposés à des températures élevées de 55°C et 51°C respectivement (Bowers et Wiegel, 2011). Certains, tels que *Halorubrum lacusprofundi*, qui se rencontrent dans les lacs salés de l'Antarctique, résistent à des températures basses et peuvent survivre jusqu'à 4°C, avec une température optimale de 31 à 37°C (Franzmann et *al.*, 1988).

I.1 La taxonomie

Les membres du domaine Archaea représentent les principales populations microbiennes

dans des environnements halophiles extrêmes, à l'exception des bactéries abondantes telles que *Salinibacter ruber* (Woese et al., 1990). Les archées halophiles extrêmes sont principalement classées dans le phylum *Euryarchaeota*, classe *Halobactéries* (Grant et al., 2001; Grant, 2011). Actuellement, jusqu'à 260 espèces d'archées halophiles ont été caractérisées et regroupées en 70 genres (Oren, 2020), trois ordres et six familles: ordre *Halobacteriales* (familles *Halobactérieceae*, *Haloarculaceae* et *Halococcaceae*), ordre *Haloferacales* (Familles *Haloféracées* et *Halorubraceae*) et ordre *Natrialbales* (Fig. 1) (Gupta et al., 2016; Martínez et al., 2022).

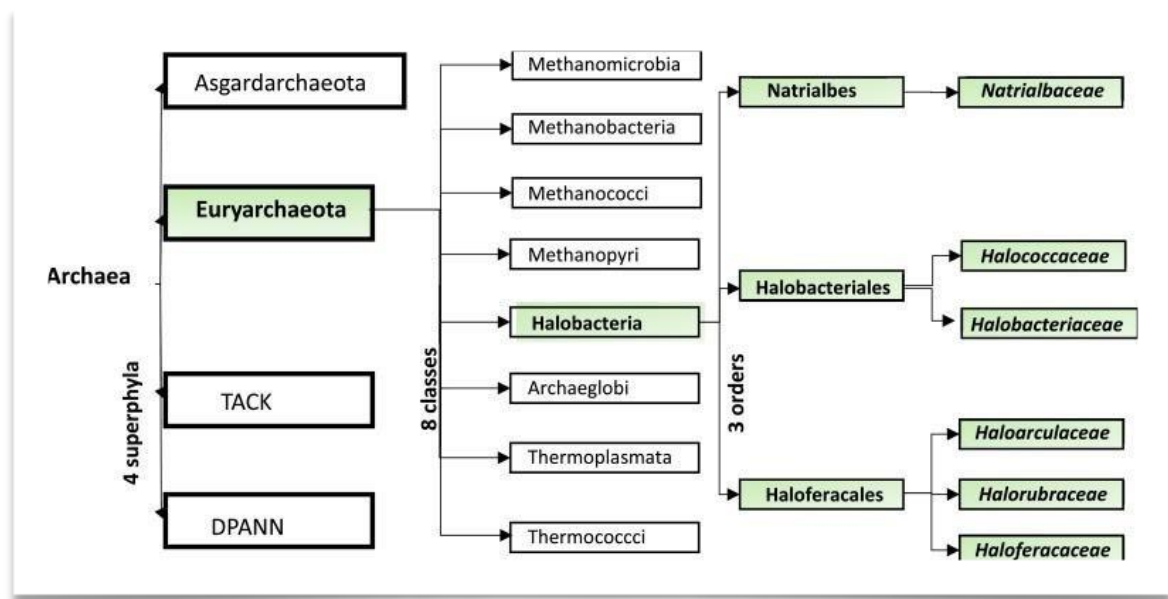


Figure.01. Résumé de la classification actuelle du domaine Archaea. La couleur verte souligne les groupes qui constituent les principales populations microbiennes dans des environnements halophiles extrêmes tels que les étangs salés, les marécages et les lagunes côtières (Martínez et al., 2022).

Ces espèces sont, en général, des chemio-organohétérotrophes, aérobies, bien que certaines espèces puissent utiliser NO_3^- ou d'autres composés comme NO^- , ClO^- , ou ClO^- comme derniers accepteurs d'électrons dans un processus respiratoire anoxique, montrant ainsi une grande diversité métabolique. En outre, la plupart des espèces d'archae halophiles sont caractérisées par leur pigmentation orange et rouge due à la présence de caroténoïdes, ainsi que des protéines de membrane colorées comme la bacteriorhodopsine, la

halorhodopsin et d'autres protéine de la rétine (Andrei et *al.*, 2012; Martínez et *al.*, 2022).

I.2 La Structures cellulaires

I.2.1 La Morphologie

Les cellules des archées halophiles se distinguent par leur grande diversité morphologique, on peut les trouver sous formes de cocci (*Halococcus*), de carrées (*Haloquadratum walsbyi*), de disques (*Halarchaeum acidiphilum*), de bâtonnets (*Halobacterium*), triangles (*Haloarcula japonica*), et si les conditions sont défavorables on les distingue sous formes pléomorphiques (*Haloferax*). Ce sont des organismes de Gram négatif et peuvent être trouvés dans des tailles allant de 1 à 15 µm (Oren, 2006 ; Abrevaya, 2012 ; Amoozegar et *al.*, 2017). Les flagelles composés de plusieurs glycoprotéines sulfatées de flagelline sont responsables de la motilité de nombreuses haloarchées. Comparées aux bactéries, elles sont moins sensibles aux facteurs de dégradation tels que les protéases et les températures élevées. Par ailleurs, Les solutions à faible teneur en sel provoquent sa désintégration (Oren, 2006 ; Syutkin et *al.*, 2014).

Tous les membres de la classe des halobactéries, à quelques exceptions près, forment des colonies sur des milieux solides de couleur rouge, orange ou rose. La bactériobérine et ses dérivés, qui sont le pigment membranaire de type caroténoïde C50, jouent un rôle crucial dans la protection de la membrane cellulaire des dommages photo-oxydatifs tout en fournissant également un renforcement structurel. La production de ces pigments est influencée par la concentration en sel dans l'environnement et l'état nutritionnel des cellules (Fendrihan et *al.*, 2006 ; Calegari-Santos et *al.*, 2016 ; Amoozegar et *al.*, 2017 ; Oren et *al.*, 2017).

Outre les caroténoïdes, certains membres des genres taxonomiques *Halobacterium*, *Haloarcula* et *Halorubrum* captent également l'énergie lumineuse (500 à 700 nm) et la transforment en énergie chimique pour le transport actif des ions à travers les membranes plasmique (Oren et *al.*, 2017).

I.2.2 La Paroi cellulaire

Les haloarchaea ont une paroi cellulaire qui ne contient pas de peptidoglycane mais est constituée de divers composés comme des polysaccharides, des protéines et des

glycoprotéines. Cette absence de peptidoglycane les rend résistants aux antibiotiques qui ciblent la synthèse de la paroi, tels que les β -lactamines. (Kandler et König, 1998 ; Oren, 2006).

Les halobacilles ont une couche protectrice de glycoprotéines appelée S-layer, sensible aux détergents. Les glycoprotéines interagissent avec les ions Na^+ et K^+ pour hydrater les parois et améliorer la solubilité des nutriments (Klingl, 2014 ; Oren, 2014). Une haute concentration de NaCl est nécessaire pour maintenir la stabilité de cette paroi, car les ions Na^+ se lient aux groupes carboxyles négatifs. Sans suffisamment de Na^+ , les charges négatives se repoussent, causant la mort cellulaire. (Abrevaya, 2012 ; Calegari-Santos et *al.*, 2016).

Certaines archées halophiles, comme ceux du genre *Halococcus*, possèdent des parois cellulaires multipolymères qui restent stables sans haute teneur en sel. Leur paroi dure est faite d'hétéropolysaccharides sulfatés, principalement composés de mannose, glucose, galactose, et N-acétylglucosamine. Chez *Natronococcus occultus*, la paroi cellulaire contient des chaînes de poly(L) glutamine liées à deux oligosaccharides. (Abrevaya, 2012 ; Oren, 2014 ; Gupta et *al.*, 2015).

I.2.3 Les Lipides et membrane cytoplasmique

Les membranes des archées halophiles sont composées de lipides formant une bicouche d'éther disoprényl-L-glycérol, avec des protéines intégrées. Leurs chaînes d'acides gras sont liées au glycérol par des liaisons éther, offrant une meilleure stabilité thermique et oxydative que les liaisons esters des bactéries. (Kates, 1996).

Les lipides membranaires des *Halobacterium* se composent de 10% de lipides neutres et de lipides polaires, dont les phospholipides, les sulfolipides et les glycolipides. Le phosphate-méthylester de phosphatidylglycérol (PGP-Me) constitue 50 à 80% des lipides polaires et stabilise la membrane en présence de fortes concentrations de sel (Tenchov et *al.*, 2006 ; Oren, 2014). Les glycolipides, comme le S-TGD-1, le TGD-1 et le S-TeGD, sont utilisés comme marqueurs chimiques pour identifier les *Halobacterium*. (Oren, 2006).

I.3 L'Adaptations moléculaires des halophiles aux environnements salins

La survie dans ces environnements nécessite des adaptations spécialisées aux niveaux

cellulaire et enzymatique, pour préserver l'équilibre osmotique. Cet équilibre est très important puisque les micro-organismes peuvent perdre de l'eau, causant une perte fatale de la structure et de la fonction cellulaires (Mongodin et *al.*, 2005).

I.3.1 L'Adaptation cellulaire

Les micro-organismes qui ne sont pas adaptés à des environnements très salins perdront de l'eau. Pour éviter une perte excessive d'eau dans de telles conditions, les halophiles ont développé deux stratégies fondamentales différentes pour l'existence du monde microbien qui permettent à certains micro-organismes de faire face au stress osmotique dû à la présence d'une forte concentration de sel (Averhoff.B.,Muller.V .2010).

- La stratégie " sel dans le cytoplasme" implique que les ions inorganiques, principalement K^+ et Cl^- , s'accumulent dans le cytoplasme jusqu'à ce que la concentration en sel interne soit comparable à celle en extracellulaire. Les archées halobactériennes, qui sont extrêmement halophiles, et les bactéries haloanaérobies, qui sont halophiles et anaérobies, utilisent cette stratégie. (Averhoff.B., Muller.V.2010)
- La Stratégie de soluté organique à faible concentration en sel, la plupart des procaryotes font face à une osmolarité accrue en absorbant ou en créant des solutés compatibles pour assurer l'équilibre osmotique, qui sont des petites molécules organiques hautement solubles qui ne perturbent pas le métabolisme central, même lorsqu'elles s'accumulent à des concentrations élevées. Dans les trois domaines de la vie, cette stratégie est largement utilisée et bien conservée. (Averhoff.B., Muller.V.2010).

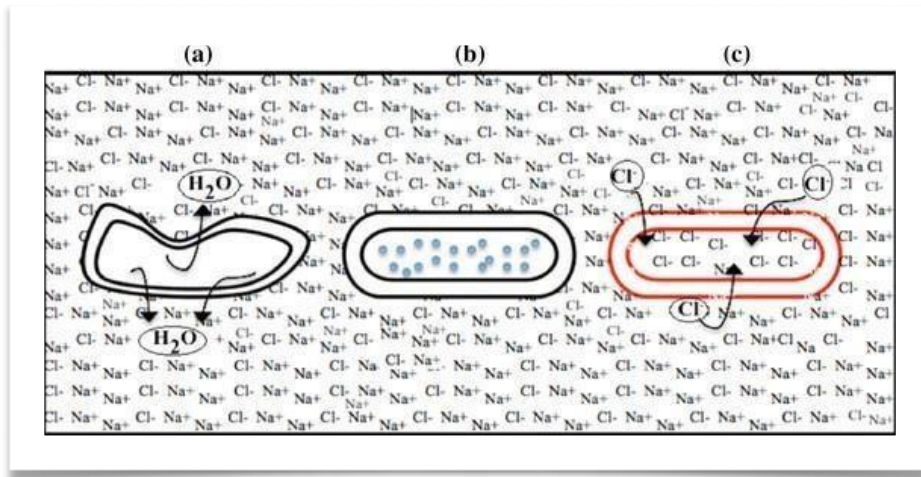


Figure.02. Adaptations des halophiles aux environnements hypersalins. A L'intégrité des macromolécules non halophiles sont compromise et l'écoulement de l'eau hors de la cellule produit un effet de turgescence. B Les halophiles modérés maintiennent leurs structures via la synthèse de solutés organiques compatibles. C Les halophiles extrêmes maintiennent leurs structures via l'équilibrage des concentrations de sel cellulaire et environnemental (Edbeib et *al.*, 2016).

I.3 .2 L'Adaptations des protéines halophiles :

La solubilité, la stabilité et le fonctionnement des protéines sont considérablement affectés par un environnement riche en sel. Deux caractéristiques structurales cruciales déterminent la stabilité des enzymes halophiles dans des conditions extrêmes (Sinha et Khare, 2014 ; DasSarma et DasSarma, 2015) :

une augmentation de l'acide aminé chargé négativement conduit à une organisation des ions salins à la surface des protéines, qui renforce à la fois les interactions faibles protéine-protéine à des fortes concentrations en sel (répulsion). (Mart .V, 2011)

Le « modèle de stabilisation-solvatation » En présence d'une concentration élevée en sels, une couche de solvatation entourant la protéine, ce qui maintient l'équilibre en éliminant les petits solutés, évitant ainsi la précipitation des protéines. (Talon et *al.*, 2014)

I.4 L'Applications biotechnologiques des cellules et biomolécules d'haloarchaea

L'utilisation de bactéries extrémophiles comme usines cellulaires pour produire des biomolécules gagne un intérêt particulier dans la découverte de nouvelles biomolécules avec une grande variété d'applications dans de nombreux domaines, de la biomédecine à la

biotechnologie. Le développement continu de toutes les techniques d'omics et de bioinformatique a permis d'étudier une multitude de gènes impliqués dans la synthèse de composés pour l'adaptation en réponse à des conditions extrêmes. Les micro-organismes extrémophiles ont été décrits comme produisant une grande variété de composés intéressants tels que les pigments caroténoïdes, les biopolymères, les bio-plastics, les enzymes hydrolytiques, les protéines rétinienne et les biofertilisants. (Yin et *al.*, 2015)

I.4.1 L'Utilisation des cellules Haloarchaea

Les microorganismes haloarchaea ont suscité un grand intérêt ces dernières années. Ils peuvent être utilisés dans divers domaines en fonction de leurs métabolites fabriqués (Enache.M, et *al.*, 2017).

✓ La Bio-remédiation

Selon les examens de Borgne et *al.* (2008) ont examiné la biodégradation des polluants organiques par les bactéries et les archées halophiles. Quelques bactéries halophiles modérées ont montré qu'elles peuvent décontaminer le pesticide dichlorvos ($C_4H_7O_4Cl_2P$) dans des environnements salins à divers degrés. La cinétique de dégradation du dichlorvos semble suivre le mécanisme des « solutés compatibles » utilisé par de nombreux organismes pour faire face au stress osmotique provoqué par la présence de fortes concentrations de sel (Enache et *al.*, 2017).

La contamination par les composés pétroliers des environnements hypersalins est un autre domaine crucial pour la biorestauration avec des micro- organismes halophiles. En raison de leur ampleur Les bactéries et les archées halophiles, qui ont la capacité métabolique de dégrader une variété d'hydrocarbures aliphatiques et aromatiques dans diverses salinités, ont démontré la biodégradation des hydrocarbures dans des environnements à salinité modérée à élever (Fathepure 2014).

✓ L'Utilisation en nanobiotechnologie

La nanobiotechnologie, est une branche de la nanotechnologie qui comprend la fabrication de matériaux de taille nanométrique à l'aide d'approches biologiques, est un domaine multidisciplinaire (Srivastava, P. et M. Kowshik. 2015) Cependant, selon les travaux de

Srivastava et *al.* (2013), ils ont obtenu des nanoparticules d'argent avec l'haloarchaea *Halococcus salifodinae* BK3, qui a démontré une activité antibactérienne efficace contre les bactéries Gram positives et Gram négatives. Les haloarchaea pourraient être des candidats idéaux pour la synthèse de nanoparticules. Par rapport à d'autres micro-organismes, leurs cellules sont facilement lysées à de faibles concentrations de sel, ce qui rend la récupération de ces particules plus facile et plus rentable.

✓ La Fermentation des aliments

Les micro-organismes les plus distingués dans les aliments fermentés salés sont des haloarchaea en particulier, les produits asiatiques comme la sauce de poisson, la nourriture coréenne « jeokgal » et la nourriture japonaise comme « Fugunoko nujazuke » (Singh et Singh, 2017).

Les recherches ont révélé que ces micro-organismes génèrent des protéases impliquées dans le processus de fermentation. D'après des études menées que les *Haloarchaea* peuvent être utilisés comme agents de démarrage pour améliorer grandement la sécurité alimentaire, tout en réduisant la teneur en histamine (Tapingkae et al., 2010).

✓ L'Augmentation de la production du sel

Depuis des milliers d'années, le sel est produit par évaporation de l'eau de mer dans des étangs peu profonds situés le long des côtes des régions tropicales et subtropicales. Les pigments caroténoïdes produits par les archées halophiles absorbent l'énergie lumineuse, ce qui augmente la température de l'étang et entraîne une production accrue de sel en raison d'une évaporation plus rapide.

I.4.2 L'Utilisation des biomolécules des haloarchaea :

► Les Enzymes hydrolytiques :

Les haloarchées offrent une variété d'enzymes hydrolytiques intéressantes, telles que la protéase, les amylases, l'agarase et la chitinase, entre autres (Torregrosa Crespo et al., 2016). Selon Kumar et al. (2016), ces enzymes sont appelées polyextrêmophiles. Les haloenzymes ont cette caractéristique qui leur permet de stimuler des réactions dans des conditions difficiles, ce qui les rend intéressantes pour différentes applications biotechnologiques. Cependant, il est encore peu utilisé dans l'industrie. Cela pourrait être partiellement dû à la

faible demande de telles enzymes osmotiquement tolérantes dans les méthodes de production (Bonete et Martinez-Espinosa, 2011 ; Amoozegar et *al.*, 2017).

► Les Halocines

Les halocines produits par la classe des *halobacter* sont des peptides protéiques antimicrobiens (AMP) qui inhibe la croissance des halophages et des archées. Il en existe divers types à une densité optique différente. Cependant, que certains peuvent présenter une activité protéolytique telle que des protéases à sérine (Kumar et Tiwari, 2019). Ces halocines ont le potentiel de contribuer à la prévention de l'ischémie myocardique et de minimiser les dommages lors d'une transplantation d'organe, et peuvent également les utiliser comme conservateur pour contrôler le développement des haloarchées dans les aliments salés (Charlesworth et Burns., 2016 ; Besse et *al.*, 2015).

► Les Caroténoïdes

Une quantité importante de pigments caroténoïdes est produite par la classe des haloarchaea. En biotechnologie, La santé humaine bénéficie grandement de ces pigments en tant qu'antioxydants également en industries agroalimentaires les caroténoïdes peuvent être utilisés comme des additifs alimentaires et des colorants (Rodrigo-Baños et *al.*, 2015 ; De la Vega et *al.*, 2016).

I.5 Les Caroténoïdes

La famille des tétraterpénoïdes, qui est l'une des plus grandes familles de pigments naturels, comprend des molécules apolaires hydrophobes liposolubles appelées caroténoïdes. Tous les organismes photosynthétiques et certains non photosynthétiques, tels que les champignons, les archées et les bactéries, présentent un métabolisme caroténogène complexe, les synthétisent naturellement. Ayant des couleurs différentes, ces molécules sont le deuxième pigment naturel le plus répandu dans la nature et peuvent aller du rouge pur au rouge vif en passant par le jaune- orange intense (Grivard et *al.* 2022). Bien que les animaux ne puissent pas produire de caroténoïdes, ils les reçoivent de leur alimentation. Approximativement 1178 caroténoïdes ont été identifiés et classés en fonction de leurs structures distinctes (Calegari-Santos et *al.*, 2016 ; Fernandes et *al.*, 2018). Pendant la photosynthèse, ils sont cruciaux pour la récupération et le transfert d'énergie. Et, en tant que provitamine A,

contribue également à la santé humaine. (Montero-Lobato et *al.*, 2018).

I.5.1 Les Caroténoïdes produits par les Archaea halophiles extrêmes

I.5.1.1 Les Types et structures des caroténoïdes

La bibliographie sur les caroténoïdes des micro-organismes extrêmophiles est rare si on la compare à toutes les informations disponibles sur les caroténoïdes des organismes non extrêmophiles. Il a été démontré que les caroténoïdes C50 tels que la bactériorubérine (qui est généralement le principal caroténoïde des archées halophiles) et ses précurseurs (2-isopentenyl-3,4 dehydrorhodopin (IDR), bis- anhydrobactériorubérine (BABR), et monoanhydrobactériorubérine (MABR) sont synthétisés par la plupart des membres du groupe des *haloarchaea* (Giani et *al.*, 2019). Dans le cas des caroténoïdes, les isoprénoïdes lipophiles sont principalement constitués d'un squelette hydrocarboné en C 40. (C'est à dire qu'ils contiennent 40 atomes de carbone dans huit résidus isoprène), souvent modifiés par divers groupes fonctionnels contenant de l'oxygène pour produire des xanthophylles cycliques ou acyclique. Par conséquent, les caractéristiques chimiques communes de tous les caroténoïdes comprennent une longue chaîne conjuguée de double liaison et une symétrie quasi bilatérale autour de la double liaison centrale (Rao AV et *al.*, 2007). Cette chaîne peut être terminée par des groupes cycliques (anneaux) et peut être complétée par des groupes contenant de l'oxygène comme groupes fonctionnels (Del Campo et *al.*, 2007).

I.5.1.2 La biosynthèse

Les connaissances sur les voies de biosynthèse et les enzymes impliquées dans les haloarchées, ainsi que sur la spécificité de la caroténogenèse, sa régulation et ses voies métaboliques, sont limitées (Giani et *al.*, 2019). Les premières étapes sont communes à tous les organismes produisant des caroténoïdes, les haloarchaea utilisent la voie du mévalonate qui commence par :

- La formation de l'acide mévalonique à partir de l'acétyl-CoA.
- La décarboxylation et la phosphorylation de l'acide mévalonique conduisent à la

formation de l'isopentényldiphosphate (IPP).

- Ensuite, l'IPP est isomérisé et transformé en diméthyl-allyle pyrophosphate.
- L'ajout des molécules d'isopentényle pyrophosphate par réactions de désaturation donne géranyle pyrophosphate (GPP) (10 carbones), le farnésyle pyrophosphate (FPP) (15 carbones) et le géranyl- géranyldiphosphate (GGPP) (20 carbones).
- La condensation de deux molécules de GGPP donne le phytoène (40 carbone).
- La phytoènedésaturase transforme le phytoène en lycopène.(Falb et *al.*, 2008;Rodrigo-Baños et *al.*, 2015 ; Yang et *al.*, 2015 ; Calegari-Santos et *al.*, 2016)
- Les étapes de la caroténogénèse tardive, où le lycopène est converti en bactériorubérine n'a pas été étudiée en détail. Selon les premiers rapports, la bactériorubérine a été créée en ajoutant des unités d'isoprène C5 à chaque extrémité de la chaîne de lycopène, puis en ajoutant des groupes hydroxyles (Falb et *al.*,2008).

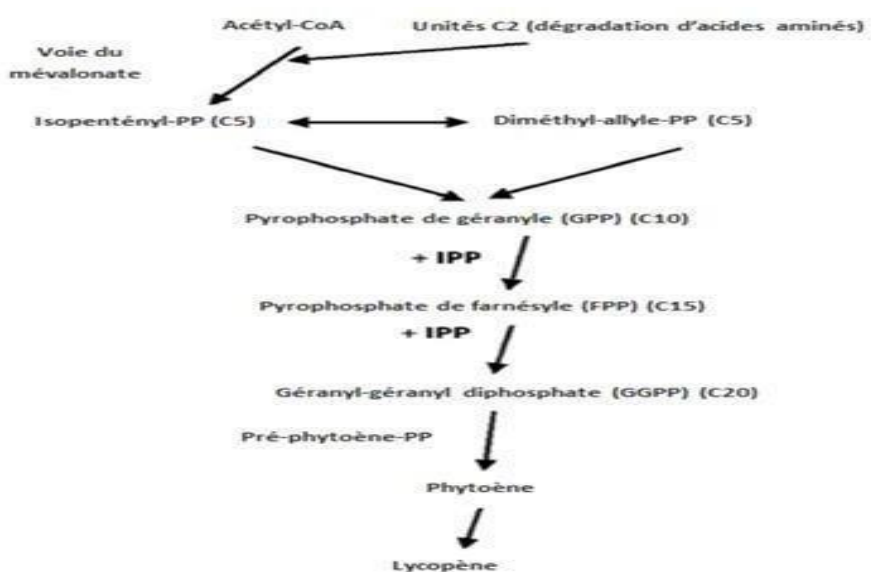


Figure 3. Premières étapes de la biosynthèse des caroténoïdes C50 chez les haloarchaea (Rodrigo Baños et *al.*, 2015).

I.5.1.3 Les Fonctions biologiques

La bactériurubérine, un antioxydant capable de piéger les espèces réactives à l'oxygène (ROS), protège les cellules contre le stress oxydatif en piégeant les radicaux libre créés par

l'exposition aux rayons UV. Grâce à la présence de groupes hydroxyles dans leurs structures, la bactériorubérine augmente la rigidité de la membrane en agissant comme des rivets intercellulaires. Il agit comme une barrière à l'eau et permet à l'oxygène et à d'autres molécules de passer, permettant aux souches de survivre dans des conditions hypersalines. (Fang et *al.*, 2010 ; Torregrosa-Crespo et *al.*, 2018 ; Abbes et *al.*, 2013). Les caroténoïdes C50 agissent principalement comme des antioxydants dans le corps humain, ce qui les rend capables de protéger les cellules contre les dommages causés par les radicaux libres, ce qui contribue à la prévention de certaines maladies dégénératives. Des études suggèrent que la bactériorubérine pourrait offrir une capacité antioxydante supérieure à celle du β -carotène en raison du nombre de doubles liaisons conjuguées dans leur structure. Par exemple, la bactériorubérine en compte 13 tandis que le β -carotène en compte 11 (Mandelli et *al.*, 2012 ; Yang et *al.*, 2015 ; Squillaci et *al.*, 2017). De plus, certaines recherches suggèrent que ces caroténoïdes pourraient également posséder des propriétés anticancéreuses, antihémolytiques et antitumorales (Abbes et *al.*, 2013 ; Hou et Cui, 2017).

I.5.1.4 La bactériorubérine

Le caroténoïde majeur synthétisé par les haloarchaea est la bactériorubérine est le principal caroténoïde qui rend les archées de la famille *Halobacteriaceae* rouge, dont la structure est assez différente des autres caroténoïdes. C'est un composé tétra-hydroxylé à 50 atomes de carbone qui se compose d'une chaîne isoprénoïde avec une série de treize liaisons doubles conjuguées ($C=C$). Les isomères trans et cis peuvent être utilisés pour présenter ce composé et ses dérivés (Calegari-Santos et *al.*, 2016). Ce pigment facilite la photoréactivation et protège les cellules contre les fortes intensités de lumière dans la gamme visible et ultraviolette du spectre. Il est également impliqué dans le renforcement de la membrane cellulaire. Il a été décrit pour la première fois dans des cellules de l'espèce *Halobacterium*. (Rodrigo-Baños et *al.*, 2015).

I.5. 2. La Caractérisation des caroténoïdes produits par les haloarchaea

I.5. 2. 1 L'Extraction

Les caroténoïdes des haloarchées se trouvent à l'intérieur de la cellule, au niveau de la

membrane cellulaire, ce qui implique qu'ils doivent être extraits en brisant la paroi cellulaire. Plusieurs méthodes, tant chimiques que physiques, sont décrites dans la littérature pour cette extraction. Cependant, l'extraction par solvant organique est la plus utilisée en raison de la sensibilité de la paroi cellulaire de ces micro-organismes aux solvants. Cette méthode repose sur l'abaissement de la concentration en sel pour induire la lyse cellulaire (Oren, 2002). Elle repose sur le principe de diffusion du solvant à travers la matrice, permettant de solubiliser les caroténoïdes tout en précipitant les protéines membranaires et les lipides (Strati et Oreopoulou, 2014). Les solvants choisis pour cette extraction doivent avoir un point d'ébullition bas pour minimiser la température d'extraction et être adaptés à la polarité des caroténoïdes (Machmudah et Goto, 2013). Les solvants organiques les plus couramment utilisés sont le méthanol, l'acétone et l'hexane (Squillaci et *al.*, 2017).

I.5. 2. 2 La Production des caroténoïdes par les haloarchaea

La production de caroténoïdes par les haloarchaea présente un certain nombre d'avantages. Tout d'abord, la tolérance de ces micro-organismes à des concentrations élevées de sel limite la contamination par d'autres micro-organismes, ce qui leur permet de travailler dans des conditions non stériles. Cela facilite la culture à grande échelle et réduit les coûts de production. De plus, le processus d'extraction des caroténoïdes est simple, rapide et économique. La lyse cellulaire est induite par de l'eau distillée sans nécessiter de traitement mécanique, contrairement à d'autres organismes. De plus, les haloarchaea présentent un taux de production de caroténoïdes supérieur à celui observé chez de nombreuses microalgues. Enfin, cette production peut être améliorée ou accélérée par des techniques de modification génétique ou en ajustant les conditions de culture. Les archées halophiles extrêmes ont été les premiers organismes pour lesquels la transformation génétique avec de l'ADN étranger est devenue courante, et diverses méthodes de manipulation génétique ont été développées pour elles (Rodrigo-Baños et al., 2015 ; Torregrosa-Crespo et al., 2018 ; Giani et al., 2019). Parmi les facteurs qui ont été signalés comme influençant l'accumulation de caroténoïdes dans les archées halophiles, le pH, la température, la concentration en oxygène, l'irradiance lumineuse et la concentration en sel (Asker et *al.*,

2002 ; Fang et *al.*, 2010). Mais au-delà de l'influence des paramètres mentionnés sur le taux d'accumulation des caroténoïdes, la première condition requise pour rendre le processus économiquement faisable est d'atteindre des productivités de biomasse élevées dans les cultures d'haloarchées. Les quelques données disponibles sur la productivité de la biomasse des cultures d'haloarchées ont été obtenues à l'échelle du laboratoire et suggèrent des valeurs de productivité de la biomasse d'environ 0,08 g L d⁻¹ (Rodrigo-Baños et *al.*, 2015). Ces valeurs sont faibles si on les compare à celles obtenues dans les cultures de microalgues. En principe, cela peut être un inconvénient pour la production à grande échelle de caroténoïdes par les espèces *haloarchaeales*. Cependant, loin d'être considérée comme un obstacle infranchissable, la production efficace et massive de biomasse haloarchéenne doit être considérée comme un défi. À cet égard, des efforts pourraient être déployés pour optimiser la composition du milieu de culture et le système de réacteur qui permettent d'atteindre des productivités de biomasse plus élevées à grande échelle.

I.5. 3. L'Intérêt biotechnologique des caroténoïdes des haloarchaea

Les caroténoïdes dérivés d'archées halophiles suscitent un vif intérêt dans le domaine de la biotechnologie et présentent de multiples applications potentielles. Malgré cela, ils demeurent largement sous-recherchés, et jusqu'à présent, aucune utilisation à grande échelle n'a été concrétisée (Torregrosa-Crespo et *al.*, 2016 ; Giani et *al.*, 2019).

I.5. 3. 1 En industrie agroalimentaire

En réponse aux évolutions des habitudes de consommation, l'industrie agroalimentaire cherche à substituer entièrement les composés synthétiques par des alternatives naturelles, notamment dans le domaine des colorants largement utilisés dans les conserves, les confiseries et les boissons. Ces colorants synthétiques sont bien connus pour leurs effets néfastes sur la santé et l'environnement. Les caroténoïdes produits par les *Haloarchaea* représentent ainsi une alternative viable pour la coloration des aliments, réduisant ainsi la dépendance aux colorants artificiels (Rodrigo-Baños et *al.*, 2015 ; Wang et *al.*, 2019). Leur forte activité antioxydante en fait des candidats intéressants comme additifs alimentaires, protégeant les aliments contre l'oxydation et contribuant à la prévention de diverses

maladies, notamment les maladies cardiovasculaires, certains cancers et les affections oculaires liées au vieillissement (Vilchez et *al.*, 2011 ; De la Vega et *al.*, 2016). Des recherches ont montré que les caroténoïdes C50 possèdent un potentiel antioxydant supérieur à celui de nombreux antioxydants couramment utilisés (Hou et Cui, 2017 ; Squillaci et *al.*, 2018). De plus, ces composés peuvent être utilisés comme suppléments alimentaires pour l'alimentation animale, comme les volailles et les crustacés (Giani et *al.*, 2019).

I.5. 3. 2 La Contribution potentielle à la santé

Dans le domaine médical, les caroténoïdes C50 ont des applications diverses. Ils peuvent servir à prévenir les maladies cardiaques ou à stimuler la production d'anticorps, comme mentionné par Rodrigo Baños et ses collègues en 2015. Leur potentiel anti-tumoral a également été étudié. Par exemple, Abbes et *al.* (2013) ont observé une diminution de la viabilité des cellules d'hépatocarcinome humain HepG2 exposées à des concentrations sublétales de caroténoïdes produits par *Halobacterium halobium*. Des travaux ultérieurs menés par Hou et Cui en 2017 ont révélé un effet antiprolifératif dose-dépendant de caroténoïdes extraits de *Haloplanus vescus* et de *Halogeometricum limi* sur ces cellules cancéreuses. De plus, ces caroténoïdes présentent une activité anti-hémolytique et pourraient donc être envisagés dans le traitement de l'anémie hémolytique. Récemment, une recherche conduite par Hegazy et ses collègues en 2020 a révélé que les caroténoïdes produits par la souche *Natrialba sp. M6* possèdent une activité cytotoxique significative sur quatre lignées de cellules cancéreuses courantes chez l'humain, sans causer de toxicité sur la lignée cellulaire humaine WI-38. Ces lignées incluent les cellules Caco-2 (cancer du côlon), MCF-7 (cancer du sein), HepG-2 (cancer hépatique) et HeLa (carcinome épithéloïde du col de l'utérus). De plus, ces caroténoïdes ont démontré une activité antivirale contre les virus de l'hépatite B et C en inhibant leurs polymérases, suggérant leur potentiel en tant qu'agents antiviraux.

Des expériences visant à explorer l'utilisation des caroténoïdes C50 en tant qu'agents protecteurs sont en cours pour atténuer les lésions cutanées provoquées par la radiothérapie (Kuchina, 2018).

I.5. 3. 3 En cosmétologie

Dans le domaine de la cosmétologie, une recherche récente suggère d'intégrer l'all-trans-

bacteriorubérine en tant que filtre UV dans les crèmes solaires. Cette étude a démontré que ce caroténoïde ne provoque aucune réaction de phototoxicité ou de photoallergie (Silva et *al.*, 2019).

I.5. 3. 4 La Production de sel

Les pigments de caroténoïdes ont un rôle aussi dans la production de sel ils absorbent l'énergie lumineuse, et soulèvent de ce fait la température de l'eau, en menant à des taux accrus d'évaporation. Des études réalisées ont montré l'implication des archées halophiles dans la cristallisation de l'halite (Davis et Giordano, 1996).

Le β -carotène et l'astaxanthine sont actuellement les principaux caroténoïdes utilisés dans l'industrie alimentaire, pharmaceutique et cosmétique (Farkas et *al.*, 2020).

I.6. L'Optimisation de production de caroténoïdes par les plans d'expériences

L'optimisation est une étape très importante pour mieux comprendre les phénomènes biologiques comme la fermentation alcoolique et les effets des paramètres opératoires ainsi que les composants de milieu de culture (Beigbeder et *al.*, 2021). En général, il existe deux types d'optimisation ; L'optimisation classique et l'optimisation statistique avec des plans d'expériences. La première méthode est basée sur la variation successive d'un seul paramètre en maintenant les autres constants. Cette approche est facile et simple mais prend du temps, incapable de détecter l'optimum réel et d'étudier les interactions entre les paramètres et est coûteuse, surtout pour mener un grand nombre d'expériences (Beigbeder et *al.*, 2021). Par contre, la seconde méthode est plus précise et plus pratique, elle est réalisée à l'aide de méthodes statistiques qui permettent de mesurer les effets des paramètres testés ainsi que leurs interactions (Boudjema, 2016 ; Keskin Gündoğdu et *al.*, 2016).

I.6.1. La Définition d'un plan d'expérience

Le terme «plan d'expériences» vient de l'anglais « Design experiments » qui se traduit par «conception des expériences» (Arbia, 2014). En effet, le plan d'expérience représente une méthode qui permet de quantifier et de hiérarchiser les effets de divers facteurs sur une réponse dans des domaines expérimentaux bien définis dans le but de les optimiser, et cela avec un nombre d'essais relativement restreint, minimisant ainsi le temps et les coûts

associés (Fadil et *al.*, 2015). Ces derniers organisent au mieux les essais à des fins scientifiques ou industrielles (Sahu et Andhare, 2018).

I.6.2. Les éléments d'un plan d'expérience

Un plan d'expérience comprend les éléments suivants ;

I.6. 2.1. La Réponse

Également connue sous le nom de grandeur d'intérêt, est une manifestation souvent mesurable à chaque expérience définie par le plan d'expérience, que l'on observe lorsque l'on fait varier les facteurs étudiés. Elle dépend donc d'un ou de plusieurs facteurs (Chibi, 2020).Chapitre 1 Synthèse bibliographique

I.6.2.2. Les Facteurs

Les facteurs sont des variables ou des états définis qui influencent le phénomène étudié. Ils peuvent être quantitatifs ou qualitatifs, continus ou discontinus, contrôlables ou non contrôlables (Tinsson, 2010). La valeur attribuée à un facteur pour effectuer un essai est dénommée le niveau. Lorsqu'on examine l'influence d'un facteur, on tend à limiter ses variations entre deux bornes. La borne inférieure est définie comme le niveau bas, noté (-1), et la borne supérieure est désignée comme le niveau haut, noté (+1) (Arbia, 2014 ; Chibi, 2020).

I.6.2.3. Le Domaine d'étude

Le domaine d'un facteur est constitué de toutes les valeurs que ce facteur peut prendre entre le niveau haut et le niveau bas (Goupy, 2001). La combinaison des domaines de tous les facteurs définit le domaine d'étude, représentant ainsi la zone expérimentale délimitée par les niveaux hauts et bas de ces facteurs (Chibi, 2020).

I.6.2.4. Les Cordonnées centrées réduites

En présence de grandeurs présentant des étendues variées ou exprimées dans des unités différentes, il peut être complexe d'établir des comparaisons significatives à la fois entre les individus et entre les variables (Arbia, 2014). L'attribution de la valeur (+1) au niveau haut

du facteur et (-1) au niveau bas permet d'effectuer un changement d'unité de mesure et d'origine, assurant ainsi un traitement uniforme de tous les facteurs. Ces variables sont alors qualifiées de centrées réduites ou codées (Goupy, 2001). Aucune variable ne peut donc en dominer une autre à cause de ces valeurs numériques. En effet, le passage des variables réelles aux variables centrées réduites X est traduit par la formule citée par Ruotolo et *al* (2005) :

$$x = \frac{x - x_0}{\Delta x}$$

Où

x : est la variable courante

x_0 : est la variable centrée réduite

$\bar{x}$: est valeur moyenne des variables courantes

Δx : «Pas » est la variation entre la position moyenne de la variable et une extrémité du domaine.

I.6. 2.5. La Surface de réponse

Chaque point dans le domaine d'étude représente une réponse spécifique. L'ensemble de tous les points du domaine d'étude forme un ensemble de réponses situées sur une surface appelée la surface de réponse. À partir de cette surface, il est possible de tracer les courbes d'isoreponses en les projetant sur le domaine expérimental (Akretche, 2015).

I.6.3. Les principaux avantages des plans d'expériences

Les principaux avantages de cette méthode sont (Ferreira et *al.*, 2007) :

- Minimiser le nombre d'expériences
- Modélisation des réponses étudiées
- Réduire les produits chimiques et les matériaux
- Possibilité d'étudier un grand nombre de facteurs
- Précision optimale des résultats
- Capacité de prendre en compte les interactions entre facteurs

La méthode des plans d'expériences simplifie l'interprétation en fournissant un modèle expérimental clair du système étudié, ce qui permet une analyse rapide et précise (Chibi, 2020).

I.6.4. Les Différents types de plans d'expériences

Les plans d'expériences peuvent être divisés en deux catégories selon l'objectif visé par l'expérimentateur : les plans d'optimisation et les plans de criblage (Hancu et *al.*, 2021).

I.6. 4.1. Les plans de criblage

Appelés aussi les plans de screening, se sont des plans expérimentaux utilisés au stade initial de l'expérimentation qui aident à identifier les facteurs influents sur la réponse observée parmi un grand nombre de facteurs (Nguyen et *al.*, 2022). À cet égard, les conceptions de criblage sont très bénéfiques car elles étudient un grand nombre de facteurs avec peu d'essais et produisent un ajustement de modèle linéaire pour fournir des résultats sur la base de l'effet principal des facteurs (Beg, 2021). Les modèles mathématiques des plans de criblage sont des polynômes d'ordre 1 pouvant prendre en compte les interactions de deux facteurs. Certains des plans de criblage couramment utilisés comprennent le plan Plackett-Burman et le plan Taguchi, qui sont très économiques en termes de temps et de ressources (Beg, 2021).

- Les plans de Plackett-Burman

En 1946, Plackett et Burman ont publié leur étude dans la revue *Biometrika*, détaillant la construction des plans permettant d'explorer un grand nombre de facteurs avec un nombre réduit d'essais (Beg, 2021). Dans un plan Plackett-Burman, un minimum de 2 et un maximum de 47 facteurs peuvent être utilisés, et des niveaux sont attribués à chaque facteur et on suppose que toutes les interactions entre les facteurs sont négligeables devant les effets principaux (Beg, 2021). Les expériences dans cette conception sont réalisées avec diverses combinaisons de valeurs élevées et faibles de variables de processus et analysées pour déterminer leur effet sur le processus. Le plan Plackett-Burman analyse les données d'entrée et présente un classement des variables avec l'ampleur de l'effet et désigne des signes pour les effets afin d'indiquer si une augmentation

des valeurs des facteurs est avantageuse ou non (Jain et *al.*, 2010). Ce plan est basé sur la matrice d'Hadamard qui possède les propriétés suivantes :

- 1) les éléments sont +1, -1 ;
- 2) les matrices sont carrées et comportent un nombre de ligne (ou de colonne) égale à 2 ou un multiple de 4.
- 3) ces matrices sont orthogonales, c'est-à-dire que le produit scalaire de deux lignes (ou colonne) est à égale à zéro ;

- Les plans de Taguchi

Les « méthodes Taguchi » sont des outils statistiques simples qui font appel à des plans tabulés appelés « tableaux » qui permettent d'estimer un nombre maximum d'effets principaux dans une manière impartiale ou « orthogonale » pendant un nombre minimum d'exécutions expérimentales au lieu de tester toutes les combinaisons possibles (Chandrasekar et *al.*, 2015). Les tableaux de Taguchi sont des plans factoriels fractionnés (matrices de Hadamard) dans lesquels les niveaux des facteurs sont 1 pour le niveau bas, et 2 pour le niveau haut. Ils sont appliqués pour prédire la contribution significative des variables

de conception ainsi que la combinaison optimale de chaque variable (Barua et *al.*, 2018). A l'origine ces plans étaient utilisés avec un modèle sans interaction. Aujourd'hui, plusieurs chercheurs appliquent les résultats et les principes de la théorie classique qui tiennent compte des interactions entre facteurs. La méthodologie Taguchi est employée dans certains processus biologiques et biotechnologiques tels que les fermentations microbiennes, la transformation des aliments, la biologie moléculaire, la bioremédiation, le traitement des eaux usées et les médicaments (Barua et *al.*, 2018). Tekade et *al* (2014) ont exploité cette approche pour formuler une thérapie ciblée contre le cancer. Aussi, ces plans sont pratiqués dans le domaine de la qualité et en génie industriel pour le criblage des facteurs (Chen et *al.*, 2021).

I.6.4.2. Les plans d'optimisation

L'un des modèles expérimentaux les plus couramment utilisés pour l'optimisation est la méthodologie des surfaces de réponse (MSR) (Brahmah et *al.*, 2016). La méthode des

surfaces de réponse est une approche mathématique et statistique fréquemment employée pour modéliser et analyser un processus où la réponse recherchée est influencée par différentes variables. L'objectif principal de cette méthode est d'optimiser la réponse et de mettre en lumière les interactions entre les variables expérimentales, aspects souvent négligés par d'autres techniques (Montgomery, 2002). On peut commencer par un plan de criblage et poursuivre l'expérimentation par un plan d'optimisation. On aboutit alors à un plan composite interprétable à l'aide d'un modèle du deuxième degré (Bouzaouit, 2016). Les plans des surfaces de réponses sont des modèles factoriels du second degré, c'est-à-dire ils nécessitent trois niveaux pour tous les facteurs impliqués. Ils n'utilisent que les facteurs précédemment jugés influents (Aydar, 2018). La MSR est largement employée dans le domaine de la fabrication et de l'ingénierie où de nombreux paramètres y sont impliqués. Parmi les divers plans d'optimisation mis au point, les plus utilisés sont : les plans composites centrés et les plans de box behnken (Czyrski et Jarzębski, 2020).

- Les plans de Box-Behnken

Box et Behnken ont introduit un type différent de plans d'expériences, permettant d'établir directement des modèles du second degré et d'estimer certaines interactions. (Box et Behnken, 1960 ; Nguyen et *al.*, 2022). Tous les facteurs ont trois niveaux : -1, 0 et +1. La conception Box-Behnken (BBD) est un plan de second ordre, utilisant un plan factoriel fractionnaire à trois niveaux (Ferreira et *al.*, 2007). Il présente de nombreux avantages, notamment l'utilisation de blocs, l'absence de détection d'ajustement du modèle, la possibilité de créer des conceptions séquentielles et l'estimation des paramètres du modèle quadratique (Nguyen et *al.*, 2022). L'avantage le plus important par rapport aux autres modèles est qu'il évite de réaliser des expériences dans des conditions extrêmes, comme l'utilisation simultanée des niveaux les plus élevés ou les plus bas de tous les facteurs, ce qui pourrait être coûteux ou impossible à tester (Ahmad et *al.*, 2015). Le (BBD) a été largement utilisée dans les secteurs pharmaceutiques, des bioprocédés, de l'ingénierie alimentaire, de l'agrochimie et d'autres industries pour l'optimisation des facteurs (Ahmad et *al.*, 2015).

- Les plans composites centrés

Une fois les paramètres significatifs identifiés par un modèle de criblage, l'objectif se concentre sur l'optimisation des processus et des produits en tenant compte des facteurs d'influence sélectionnés par les plans de surface de réponse. Le plan composite centré (CCD) est le plan factoriel fractionnaire le plus couramment utilisé dans le modèle de surface de réponse (Bhattacharya, 2021). Ce plan se révèle très adaptable et efficace pour élaborer des modèles du deuxième ordre. Il est capable d'estimer tous les effets linéaires, les interactions linéaires, ainsi que les termes quadratiques sélectionnés, en incluant également l'erreur expérimentale. L'analyse des interactions entre les variables et l'efficacité, tout en minimisant le nombre d'essais confère au CCD un statut unique en tant que modèle privilégié, largement employé pour l'optimisation de divers processus. Le CCD est choisi pour identifier les valeurs optimales des variables significatives en vue d'obtenir une réponse maximale (Boudjema, 2016). Le plus grand avantage de ce plan d'optimisation est qu'il est plus précis et qu'il n'est pas nécessaire d'effectuer une expérience factorielle à trois niveaux pour construire un modèle quadratique du second ordre (Granato et *al.*, 2014).

Selon Mourabet et *al* (2017), un CCD comporte trois groupes de points de conception:

- points de plan factoriel ou fractionnaire à deux niveaux (+1,-1), habituellement fractionné à partir de k facteur, ce qui forme un plan factoriel complet $2k$
- .- $2k$ points axiaux (parfois appelés points en étoile) avec des niveaux $(+\alpha)$ et $(-\alpha)$, la valeur du α est en fonction du nombre de facteurs k .
- points centraux (niveau 0) qui représentent des termes répliqués ; les points centraux fournissent une estimation bonne et indépendante de l'erreur expérimentale.

Compte tenu de ces points, le nombre d'expériences conçues par CCD sera

$$N = 2k + 2k + n$$

Où N est le nombre total d'expériences, K est le nombre de facteurs étudiés et n est le nombre de points centraux.

En outre, ce plan utilise des modèles polynomiaux de second degré (Bayuo et *al.*, 2019b).

Matériel et méthodes

II. Matériels et méthodes

Notre travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Biotechnologie Microbienne et le Laboratoire de Bioinformatique, Microbiologie Appliquée et Biomolécules (BMAB) au niveau de l'Université M'Hamed Bougara Boumerdes (U.M.B.B) et l'Institut Pasteur de ruisseau annexe El Hamma. Nous avons tracé comme objectif production de caroténoïdes par les archées halophiles dans diverses conditions de culture et évaluations de leurs activités antioxydantes et antibactériennes.

II.1 Matériels

II.1.1 Matériels biologique

Souches bactériennes appelées MD15 et KH12 utilisées durant cette étude sont des souches halophiles extrêmes isolées à partir de sebkhas algériennes par l'unité de recherche « MétaGénomique et BioMathématique » (MGBM) au sein du laboratoire de Bioinformatique, Microbiologie Appliquée et Biomolécules (BMAB) de la faculté des sciences. Elles ont été identifiées comme étant des archaeobactéries. La conservation de ces souches a été faite à 4°C dans un milieu liquide spécifique SH standard, additionné de 20% de NaCl.

Souches bactériennes et fongique testées : Afin de donner une vision large sur l'étendue du champ d'activité antibactérienne et antifongique de nos souches halophiles, une variété de bactéries, levure et champignons a été sélectionnée dont sept pathogènes pour l'être humain et deux phytopathogènes (tableau 1). Les souches fongiques nous ont été fournies par le laboratoire VALCORE de l'Université M'Hamed Bougara Boumerdes (U.M.B.B) et les bactéries pathogènes pour l'être humain par l'Institut Pasteur.

II.1.2 Matériels non biologiques

Pour mener cette étude, nous avons employé une série d'équipements, d'instruments, de verrerie, de réactifs et de produits chimiques d'une pureté optimale. De plus, certains milieux de culture utilisés ont été stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 15 minutes, et leur pH a été ajusté avant la stérilisation. La composition détaillée des milieux de culture est répertoriée dans l'Annexe 1.

Tableau 1. Souches bactériennes et fongique testées

Souche	Référence
Souches bactériennes	
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Streptococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Klebsiella pneumonia</i>	ATCC 13883
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028
Souches fongiques	
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
<i>Alternaria</i>	-
<i>Verticillium</i>	-

II.2 Méthodes

II.2.1 La Revivification des souches archéennes

Cette opération se fait dans des Erlenmeyers de 100 ml préalablement autoclavés à 120°C pendant 20 min, remplis de 50 ml de milieu de culture SH standard liquide etensemencés à partir de tube de conservation. L'incubation s'est faite à une température de 40°C sous une agitation de 120 rpm dans un incubateur agitateur, pendant 15 jours. Après incubation et apparition de la pigmentation rose rouge des moûts de fermentation (caractéristiques des souches halophiles étudiées), nous avons procédé à l'ensemencement des bactéries revivifiées sur des boîtes de Pétri contenant le milieu SH standard solide. Les boîtesensemencées et étiquetées, ont été mises dans des sacs en plastiques afin de réduire la dessiccation précoce du milieu, puis déposées à l'étuve à 40°C pendant 7 jours (Kebbouche Gana et *al.*, 2009).

II.2.2 La Vérification de la pureté de la souche

Après incubation à 40°C pendant 7 jours, les boîtes de Pétri ont été retirées de l'étuve et soumises à deux types d'observations (macro et microscopique) afin de vérifier la pureté des

souches halophiles extrêmes, selon les recommandations de « Bergy's Manual of Systematic Bacteriology » :

a) L'Etude macroscopique Elle porte sur la description des colonies obtenues sur le milieu solide en se basant sur les caractères morphologiques. L'observation à l'œil nu est basée sur les éléments d'identifications données par Thomas et *al.*, (1970) :

- La forme des colonies : circulaire, ondulée, filamenteuse.
- La taille des colonies : punctiforme (moins de 1mm de diamètre), non punctiforme (supérieure à 1mm).
- La chromogène : couleur du pigment.
- L'opacité : transparente, translucide ou opaque.
- L'élévation : colonie plate, convexe ou concave.
- L'aspect de la surface : lisse, sèche, rugueuse, brillante ou émoussée.
- La consistance : visqueuse ou non visqueuse.
- L'odeur : présence ou absence, et sa nature.

b) L'Etude microscopique La pureté des souches halophiles extrêmes est vérifiée sous microscope photonique en deux étapes : observation à l'état frais suivi d'une coloration de Gram modifiée.

- **L'Observation microscopique à l'état frais** Cette étape permet de mettre en évidence la forme et la mobilité de l'archée étudiée. On dépose entre lame et lamelle une goutte de la suspension archéenne à l'aide d'une pipette Pasteur, et on observe au microscope photonique au grossissement x40.
- **La Coloration de Gram modifiée** Décrite par Dussault (1955), cette technique permet de mettre en évidence le type de Gram de l'archaebactérie étudiée. La coloration de Gram modifiée se déroule en deux étapes :

✓ **La Préparation du frottis** On dépose au centre d'une lame 2 à 3 gouttes de la suspension archaebactérienne étudiée. Puis, on les étale à l'aide d'une pipette Pasteur

stérile de façon à réaliser un étalement mince et homogène. Le frottis est ensuite séché et fixé par des passages rapides sur la flamme bleue du bec Bunsen.

✓ **La Coloration du frottis** le frottis est traité avec de l'acide acétique à 2% pendant 5 min, suivi d'une coloration au cristal violet de Gentiane pendant une minute, puis rincé à l'eau et recoloré par la fuchsine pendant une minute et 30 secondes. La lame est rincée par l'eau, séchée au bec Bunsen, puis observée au microscope photonique à immersion au grossissement x100 LEICA DM500.

II.2 .3 L'Étude des caractères biochimiques des isolats

Les caractères biochimiques des différentes souches ont été évalués à l'aide d'une galerie Api 20^E et de leur sensibilité aux antibiotiques.

➤ **La galerie API 20^E**

La galerie API 20^E est constituée de 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les échantillons sont ensemencés avec une suspension archéenne qui réhydrate ces substrats. Les réactions qui se produisent pendant l'incubation se manifestent par des changements de couleur spontanés ou après l'ajout de réactifs. Les résultats sont ensuite interprétés en utilisant un tableau de lecture.

➤ **La Sensibilité aux antibiotiques**

Cette étude est menée en utilisant la méthode de diffusion des disques d'antibiotiques sur un milieu solide SH préparé à une salinité optimale spécifique pour chaque souche. Les géloses sont ensemencées à l'aide d'un écouvillon en réalisant des stries serrées en trois cadrons, à partir d'une suspension archéenne préparée dans une solution saline stérile à 23 % (p/v). Ensuite, les disques d'antibiotiques sont placés à la surface des géloses avec une pince stérile. On considère qu'une souche est sensible si la zone d'inhibition dépasse au moins 2 mm autour du disque après 10 jours d'incubation à la température optimale (Montalvo-Rodriguez et *al.*, 1998). Les antibiotiques examinés incluent : la pénicilline(10ug), le chloramphénicol (30 µg), la vancomycine (5 µg), la gentamicine (10 µg), l'acide nalidixique (30 µg), l'érythromycine (2 µg), la cefoxitine (30 µg), la ciprofloxacine (5ug), la triméthoprim sulfaméthoxazole (25ug), ceferime (30 ug), Bacitracine (130 ug), tetracycline (30 ug), kanamycine (30 ug), streptomycine (10 ug), ampiciline (10 ug), novobiocine (5 ug).

II.2 .4 La Production du pigment caroténoïde produit par des souches halophiles extrêmes

II.2 .4.1 Suivi de la croissance et de la teneur totale en caroténoïdes

Dans le but d'étudier la croissance et la production du pigment par les souches halophiles extrêmes, des cultures dans le milieu SH sont menées dans des erlenmeyers de 250 mL contenant chacun 50 mL de milieu de culture SH stérile etensemencés avec 10% de la pré-culture des souches MD15 et KH12. L'incubation est effectuée à 40°C et à 120 rpm. La production de la biomasse et du pigment est suivie pendant une durée d'incubation de 3 jours. Des aliquotes journaliers sont prélevés pendant l'incubation pour l'estimation des paramètres suivants :

- ✓ Suivi de la croissance cellulaire (DO 600 nm).
- ✓ Évaluation de la teneur totale en caroténoïdes (mg/mL)

a. Suivi de la croissance cellulaire

Le suivi de la croissance cellulaire a été effectué en mesurant la densité optique cellulaire (DO) chaque jour à une longueur d'onde de 600nm à l'aide d'un spectrophotomètre (UV).

b. L'Évaluation de la teneur totale en caroténoïdes

Les caroténoïdes sont extraits à partir de moût de fermentation de 3jours d'incubation, en suivant le protocole énoncé par Bhakti et al. (2016). 2mL de chaque expérience sont transférés dans un eppendorf puis centrifugés à 10000g pendant 15 min à 4°C, le culot est ré-suspendu dans 2 mL du mélange chloroforme et méthanol (2V chloroforme et 1V de méthanol). La suspension est soumise à une homogénéisation pendant 5 minutes à l'aide d'un vortex, puis centrifugée à nouveau gardant dans les mêmes conditions cité ci-dessus. Le surnageant a été récupéré et analysés dans une plage de 400 à 800 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible afin de déterminer la longueur d'onde d'absorption maximale.

Afin de prévenir les phénomènes d'isomérisation provoqués par la lumière, les échantillons sont protégés par une feuille d'aluminium durant toutes les étapes (figure 03).

La concentration totale en caroténoïdes a été calculée selon la méthode modifiée de Lobato et al., en prenant en compte l'absorbance à 503 nm, et en utilisant un coefficient d'extinction

ε (1 %) de 2660. La formule utilisée pour le calcul était la suivante :

$$C = A \times 10^4 / 2660$$

A : l'absorbance à la longueur d'onde correspondant au pic principal ($\lambda_{\max}$).

2660 : le coefficient d'absorption spécifique du méthanol (Britton, 1995).

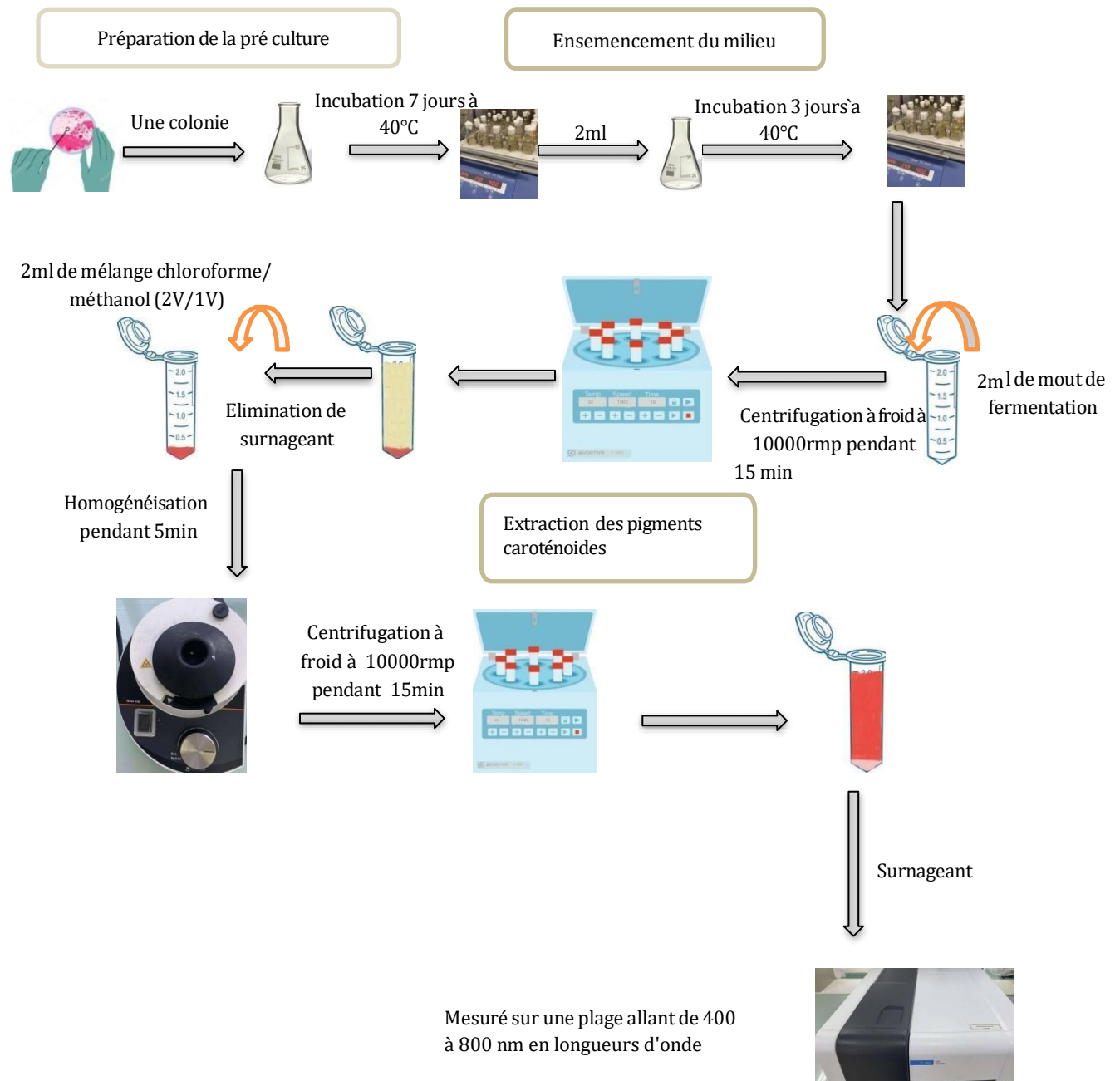


Figure 03. Protocole de quantification des caroténoïdes

II.2 .4.2 L'Optimisation de la production du pigment par plans d'expériences

Dans notre étude, une optimisation statistique est effectuée afin d'accroître la quantité du pigment récupéré en fin de culture (réponse) et d'étudier les paramètres de culture qui affectent cette production (facteurs).

La méthode des plans d'expériences s'avère très utile car, comme cité précédemment, elle se révèle souvent plus efficace que les démarches habituelles de conduite des essais, c'est-à-dire, qu'elle permet d'arriver aux mêmes résultats avec un nombre d'essais moindre tout en assurant à l'expérimentateur plus de fiabilité et de précision sur les résultats attendus (Kimouche, 2008).

Par la méthode de Plackett-Burman, plusieurs facteurs sont criblés en fonction de leur influence sur la réponse. Puis les facteurs sélectionnés, ainsi que leurs interactions, sont étudiés par l'utilisation d'un plan composite centré (CCD) qui permet de prédire la meilleure combinaison possible entre ces derniers facteurs par rapport à des niveaux bien choisis.

a. Le Criblage des paramètres influençant la production du pigment caroténoïde par l'utilisation du plan de Plackett-Burman

Dans l'objectif de cribler les facteurs qui sont potentiellement important pour la production du pigment par les souches halophiles extrêmes, nous avons étudié quatre paramètres indépendants suivant : amidon (X1), extrait de levure (X2), NaCl (X3) et pH (X4). Les facteurs sont étudiés à deux niveaux largement espacés. Un niveau bas (-1) et haut (+1) pour chaque facteur (voir tableau 1). 16 expériences différentes sont menées ; la matrice de conception résultante est répertoriée dans le tableau 2.

Tableau 2. Niveau expérimentaux des quatre facteurs utilisés dans le plan Plackett-Burman.

Code	facteurs	Niveau bas (-1)	Niveau haut (+1)
X1	Amidon (g/L)	0,50	2,00
X2	Extrait de levure (g/L)	0,50	2,00
X3	NaCl (g/L)	100,00	250,00
X4	pH	6,00	9,00

Tableau 3. La matrice expérimentale utilisée pour mettre en place les expériences du plan Plackett-Burman.

Runorder	Niveau de la variable codée			
	X1	X2	X3	X4
1	+1	+1	-1	-1
2	+1	-1	+1	-1
3	+1	+1	+1	+1
4	-1	-1	-1	-1
5	-1	+1	-1	+1
6	+1	-1	-1	+1
7	-1	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1	-1
9	+1	+1	-1	-1
10	+1	-1	+1	-1
11	+1	+1	+1	+1
12	-1	-1	-1	-1
13	-1	+1	-1	+1
14	+1	-1	-1	+1
15	-1	-1	+1	+1
16	+1	+1	+1	-1

b. Optimisation par méthodologie de surface de réponse (RSM) basée sur le plan composite central (CCD).

L'approche « un facteur à la fois » utilisée pour analyser un problème en fonction de trois ou plusieurs paramètres ignore les interactions entre différents facteurs. Pour résoudre ces problèmes, le RSM a été utilisé pour identifier la valeur optimale à appliquer afin de déterminer l'effet principal ainsi que toute interaction significative entre les facteurs susceptibles d'avoir des effets importants sur les variables de réponse. Une approche de conception des points centraux et axiaux (CCD) a été utilisée pour optimiser les conditions de

culture à la fois pour la croissance cellulaire (O.D. à 600 nm) et la teneur totale en caroténoïdes (mg/L) des deux souches MD15 et KH12 halophiles extrêmes. Dans cette étude amidon (X1), extrait de levure (X2), NaCl (X3) et pH (X4) ont été pris en compte pour l'analyse de la CCD. Ils ont été étudiés à cinq niveaux différents codés -2, -1, 0, +1 et +2 afin de déduire les valeurs optimales de croissance et de teneur en caroténoïdes. Le code et les valeurs réelles des variables sont présentés dans le tableau 4.

Le CCD a donné lieu à un total de 30 essais expérimentaux (tableau 5), dont 16 essais pour le plan factoriel, 8 essais pour les points axiaux et 6 essais pour les réplifications des points centraux. Les expériences ont été formulées à l'aide du logiciel Minitab (14.02) qui nous a été fourni par Dr. HACHEMI N., Université de Boumerdes.

Les facteurs non significatifs restants sont laissés dans tous les essais à leur niveau optimal. Les valeurs de la croissance cellulaire (O.D. à 600 nm) et la teneur totale en caroténoïdes (mg/L) obtenues sont évaluées par analyse de variance (Strongin et *al.*, 1978). Les équations et les coefficients de régression (R^2) sont déterminés.

Tableau 4. Niveaux des facteurs choisis pour le plan d'expérience.

Code	Facteurs	Niveau de la variable codée				
		-2	-1	0	1	2
X1	Amidon	-0,25	0,5	1,25	2	2,75
X2	Extrait de levure	-0,25	0,5	1,25	2	2,75
X3	NaCl	25	100	175	250	325
X4	pH	4,5	6	7,5	9	10,5

Tableau 5. Matrice du plan composite central (CCD) pour évaluer la croissance et de la teneur totale en caroténoïdes à différentes concentrations de la source de carbone, source d'azote, pH et niveaux de salinité.

RunOrder	X1	X2	X3	X4
1	-1	+1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1

3	-1	-1	-1	-1
4	+1	-1	+1	+1
5	+1	+1	+1	-1
6	+1	-1	+1	-1
7	+1	+1	-1	+1
8	-1	+1	+1	+1
9	-1	-1	+1	+1
10	+1	+1	+1	+1
11	+1	+1	-1	-1
12	+1	-1	+1	+1
13	-1	-1	-1	+1
14	+1	-1	-1	+1
15	-1	+1	+1	+1
16	-1	+1	-1	+1
17	0	0	+2	0
18	-2	0	0	0
19	0	0	-2	0
20	0	0	0	-2
21	0	+2	0	0
22	+2	0	0	0
23	0	-2	0	0
24	0	0	0	+2
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0
28	0	0	0	0
29	0	0	0	0
30	0	0	0	0

II.2.5 Application biotechnologique du pigment caroténoïdes des souches halophiles extrêmes MD15 et KH12.

a. Évaluation de l'activité antioxydante des caroténoïdes

Les caroténoïdes extraits ont été testés pour leur activité antioxydante en employant trois méthodes : le test de neutralisation du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl), FRAP (ferrique-tripyrityltriazine) et le test de neutralisation du radical cationique ABTS⁺ (2,2'-Azinobis-(3 éthylbenzothiazole-6-sulfonate))

➤ Le test DPPH

Le DPPH, un radical libre avec un électron non apparié sur l'atome d'azote, se caractérise par sa couleur violette et son pic d'absorption maximal à 517 nm. En présence d'antioxydants, ce radical est réduit en une forme non radicale, l'hydrazine, en capturant un atome d'hydrogène. Ce processus entraîne un changement de couleur de la solution, passant du violet au jaune, ce qui indique la capacité d'un composant à neutraliser les radicaux libres. Cette réaction est suivie par spectrophotométrie UV-visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm.

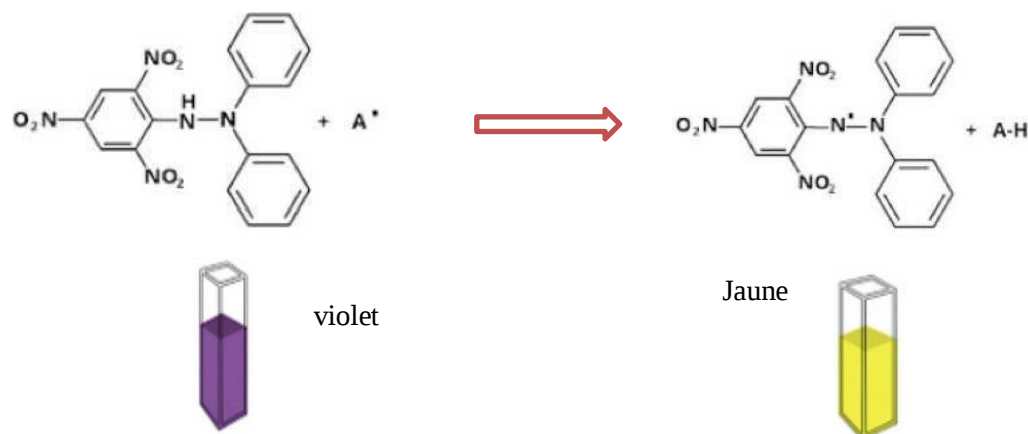


Figure 5. Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH entre l'espèce radicalaire DPPH et un antioxydant.

Avant d'effectuer le test, l'absorbance des extraits est surveillée de manière cinétique à différentes concentrations pour déterminer la concentration optimale pour chaque échantillon.

Un volume de 50ul d'extrait caroténoidique de chaque concentration ont été ajoutés à 1ml de la solution méthanolique DPPH (100uM) préparé récemment (Annexe 3), Après avoir été homogénéisé, le mélange est laissé à l'obscurité pendant 5 minutes à température ambiante, puis l'absorbance est mesurée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Un échantillon de contrôle négatif est préparé dans les mêmes conditions en substituant les extraits organiques par 50 µl du méthanol. En revanche, un contrôle positif est préparé en remplaçant les extraits par de l'acide ascorbique. (Hou et Cui , 2017).

Le pourcentage d'inhibition des radicaux libres DPPH• (I %) est déterminé en appliquant la formule suivante :

$$I \% = [(AC - AE) / AC] \times 100$$

Avec :

A_C = l'absorbance du control négatif

A_E = l'absorbance des extraits

La concentration efficace médiane, ou EC50, est définie comme la concentration du substrat capable de réduire 50 % le DPPH. Les EC50 des échantillons sont déterminées graphiquement à partir des courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition (I %) en fonction de la concentration de chaque extrait.

➤ Réduction de fer

De nombreuses approches sont employées pour évaluer l'activité antioxydante des extraits. La plupart reposent sur des réactions de coloration ou de décoloration d'un réactif dans le milieu de réaction. Dans notre recherche, nous avons opté pour le test FRAP (Feric Reducing Antioxidant Power assay) qui évalue la capacité de réduction des ions ferreux (CRIF).

Le pouvoir de réduction a été évalué selon le protocole décrit par (Parimelazhagan et *al.*, 2016) avec quelques ajustements, pour mesurer la capacité des extraits à convertir le fer ferrique Fe^{3+} en Fer ferreux Fe^{2+} . Ce processus, considéré comme un indicateur de la capacité des antioxydants à céder des électrons, est caractéristique de leur activité antioxydante.

La méthode FRAP repose sur la réduction du fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}) par un antioxydant. Cette réaction se manifeste par un changement de couleur, du jaune du fer ferrique (Fe^{3+}) au bleu-vert du fer ferreux (Fe^{2+}), et son intensité est mesurée à une longueur d'onde de 700 nm par spectrophotométrie.

Pour évaluer le pouvoir réducteur, différentes concentrations des extraits dans 1 ml d'eau distillée sont mélangées avec 2.5 ml de solution tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) (annexe 03) et 2.5 ml de ferricyanure de potassium [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] (1%). Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 20 minutes. Ensuite, 2.5 ml d'acide trichloracétique (10%) sont ajoutés. Le mélange total est centrifugé à 3000 tours par minute pendant 10 minutes. Enfin, 2.5 ml du surnageant de chaque concentration sont mélangés avec 2.5 ml d'eau distillée et 0.5 ml de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (0.1%), puis l'absorbance est mesurée à 700 nm.

Une augmentation de l'absorbance dans le milieu réactionnel est indicative d'une augmentation de la réduction du fer. L'acide ascorbique est employé comme témoin positif dans ce contexte.

➤ Le test ABTS

Ce test repose sur la capacité des antioxydants à réduire le radical cationique ABTS^+ . Ce radical, de couleur verte-bleue, est produit par l'oxydation de la molécule stable d'ABTS avec un agent oxydant fort tel que le persulfate de potassium ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$). L'ajout d'un antioxydant réduit ce radical, entraînant la disparition de la teinte verte-bleue intense. Cette diminution de la coloration est ensuite mesurée en termes d'absorbance à une longueur d'onde de 734 nm (Re et al., 1999).

Ce test est réalisé en suivant le protocole détaillé par Thaipong et ses collègues (2006). La solution d' ABTS^+ est préparée en combinant à parts égales une solution d'ABTS à 7 mM et une solution de persulfate de potassium à 2,45 mM. Ce mélange est maintenu à l'abri de la lumière à température ambiante pendant 12 à 16 heures. Ensuite, 25 μL de chaque concentration des extraits ou de méthanol pour le contrôle négatif et l'acide ascorbique pour le test positif sont ajoutés à 1 mL de la solution d' ABTS^+ . Après une période de 5 minutes dans l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 734 nm.

Le taux d'inhibition des radicaux ABTS⁺ (I %) est déterminé en utilisant la même formule que celle de DPPH. Les valeurs EC50 sont obtenues graphiquement en analysant les courbes de la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de chaque échantillon

b. Évaluation de l'activité antibactérienne des caroténoïdes

L'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits de caroténoïdes est réalisée en suivant la méthode de diffusion par disque décrite par Suresh et ses collègues (2015). Cette approche qualitative permet d'évaluer la sensibilité des souches bactériennes à une substance donnée. Elle implique le dépôt de disques stériles imprégnés d'extraits caroténoïdiques sur la surface d'un milieu de culture solide préalablementensemencé avec un inoculum bactérien. Après incubation, la formation d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne autour des disques indique l'activité antibactérienne des caroténoïdes.

➤ Souches microbiennes testées

Pour offrir une vue exhaustive de l'efficacité antimicrobienne de nos extraits de caroténoïdes, nous avons choisi une gamme de microorganisme, comprenant set pathogènes humains (6 bactéries et une levure) et 2 phytopathogenes citer dans la section matériels biologiques.

➤ Préparation des suspensions bactériennes et ensemencement

Les souches à tester sont transférées sur du milieu Mueller-Hinton. Après une incubation de 18 heures, des suspensions bactériennes sont préparées dans de l'eau physiologique stérile, puis ajustées pour atteindre une densité optique équivalente à 0,5 sur l'échelle de MacFarland. Ces suspensions sont ensuite appliquées sur la surface des milieux de culture solides adaptés à chaque souche, en utilisant un écouvillon.

Des disques de papier Wattman N° 3 de 6 mm de diamètre sont stérilisés, placés sur la surface des boîtes ensemencées, puis imprégnés de 50 µL de l'échantillon à tester. Conservées les boites à 4 °C pendant une heure pour favoriser la diffusion des disques dans le milieu gélosé, puis incubées à 37 °C pendant 24 heures. Après l'incubation, les diamètres des zones d'inhibition formées autour des disques sont mesurés et exprimés en millimètres. Les souches qui expriment des zones d'inhibition sont testée a différent concentration des extraits.

Résultats et discussion

III. Résultats et discussions

III.1 Revivification des souches archées halophiles

Après 15 jours d'incubation des cultures sur milieu SH standard liquide (14% NaCl) à 40°C sous une agitation de 120 rpm, nous avons remarqué un virage de couleur du milieu de culture du jaune clair au rouge et rouge-orangé (figure 6).



Figure 6. Aspects des cultures liquides des deux souches halophiles extrêmes après 15 jours incubation à 40°C à 120 rpm sur milieu SH standard.

Le changement de couleur résulte d'une croissance favorable de ces souches halophiles extrêmes sur ce milieu de culture. La pigmentation orange-rouge est une caractéristique de certaines souches halophiles extrêmes appartenant à la famille des *Halobacteriaceae*, qui est due à la présence de pigments bactériorubérine tels que les caroténoïdes C50 et ses dérivés (Abrevaya, 2012).

III.2 Vérification de la pureté des souches archées halophiles

a) Étude macroscopique

Une observation macroscopique a été effectuée pour les souches archées halophiles MD15 et KH12 après une incubation de 5 jours à 40°C sur milieu SH standard solide (figure 7).

Cette observation nous permet de déduire les caractères macroscopiques résumés dans le tableau 6.

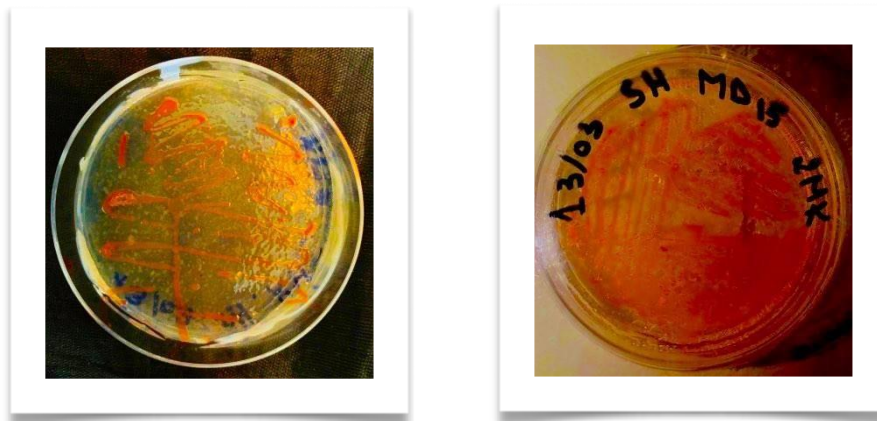


Figure 7. Aspects macroscopiques des souches halophiles extrêmes DM15 et KH12 après 5 jours d'incubation sur milieu SH standard solide à 40°C.

Tableau 6. Caractères macroscopiques des souches halophiles extrêmes étudiées.

Caractères / Souches	Forme	Taille	Chromogènes	Opacité	Consistance	Contour	Surface	Élévation
DM15	Circulaire	>1mm	Rose-rouge	Opaque	Visqueuse	Régulier	Lisse brillante	Convexe
KH12	Circulaire	>1mm	Rouge-orangé	Opaque	Visqueuse	Régulier	Lisse brillante	Convexe

b) Étude microscopique

La pureté des souches halophiles extrêmes a été vérifiée par une observation microscopique à l'état frais et par une observation après une coloration de Gram modifiée (figure 8).

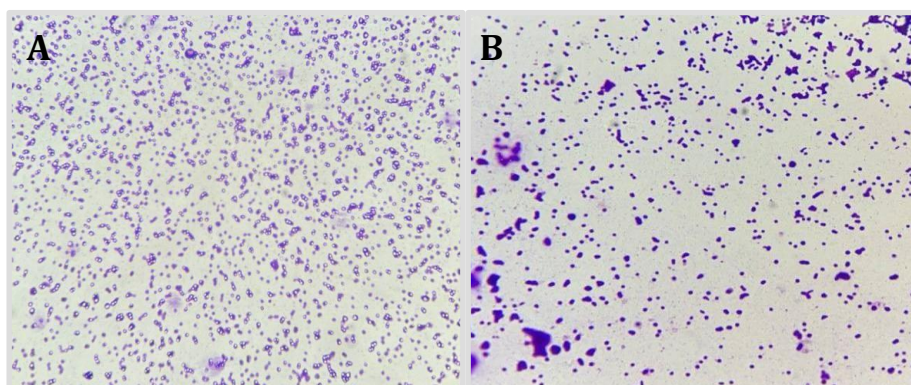


Figure 8. Résultats d'examen microscopique.

A : souche MD15 ; **B** : souche KH12

✓ Observation à l'état frais

L'observation à l'état frais des souches bactériennes halophiles extrêmes DM15 et KH12 effectuée au microscope photonique au grossissement 10 x 40, nous a montré que toutes nos souches bactériennes sont immobiles et ont une forme cocci.

✓ Coloration de Gram modifiée

Après la réalisation de la coloration de Gram modifiée, l'observation au microscope photonique à immersion nous a permis de distinguer le type de Gram. Les résultats montrent que les deux souches présentent un Gram négatif (-) (tableau 7). La forme des cellules des souches bactériennes halophiles extrêmes est de type cocci régulier avec un arrangement isolé, en paire, en chaînette ou en amas pour la souche DM15 et isolé ou en paire pour la souche KH12. D'après la littérature, tous les membres de la famille des *Halobacteriaceae* sont des bactéries Gram négatif mais leurs formes, regroupements, pigmentation et mobilité changent suivant les espèces (Oren et al., 1995).

Les résultats obtenus lors des analyses macroscopiques et microscopiques des souches halophiles extrêmes DM15 et KH12 confirment leur pureté et leur état cellulaire essentiel pour chacune des souches, ce qui est essentiel pour assurer la production du pigment caroténoïde et évaluer leur activité antioxydante et antimicrobienne.

Tableau 7 : caractères d'étude morphologique

Test/souches		MD15	KH12
Aspect microscopiques	Gram	Négatif	Négatif
	Forme	Cocci	Cocci
	Sporulation	Non sporulante	Non sporulante
	Arrangement	Isolé, diplocoque, chaînette ou en amas	Isolé ou en paire
	Mobilité	Immobile	Immobile

c) Étude des caractères biochimiques des souches

✓ La galerie API 20^E

Selon les résultats (figure 9), les souches MD15 et KH12 ne montrent aucune activité β -galactosidase. L'arginine dihydrolase est positive, tandis que l'ornithine décarboxylase et la

lysine décarboxylase sont négatives. La perméase au citrate est présente dans les deux souches. Les deux souches sont positives pour tous les tests (uréase, gélatinase, utilisation des glucides ou de leurs dérivés (mannitol, inositol, sorbitol, rhamnose, saccharose, mélibiose, amygdaline, arabinose). Toutefois, la production de H₂S et l'utilisation du glucose sont négatives pour MD15 et KH12.

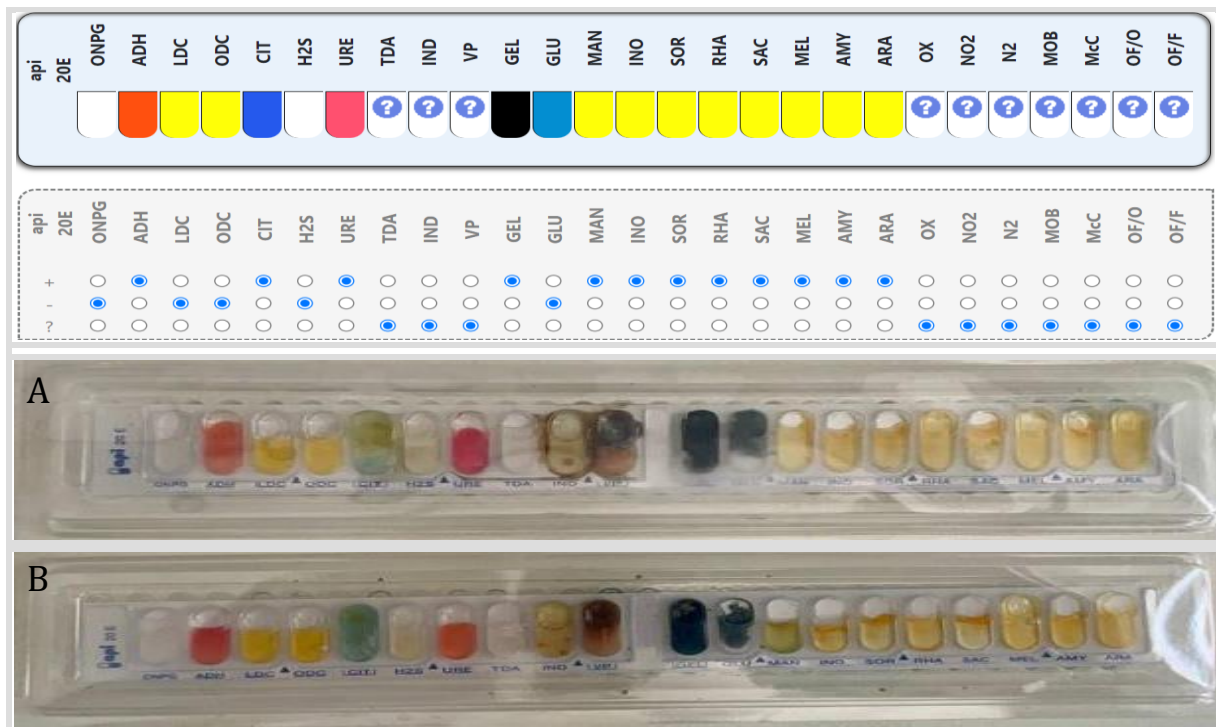


Figure 9. Résultats du système API 20^E,

A : représente la souche MD15, **B** : représente la souche KH12.

✓ La sensibilité aux antibiotiques

Les résultats du test de sensibilité aux antibiotiques sont présentés dans la figure 10 et le tableau B de l'Annexe n°4. La sensibilité à la novomycine (30 mm) et à la Bacitracine (BCT) (18 mm) est observée chez la souche KH12. D'autre part, la souche MD15 est sensible à la novomycine, à la Bacitracine, à la tétracycline et à la SXT avec respectivement un diamètre de 31 mm, 18 mm, 32 mm et 30 mm.

Les deux souches ont montré une résistance au chloramphénicol, ce qui va à l'encontre des observations d'Elvi Bardavid et Oren (2008), qui ont constaté une inhibition de la croissance à des concentrations de chloramphénicol allant de 10 à 50 µg/mL. D'après leur étude, le chloramphénicol retarde l'incorporation des acides aminés et l'efficacité inhibitrice de cet antibiotique est conditionnée par la concentration en sel du milieu.

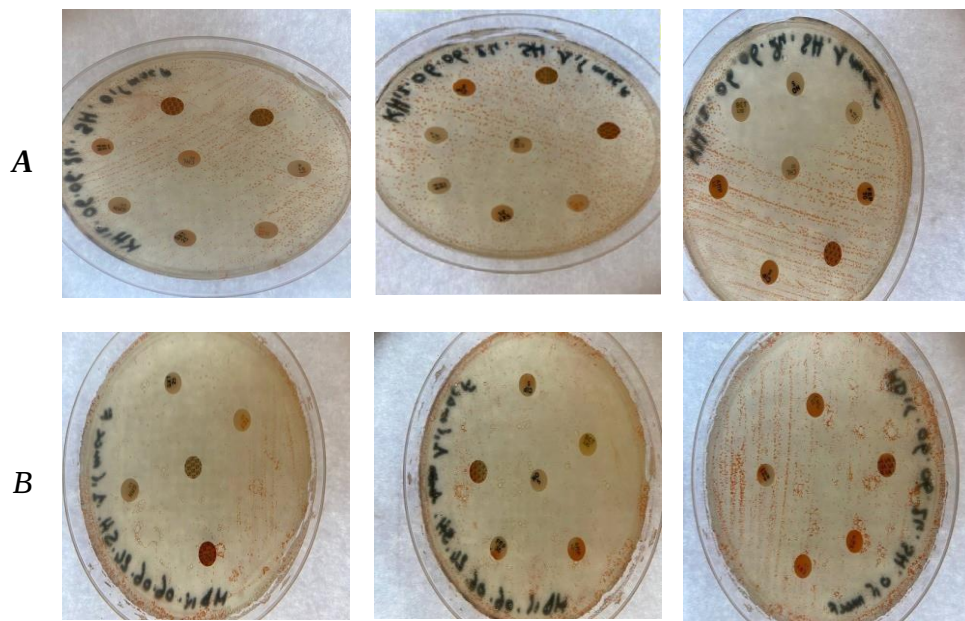


Figure 10. Résultats de la sensibilité aux antibiotiques testés.

A : résultats de la souche KH12 ; B : résultats de la souche MD15.

III.3 Production du pigment caroténoïde par des souches halophiles extrêmes

III.3.1. Production et identification du pigment caroténoïde

Dans le but d'étudier les caractéristiques culturelles et enzymatiques des souches halophiles extrêmes DM15 et KH12, et situer notamment leur summum de production du pigment caroténoïde par-rapport au temps et à la croissance, un suivi de la croissance et de la production du pigment a été réalisé.

La figure 11 montre l'allure des courbes de croissance et de production du pigment dans le milieu SH. L'archée MD15 a observé une phase de croissance exponentielle de 72 heures, suivie d'une phase stationnaire. La production du pigment caroténoïde observée est de type croissance-dépendante, atteignant son maximum à la fin de la phase exponentielle.

Pour estimer le temps maximal de production des caroténoïdes pour les deux souches halophiles extrêmes, la production de pigment a augmenté progressivement depuis le début de la phase log et a atteint sa valeur maximale à la fin de la Phase stationnaire. Après 72 heures, la souche est entrée dans une phase de déclin qui a montré une baisse notable de la teneur en pigment due à la fuite de pigment à l'extérieur des cellules mortes. Les résultats que nous avons obtenus correspondent à ceux de Noby et *al.* (2023), avec une production maximale de caroténoïde atteinte après 72 heures d'incubation.

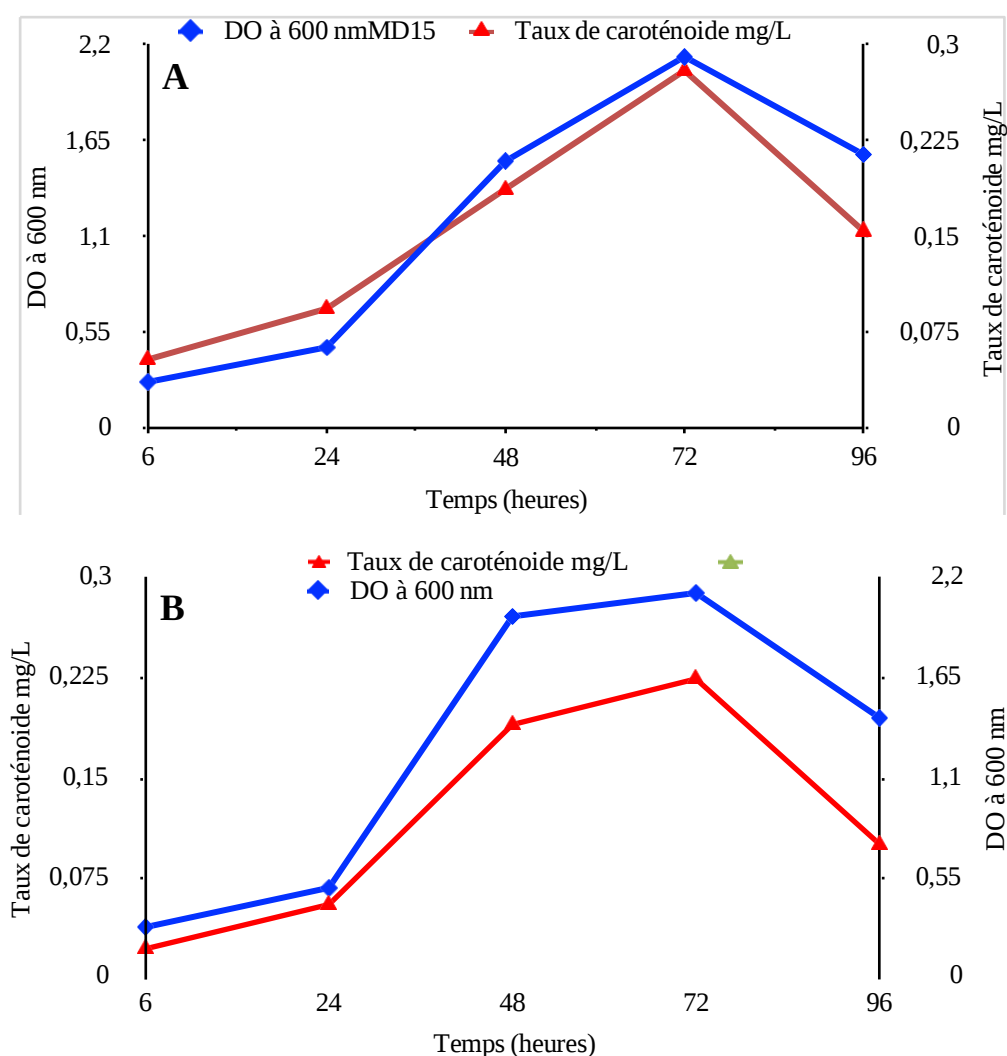


Figure 11. Cinétique de croissance et de production des caroténoïdes par les souches halophiles extrêmes MD15 (A) et KH12 (B) incubé à 40°C, 120 rpm pendant 96 heures.

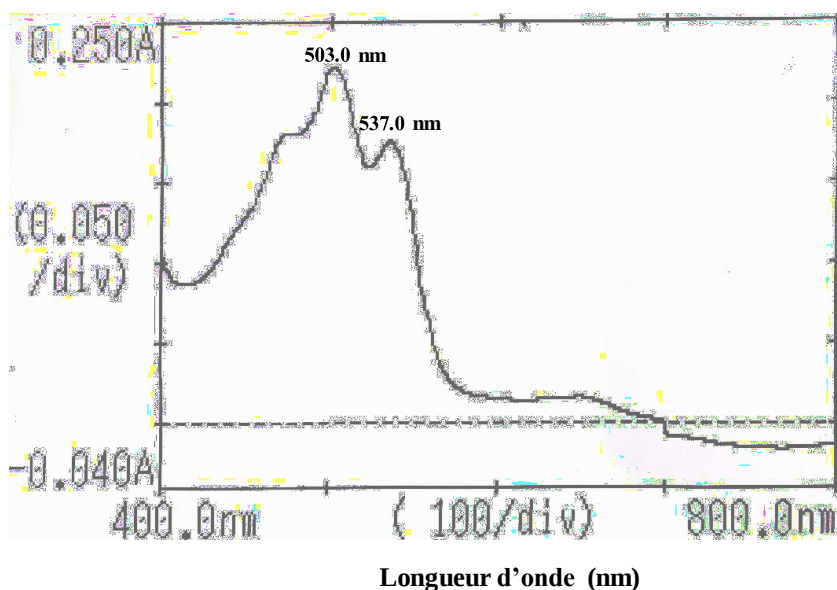


Figure 12. Spectre UV/VIS d'extrait méthanolique obtenus à partir de souche halophile extrême MD15, avec une absorption maximale située autour de 503 nm.

L'analyse du spectre UV/VIS de l'extrait pigmenté méthanolique des deux souches a montré un maxime caractéristique à 3 doigts distinctive des caroténoïdes C50 avec absorption maximale à 503 nm (Figure 12). Pour évaluer la quantité de caroténoïdes extraite de la souche archée halophile *Haloferax mediterranei*, Montero-Lobato (2018) a effectué une mesure de l'absorption à 494 nm afin de déterminer le contenu total.

Étant donné que de nombreux caroténoïdes possèdent un spectre UV-Vis très similaire, il est difficile de se limiter aux caractéristiques spectrales pour réellement identifier les caroténoïdes (Breemen 1997 ; Crupi et al., 2010). Actuellement, le HPLC est la méthode de détection privilégiée pour l'analyse des caroténoïdes, avec des techniques de détection telles que le DAD et la MS (Breemen, 1997).

III.3.2. Optimisation de la production du pigment caroténoïde par la méthode des plans d'expériences.

III.3.2.1 Criblage des facteurs influençant la production du pigment caroténoïde par conception de Plackett-Burman

Dans cette étude, nous avons d'abord utilisé le plan Plackett-Burman, pour sélectionner les variables les plus influentes sur la production du pigment par les souches MD15 et KH12.

Ainsi, quatre facteurs différents, comprenant les composants du milieu et un paramètre cultural sont évalués : l'amidon (X_1), l'extrait de levure (X_2), NaCl (X_3) et le pH (X_4). Le criblage a été effectué en utilisant une matrice de 16 expériences, pour déterminer les facteurs les plus significatifs, dont chaque facteur possède deux niveaux -1 et +1. Le domaine expérimental de chaque facteur ainsi que la matrice de Plackett-Burman utilisée sont illustrés dans le **tableau 8**.

Tableau 8. Plan Plackett-Burman pour le criblage des variables affectant la production des caroténoïdes.

Expérience	x1	x2	x3	x4	X1	X2	X3	X4	Taux de caroténoïdes	
									MD15	KH12
1	-1	-1	-1	-1	0,5 g	0,5 g	100g	6	0,390	0,512
2	1	-1	1	-1	2 g	0,5 g	250g	6	0,606	0,276
3	-1	-1	1	1	0,5 g	0,5 g	250g	9	0,342	1,106
4	1	-1	-1	1	2 g	0,5g	100g	9	0,185	0,276
5	-1	1	-1	1	0,5g	2g	100g	9	0,433	0,531
6	-1	1	1	-1	0,5g	2g	250	6	1,224	0,516
7	1	1	1	1	2g	2g	250	9	0,700	0,311
8	1	1	-1	-1	2g	2g	100g	6	0,587	0,882
9	-1	-1	-1	-1	0,5g	0,5g	100g	6	0,390	0,512
10	-1	-1	1	-1	0,5g	0,5g	250	6	0,606	0,276
11	-1	-1	1	1	0,5g	0,5g	250	9	0,342	1,106
12	1	-1	-1	1	2g	0,5g	100g	9	0,185	0,276
13	-1	1	-1	1	0,5g	2g	100g	9	0,433	0,531
14	-1	1	1	-1	0,5g	2g	250	6	1,224	0,516
15	1	1	1	1	2g	2g	250	9	0,700	0,311
16	1	1	-1	-1	2g	2g	100g	6	0,587	0,882

Les données ont montré une large variation de la production du pigment allant de **0,185**   **1,224 mg/L**. Cette variation montre l'importance de cette étape dans la sélection des facteurs les plus influents pour obtenir une concentration de carot no ide plus élevée.

Les paramètres les plus importants parmi les facteurs testés sont identifiés   l'aide du diagramme de Pareto et la droite d'Henry présentés dans la **figure 13** et **tableau 8**.

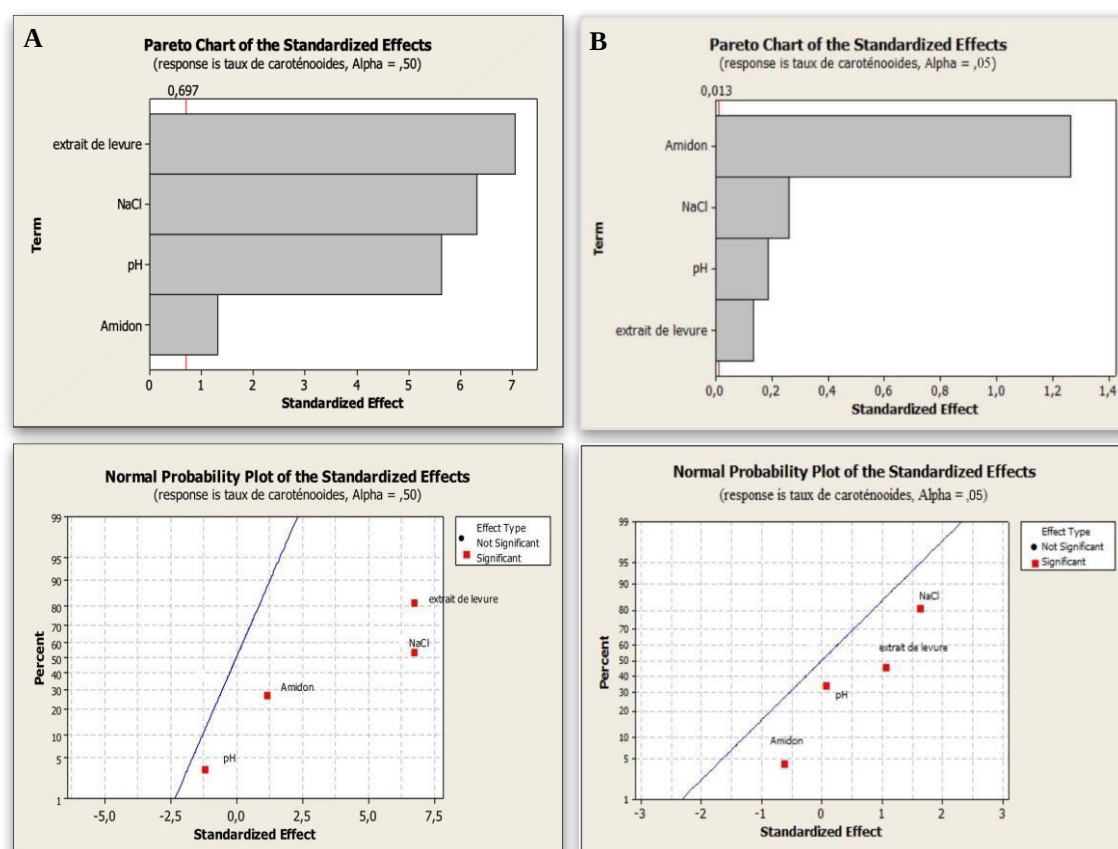


Figure 13. Diagramme de Pareto et la droite d'Henry du plan Plackett-Burman de la souche MD15 (A) et KH12 (B).

Ce diagramme montre que la concentration du substrat (amidon), l'extrait de levure, la salinité (NaCl) et le pH ont un effet significatif sur la production des carot no ides des souches MD15 et KH12, avec des valeurs de T supérieures au seuil (0,697, 0,013) et des valeurs de p inférieures   0,05 respectivement. Ces quatre facteurs ont déjà été rapportés comme facteurs importants affectant la production du pigment carot no ide dans des recherches antérieures (Montero-Lobato, 2018 ; Hwang et al., 2024).

Selon les valeurs de p (tableau 9), le paramètre le plus significatif est extrait de levure, suivie de NaCl, du pH et de la concentration du substrat pour la souche MD15. De plus, la concentration du substrat, suivie du NaCl, du pH et de l'extrait de levure, est le paramètre le plus important pour la souche KH12. L'analyse de **la droite d'Henry** a indiqué que le substrat (amidon), l'extrait de levure, la salinité (NaCl) et le pH ont des effets positifs sur la production des caroténoïdes pour les deux souches halophiles extrêmes (**figure 13**).

Tableau 9. Les coefficients utilisées dans le plan Plackett-Burman.

Coefficients /	p value	
	MD15	KH12
Constant	0,000	0,000
Amidon	0,000	0,016
Extrait de levure	0,000	0,036
NaCl	0,000	0,002
pH	0,000	0,000

Les valeurs des coefficients des facteurs choisis qui ont eu un impact important sur la production des caroténoïdes ont révélé que tous les facteurs ont un impact crucial sur la production. Ainsi, le plan composite central (CCD) a été utilisée pour étudier les variables les plus importantes ($p < 0,001$) ayant des effets positifs, dans le but de déterminer la gamme optimale de facteurs et leurs effets interactifs.

De même, Hwang et ses collègues (2024), ont révélé que toutes les variables testées avaient une faible valeur $p < 0,039$. En particulier, le pH, l'extrait de levure, le NaCl, le volume de l'inoculum et le temps d'incubation ont eu un impact plus significatif ($p < 0,001$) sur la production des caroténoïdes de l'archée halophile *Halorubrum ruber* MBLA0099 que les autres facteurs par l'analyse de Plackett-Burman.

III.3.2.2 Optimisation des paramètres déterminants la production du pigment caroténoïde par méthodologie de surface de réponse (RSM) basée sur le plan composite central (CCD)

A la lumière des résultats obtenus par la matrice Plackett-Burman (PBD), les facteurs comprenant l'amidon, l'extrait de levure, le NaCl et le pH sont sélectionnés pour l'optimisation de la production des caroténoïdes par les souches MD15 et KH12 en utilisant le plan composite central (CCD) comme méthodologie de surfaces de réponse (RSM). Les réponses obtenues: expérimentales et prédites du taux de caroténoïde sont présentées dans le tableau 10. Le modèle présente 30 expériences effectuées en triplicate au total. Chaque facteur est testé à cinq niveaux (-2, -1, 0, +1, +2).

Tableau 10. Matrice du plan composite centré (CCD) X₁ : Amidon ; X₂ : Extrait de levure; X₃ : NaCl ; X₄ : pH.

Ordre d'expériences	Les niveaux codés				Valeurs réelles				Taux de caroténoïdes mg/L			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Valeurs observées		Valeurs prédites	
									MD15	KH12	MD15	KH12
1	+1	+1	-1	-1	2	2	100	6	0,587	0,882	0,882	0,900
2	+1	+1	-1	+1	2	2	100	9	0,567	0,543	0,543	0,601
3	+1	+1	+1	-1	2	2	250	6	1,106	0,933	0,933	0,947
4	+1	+1	+1	+1	2	2	250	9	0,700	0,311	0,311	0,321
5	-1	-1	-1	-1	0,5	0,5	100	6	0,390	0,512	0,512	0,502
6	-1	-1	-1	+1	0,5	0,5	100	9	0,358	0,339	0,339	0,365
7	-1	-1	+1	-1	0,5	0,5	250	6	0,492	0,311	0,311	0,335
8	-1	-1	+1	+1	0,5	0,5	250	9	0,342	1,106	1,106	1,068
9	-1	+1	-1	-1	0,5	2	100	6	0,445	0,253	0,253	0,269
10	-1	+1	-1	+1	0,5	2	100	9	0,433	0,531	0,531	0,546
11	-1	+1	+1	-1	0,5	2	250	6	1,224	0,516	0,516	0,510
12	-1	+1	+1	+1	0,5	2	250	9	0,933	0,453	0,453	0,480
13	+1	-1	-1	-1	2	0,5	100	6	0,232	0,692	0,692	0,700
14	+1	-1	-1	+1	2	0,5	100	9	0,185	0,276	0,276	0,301
15	+1	-1	+1	-1	2	0,5	250	6	0,606	0,276	0,276	0,298
16	+1	-1	+1	+1	2	0,5	250	9	0,641	0,579	0,579	0,560
17	0	0	+2	0	1,25	1,25	325	7,5	2,314	1,799	1,799	1,820
18	+2	0	0	0	2,75	1,25	175	7,5	3,421	1,692	1,692	1,686
19	-2	0	0	0	0	1,25	175	7,5	1,858	2,000	2,000	1,974

20	0	0	0	-2	1,25	1,25	175	4,5	2,303	1,972	1,972	2,100
21	0	0	-2	0	1,25	1,25	25	7,5	0,535	0,224	0,224	0,240
22	0	-2	0	0	1,25	0	175	7,5	2,039	0,543	0,543	0,587
23	0	0	0	+2	1,25	1,25	175	10,5	1,468	0,956	0,956	1,106
24	0	+2	0	0	1,25	2,75	175	7,5	2,649	2,716	2,716	2,810
25	0	0	0	0	1,25	1,25	175	7,5	3,015	3,430	3,430	3,500
26	0	0	0	0	1,25	1,25	175	7,5	3,117	3,456	3,456	3,500
27	0	0	0	0	1,25	1,25	175	7,5	3,031	3,444	3,444	3,500
28	0	0	0	0	1,25	1,25	175	7,5	2,992	3,464	3,464	3,500
29	0	0	0	0	1,25	1,25	175	7,5	3,011	3,448	3,448	3,500
30	0	0	0	0	1,25	1,25	175	7,5	3,039	3,417	3,417	3,500

Les résultats obtenus révèlent que la production de carot no ide a connu des performances variables allant de 0,185   3,421 mg/L pour la souche halophile extrême MD15 et de 0,253   3,456 mg/L pour la souche KH12, avec une production de pigment carot no ide plus élevée par la souche halophile extrême MD15 lorsque les conditions sont de 2,75g d'amidon, 1,25g d'extrait de levure, 175g de NaCl et 7,5 pH, et de 1,25g d'amidon, 1,25g d'extrait de levure, 175g de NaCl et 7,5 pH pour la souche halophile extrême KH12.

Les résultats de l'analyse réalisée montrent que les valeurs expérimentales ainsi que les valeurs prédites par le CCD sont proches (Figure 14), ce qui témoigne de la reproductibilité et la fiabilité de la méthodologie appliquée. Plusieurs travaux ont rapporté l'optimisation de la production des carot no ides en utilisant la méthodologie de surfaces de réponse ((Montero-Lobato, 2018 ; Fariq et al., 2019; Noby et al., 2023; Hwang et al.,2024)).

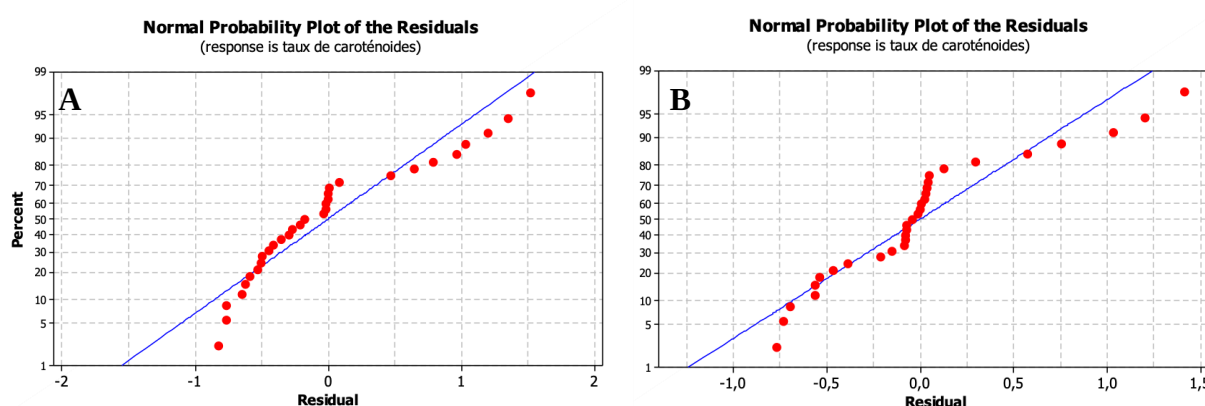


Figure 14. Plan de prédiction et observation des réponses par le plan d'expérience.

Les analyses statistiques et la modélisation des résultats obtenus permettent d'estimer l'effet de chaque paramètre et sa significativité sur la production des caroténoïdes. Les coefficients de régression, ainsi que les valeurs F et p correspondantes pour tous les effets linéaires, quadratiques et d'interaction des paramètres testés sont décrits dans le tableau 11.

Tableau 11: Résultats de l'étude statistique de l'effet des facteurs testés sur la production des caroténoïdes par les deux souches halophiles extrêmes MD15 et KH12.

Terme	Coefficient		Erreur type		t-value		p-value	
	MD15	KH12	MD15	KH12	MD15	KH12	MD15	KH12
Constant	0,61209	-20,8429	0,007750	4,86113	78,98	-4,288	0,000	0,001
Amidon(X ₁)	0,03522	3,1939	0,007750	1,54015	4,54	2,074	0,000	0,050
Extrait de levure (X ₂)	0,12178	3,3214	0,007750	1,54015	15,71	2,157	0,000	0,047
NaCl (X ₃)	0,14334	0,0462	0,007750	0,01602	18,50	2,884	0,000	0,011
pH (X ₄)	-0,03841	4,2816	0,007750	0,99992	-4,96	4,282	0,000	0,001
X ₁ X ₂	-0,02909	0,0804	0,007750	0,32426	-3,75	0,248	0,002	0,007
X ₁ X ₄	0,05297	-0,0708	0,007750	0,16213	6,83	-0,437	0,000	0,008
X ₁ X ₃	-0,02753	-0,0019	0,007750	0,00324	-3,55	-0,576	0,003	0,002
X ₂ X ₄	-0,06822	-0,0360	0,007750	0,16213	-8,80	-0,222	0,000	0,027
X ₂ X ₃	0,11353	-0,0012	0,007750	0,00324	14,65	-0,362	0,000	0,022
X ₃ X ₄	-0,06316	0,0009	0,007750	0,00162	-8,15	0,572	0,000	0,575
X ₂ X ₄	-0,05284	-0,0360	0,007750	0,16213	-6,82	-0,222	0,000	0,027
X ₁ X ₁	-0,6172	-0,44284	0,30396	0,24255	-2,030	-4,090	0,059	0,008
X ₂ X ₂	-0,7485	-0,40534	0,30396	0,24255	-2,463	-4,487	0,026	0,013
X ₃ X ₃	-0,0001	-0,57284	0,00003	0,00002	-3,807	-5,619	0,002	0,001
X ₄ X ₄	-0,2381	-0,68284	0,07599	0,06064	-3,133	-4,790	0,006	0,000

D'après ce tableau, tous les coefficients de régression des termes linéaires et quadratiques sont statistiquement significatifs avec $p \leq 0,05$, sauf un terme quadratique correspondant à la source de carbone amidon (X₁X₁), qui est non significatif ($p \leq 0,059$). Toutefois, les résultats montrent aussi que les interactions ne sont pas toutes significatives, à savoir X₃X₄, correspondant au probabilités $p \leq 0,575$ pour la souche halophile extrême KH12. En outre, le tableau 10 révèle que les termes linéaires de X₁, X₂, X₃ et X₄ sont statistiquement significatifs puisque les valeurs de p sont inférieures à 0,05. Cela indique que X₁ : Amidon ; X₂ : Extrait de levure; X₃ : NaCl ; X₄ : pH affectent fortement la production des caroténoïde par les souches halophiles extrêmes MD15 et KH12. Nos résultats concordent avec plusieurs études qui

montrent que l'extrait de levure, la salinité et pH jouent un rôle essentiel dans l'efficacité de la production du pigment caroténoïde (Montero-Lobato et *al.*, 2018; Hwang et *al.*, 2024).

L'analyse de l'ANOVA des coefficients de régression pour la production du pigment caroténoïde (Tableau 12) montre que le modèle établi est statistiquement significatif en raison de la valeur de F calculé ($F_{MD15} = 2,14$, $F_{KH12} = 158,56$) d'une part et la faible probabilité ($p_{MD15} \leq 0,004$, $p_{KH12} \leq 0,000$) d'autre part. En général, une valeur F avec une faible probabilité p indique une grande signification du modèle de régression (Rene et *al.*, 2007).

Tableau 12. Résultats de l'analyse de la variance (ANOVA) du modèle obtenu

Source	Degré de liberté (DF)		Somme des carrés		F-value		p-value	
	MD15	KH12	MD15	KH12	MD15	KH12	MD15	KH12
Regression	1 4	4	25,9726	1,21899	2,14	158,56	0,004	0,000
Linéaire	4	6	2,9813	0,83014	0,86	71,98	0,010	0,000
Quadratique	4	4	22,7691	22,7691	6,55	38,19	0,003	0,000
Interaction	6	1	0,2222	0,29359	0,04	3,95	0,000	0,074
Erreur résiduelle	6	16	13,8961	0,00760				
Inadéquation de l'ajustement	10	16	13,8861	0,03075				
Erreur pure	6	4	0,0100	0,03075				
Total	30	31						

La fiabilité de notre modèle est évaluée en utilisant le coefficient de corrélation de régression (R_2) qui correspond à 0,97 et 0,98 pour les souches halophiles extrêmes MD15 et KH12 respectivement. Ces valeurs indiquent qu'environ 97-98 % de la variabilité de la réponse peut être expliquée par le modèle. Plus le coefficient de détermination R_2 s'approche de 1, plus le modèle est représentatif c'est à dire, meilleur (Karuppaiya et *al.*, 2010).

Enfin, cette modélisation permet d'exprimer l'effet des quatre facteurs testés sur la production

de caroténoïdes à travers une équation mathématique du second degré:

✓ **La souche MD15**

$$\begin{aligned} \text{Teneur de caroténoïde} = & 2,208 - 2,175\text{Amidon} - 1,071 \text{ extrait de levure} - 0,201 \text{ pH} - 0,006 \\ & \text{NaCl} + 1,017 (\text{amidon}*\text{extrait de levure}) + 0,001(\text{Amidon}*\text{NaCl}) - 0,030(\text{Amidon}*\text{pH}) + 0,009 \\ & (\text{Extrait de levure}*\text{NaCl}) - 0,010 (\text{Extrait de levure}*\text{pH}) - 1,822 (\text{NaCl}*\text{pH}) - 0,787 \\ & (\text{Amidon})^2 - 1,018 (\text{NaCl})^2 - 0,720 (\text{Extrait de levure})^2 - 0,303 (\text{pH})^2 \end{aligned}$$

✓ **La souche KH12 :**

$$\begin{aligned} \text{Teneur de caroténoïde} = & 4,315 - 0,351 \text{ Amidon} - 2,554 \text{ extrait de levure} - 0,511 \text{ pH} - 0,021 \\ & \text{NaCl} + 1,279 (\text{amidon}*\text{extrait de levure}) + 0,004(\text{Amidon}*\text{NaCl}) - 0,057(\text{Amidon}*\text{pH}) + 0,017 \\ & (\text{Extrait de levure}*\text{NaCl}) - 0,370 (\text{Extrait de levure}*\text{pH}) - 0,003 (\text{NaCl}*\text{pH}) - 0,991 \\ & (\text{Amidon})^2 - 1,362 (\text{NaCl})^2 - 1,088 (\text{Extrait de levure})^2 - 0,290 (\text{pH})^2 \end{aligned}$$

III.3.2.3 Effet des paramètres intervenant dans la production des caroténoïdes

Pour mieux comprendre l'effet interactif des paramètres testés sur la production des caroténoïdes par les souches halophiles extrêmes et déterminer leurs valeurs optimales, six courbes de surface de réponse sont tracées pour chaque isolats.

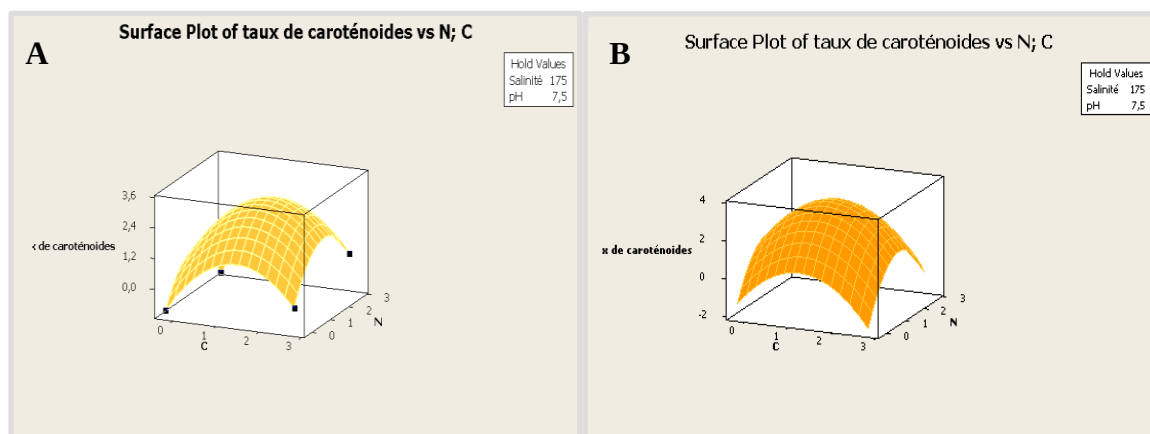


Figure 15. Effet de la concentration d'amidon et d'extrait de levure sur la production des caroténoïdes où A représenté la souche MD15 et B la Souche KH12.

La figure 15 illustre l'effet de la concentration d'amidon et extrait de levure sur la production des caroténoïdes en maintenant les deux autres facteurs, à savoir la salinité et le pH à leurs valeurs centrales soit 175 g/l (p/v) et 7,5 respectivement.

Selon cette dernière, nous remarquons que la production des carot no ides augmente avec l'élévation de la concentration d'amidon et d'extrait de levure. Toutefois, cette production est réduite pour des concentration d'amidon et d'extrait de levure supérieure   1,5 g/L pour les deux souches étudiées. Selon Hwang et al. (2024), l'ajout de 2 g/L de saccharose a entraîné une production de carot no ides environ 10 % plus élevée (0,725 mg L⁻¹) que celle observée dans la culture avec 1 g/L de sucrose.

Une augmentation de la concentration de substrat stimule non seulement la croissance cellulaire mais induit également la carot nog nese. Ceci est attribué au fait que le carbone libéré pendant le métabolisme du substrat sert de composant principal dans la structure moléculaire des carot no ides (Hwang et al., 2024).

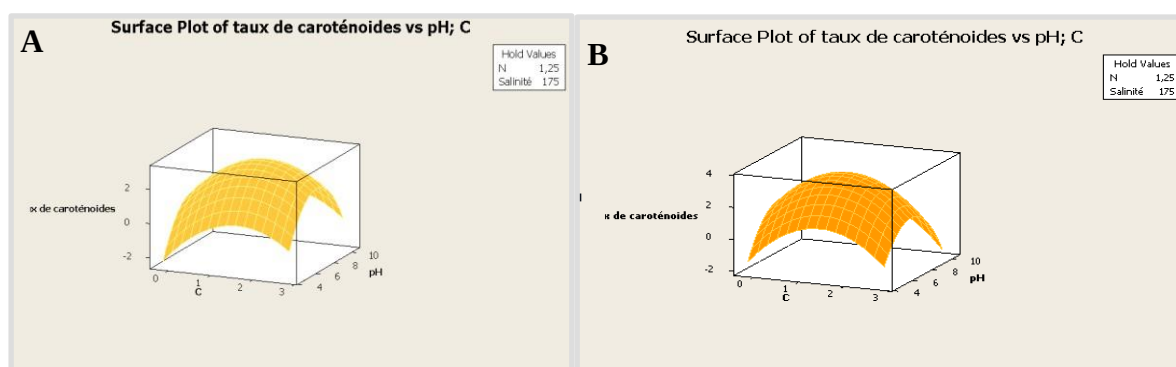


Figure 16. Effet de la concentration d'amidon et pH sur la production des carot no ides où A représenté la souche MD15 et B la Souche KH12.

La figure 16 révèle l'effet de la concentration du substrat et du pH sur la production des carot no ides en fixant l'extrait d'azote et la salinité   leurs valeurs centrales. Nous constatons qu'il existe une corrélation positive entre la concentration du substrat et la production des carot no ides, ce qui signifie qu'une augmentation de la concentration du substrat entraînera une production plus élevée des carot no ides. Il est également important de souligner que toute différence par rapport au pH de 7,50, qu'elle soit incrémentale ou d cr mentale, entraîne une diminution du rendement de production des carot no ides pour les deux souches étudiées.

La production des carot no ides a été diminuée par les hauts pH et les concentrations élevées du substrat, sans doute en raison de l'effet synergique du pH élevée et de la pression osmotique caus e par l'excès du substrat.

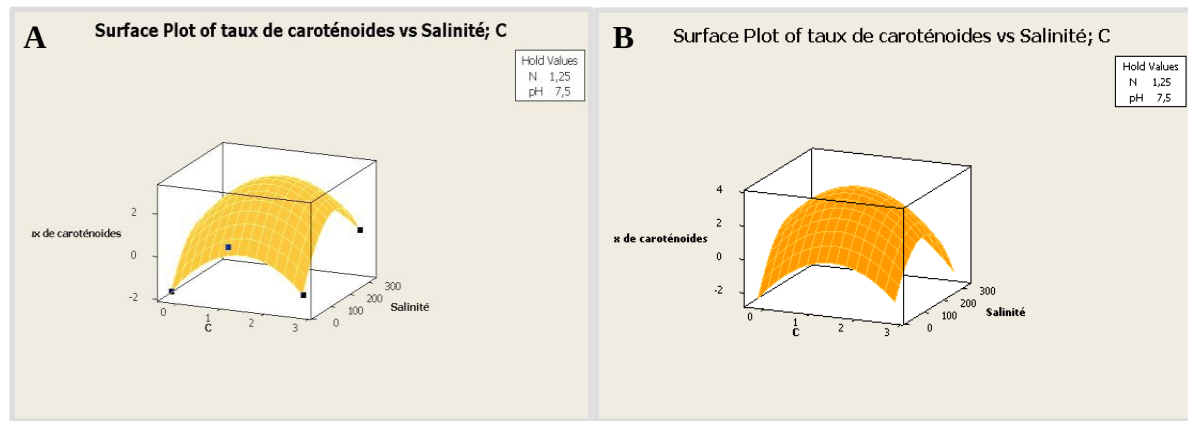


Figure 17 : Effet de la concentration en amidon et NaCl sur la production des caroténoïdes où A représenté la souche MD15 et B la Souche KH12.

L'effet interactif entre la concentration du substrat (amidon) et la salinité est illustré dans la **figure 17**, en maintenant la concentration d'extrait de levure et le pH à leurs valeurs centrales. Nous observons que l'augmentation de la concentration du substrat améliore la production des caroténoïdes. Ainsi, l'élévation de la salinité et de la concentration du substrat améliore la production des pigments caroténoïdes jusqu'à une salinité seuil de 175 g/L, puis les niveaux des caroténoïdes diminuent au-dessus de cette salinité pour les deux souches étudiées. Cette réduction est probablement due à la concentration du substrat élevé, qui inhibent la croissance cellulaire et l'activité métabolique des cellules, entraînant une baisse de la concentration en caroténoïdes.

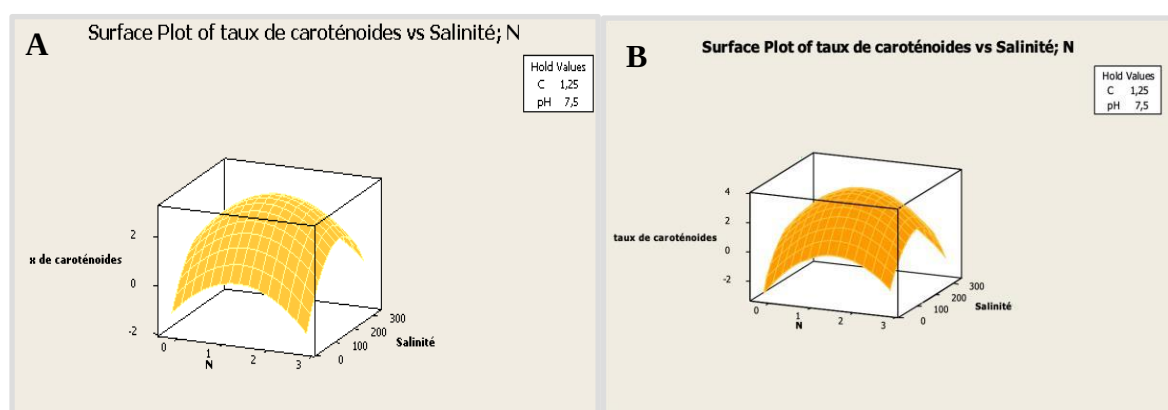


Figure 18. Effet de la concentration en extrait de levure et de NaCl sur la production des caroténoïdes où A représenté la souche MD15 et B la Souche KH12.

La **figure 18** présente comment la concentration d'extrait de levure et la salinité influence la production de caroténoïdes en maintenant les deux autres facteurs, à savoir la concentration en amidon et le pH, à leurs valeurs respectives de 1,25 g/L et pH 7,5. D'après cette dernière, on constate une augmentation de la production de caroténoïdes lorsque la concentration d'extrait de levure et NaCl augmente. Cependant, cette quantité de production diminue lorsque la concentration d'extrait de levure et de NaCl dépasse 1,25 g/L et 175 g/L respectivement pour les deux souches explorées.

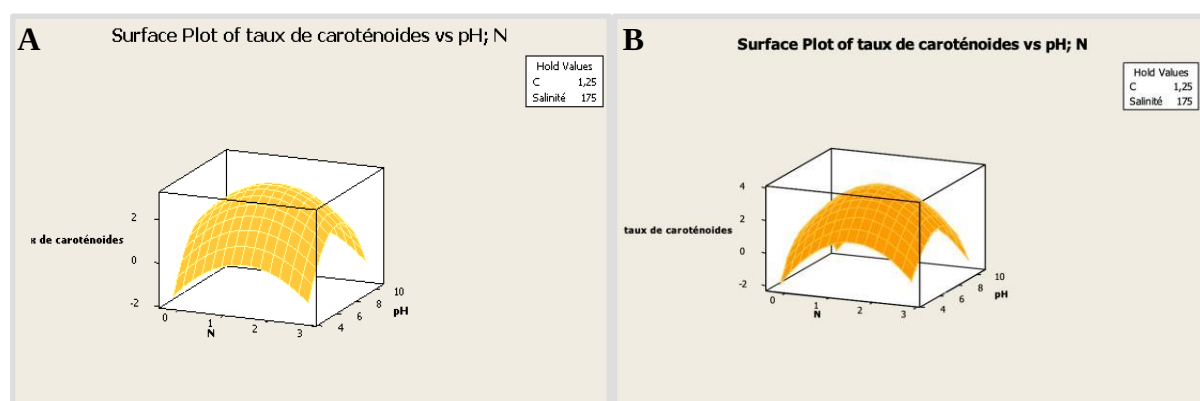


Figure 19: Effet de la concentration en extrait de levure et du pH sur la production des caroténoïdes où A représenté la souche MD15 et B la Souche KH12.

La production de caroténoïdes est influencée par la concentration d'extrait de levure et le pH, alors que les autres facteurs tels que la concentration d'amidon et de NaCl sont constants à 1,25 g/L et 175, respectivement. La production de caroténoïdes augmente avec l'augmentation de la concentration d'extrait de levure et de NaCl, comme le montre la **figure 19**. Toutefois, cette production commence à baisser lorsque les concentrations d'extrait de levure et de NaCl dépassent respectivement 1,25 g/L et 175g/L, pour les deux souches analysées.

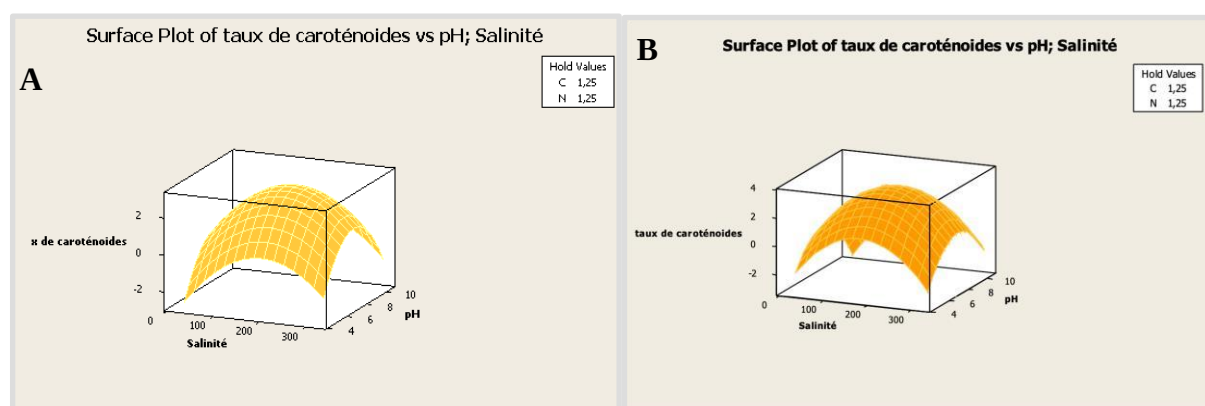


Figure 20: Effet de la concentration en NaCl et du pH sur la production des caroténoïdes où A représenté la souche MD15 et B la Souche KH12.

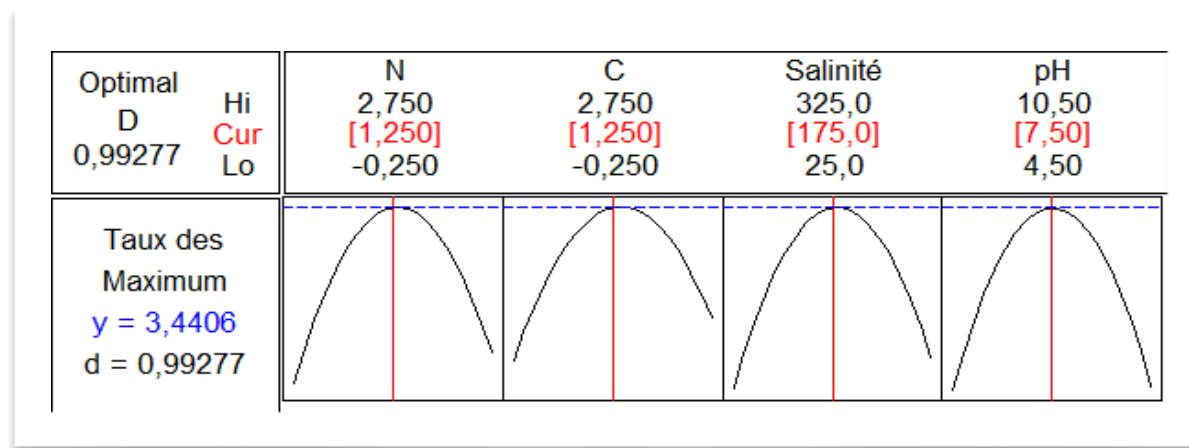
La figure 20 montre l'impact de la salinité et du pH sur la production des caroténoïdes en fixant la concentration du substrat et d'extrait d'azote à leurs valeurs centrales.

Nous observons qu'à de faibles concentrations de NaCl et même avec des concentrations élevées, la production de caroténoïde diminue. Le rendement maximal est observé pour une concentration initiale du NaCl de 170 à 180 g/l et un pH de 7,5. Le taux de production de caroténoïde est lié à la concentration de NaCl disponible. À des faibles concentrations de salinité, les souches halophiles extrêmes meurent et la productivité décroît. Les concentrations de NaCl inférieures à 17,5 % ont entraîné une diminution de la production de caroténoïdes, car de faibles concentrations ont provoqué une lyse cellulaire (Naziri et *al.*, 2014). Les concentrations de NaCl supérieures à 25% ont provoqué une réduction de la DO du milieu de culture et une diminution de la croissance cellulaire, ce qui suggère un impact négatif sur la production des caroténoïdes des deux souches étudiées. Les résultats obtenus pour la souche *Halorubrum ruber* étaient similaires (Hwang et *al.*, 2024).

En conclusion, notre étude met en lumière l'importance d'interaction entre les paramètres testés dans la production de caroténoïde. Ces résultats fournissent des informations cruciales pour optimiser les conditions de fermentation et augmenter la production de caroténoïdes par les souches halophiles extrêmes MD15 et KH12.

III.3.2.4 Mise en place des conditions optimales et validation du modèle

D'après les résultats de la **figure 21**, un environnement de culture optimal a été créé en utilisant 1,25 g d'extrait de levure, 1,25 d'amidon, 175 g/L de NaCl, à un pH de 7,5 et la culture a été réalisée pendant une période de 3 jours.



Extrait de levure= 1,25 g Amidon= 1,25 g NaCl= 175 g pH= 7,5

Figure 21. Optimisation des conditions de production des caroténoïdes

Les résultats expérimentaux ont confirmé la réponse maximale prévue pour la production totale des caroténoïdes par les deux souches halophiles extrêmes MD15 et KH12. La production maximale des caroténoïdes était de 7,008 mg/L et 7,005 mg/L dans les conditions optimales de RSM pour les souches MD15 et KH12 respectivement.

En utilisant l'approche CCD, Asker et *al.*(2002) et Montero-Lobato et *al.*(2018) ont rapporté des résultats similaires, indiquant que la production maximale de caroténoïdes d'*Haloferax mediterranei* a été observée à 36,81°C, pH 8,96 et 120,3 g de NaCl, avec un taux de caroténoïde de 3,74 mg/L. Selon Hamidi et *al.* (2014) et De la Vega et *al.* (2016), les conditions idéales pour la production de caroténoïdes totales par *Halorubrum sp.* SH1 à l'aide de CCD ont été rapportées à 31 et 32 °C, à un pH de 7,51 et 7,94, ainsi qu'à 183,3 et 205,5 g/L de NaCl, pour un taux de caroténoïde de 11,71 mg/L. Selon Hwang et ses collègues (2024), un milieu de culture optimal a été utilisé, comprenant 7,96 g/L d'extrait de levure et 210 g/L

de NaCl, à un pH de 8,0, avec un volume d'inoculum de 8,7%. ce qui a permis de produire une production maximale de caroténoïdes de 1,233 mg/L en utilisant CCD.

Selon ce résultat, il est démontré que le CCD est efficace pour améliorer les conditions et la composition du milieu de culture où les variables pourraient influencer la production des caroténoïdes. La production totale de caroténoïdes a été multipliée par 25,02 et 31,27 fois, respectivement, par rapport à celle observée dans le milieu de culture de base pour les deux souches halophiles extrêmes MD15 et KH12.

III.4 Évaluation de l'activité antioxydante des caroténoïdes

On a évalué le potentiel antioxydant des extraits caroténoïdiques in vitro en utilisant trois tests couramment utilisés. Le test de piégeage du radical libre DPPH, le test de piégeage du radical cationique ABTS⁺ et le test de réduction de fer FRAP. Les trois essais ont été sélectionnés en raison de la variété des modes d'action de l'activité antioxydante, et les résultats ont été comparés avec la capacité antioxydante d'un composé de référence ; acide ascorbique.

La présence d'antioxydants entraîne la réduction de ces radicaux, ce qui se traduit par leur décoloration pour les deux premiers tests et par une augmentation de la couleur pour le FRAP. Par conséquent, la capacité des antioxydants présents dans l'échantillon est inversement proportionnelle à l'intensité de la couleur observée (Re et *al.*, 1999 ; Dong Sun Lee et *al.*, 2001).

✓ Test DPPH

Cette méthode est largement considérée comme la première approche pour évaluer l'activité antioxydante d'une molécule ou d'un mélange de composés grâce à son faible coût, à sa rapidité de préparation et à sa facilité d'exécution (Serino et *al.*, 2023).

L'effet antioxydant des extraits caroténoïdiques des souches halophiles extrêmes MD15 et KH12 contre le radical DPPH a été mesuré par spectrophotométrie, en observant la diminution de ce radical. La **figure 22** présente les courbes montrant le pourcentage d'inhibition du radical en fonction des concentrations des extraits caroténoïdiques examinés.

Les résultats indiquent que tous les extraits évalués manifestent une activité antiradicalaire qui dépend de la dose, laquelle s'intensifie avec l'augmentation de la concentration de

carot no ides. L'extrait de carot no ides de la souche KH12 a démontré une forte capacité antiradicalaire, inhibant $93,20 \pm 0,80$ % du DPPH   une concentration de $7,05 \mu\text{g/mL}$. De même, l'extrait de la souche MD15 a montré une efficacité maximale   une concentration de $7,08 \mu\text{g/mL}$, avec des taux d'inhibition de $91,90 \pm 0,10$ %. Ce résultat est similaire   celui observé par Hou et Cui (2017), qui ont constaté que les extraits de carot no ides des souches *Haloplanus* sp. RO5-8, *Halogranum* sp. RO2-11 et *Haloferax volcanii* CGMCC 1.2150 inhibaient environ 90 % de ce radical   une concentration de $10 \mu\text{g/mL}$.

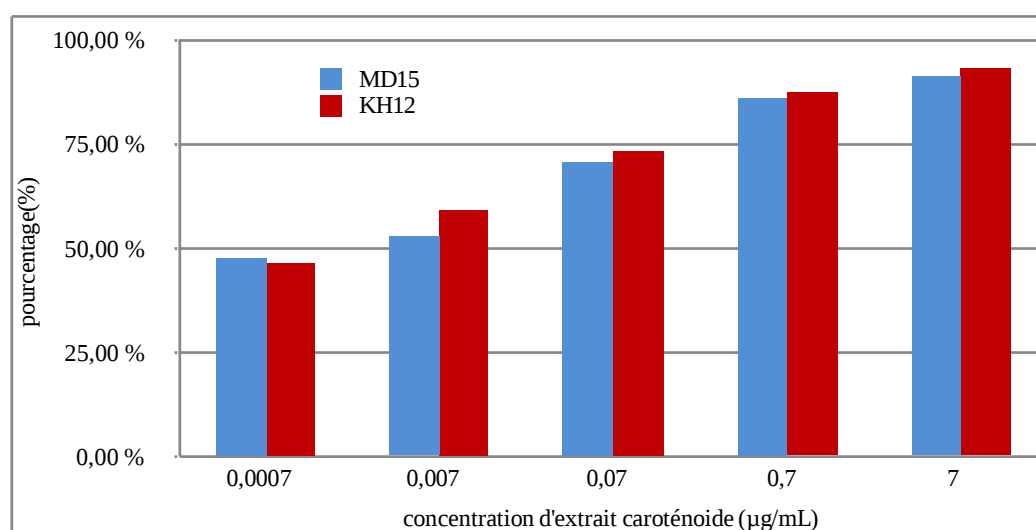


Figure 22. Pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction des concentrations d'extrait carot no idique

D'après Serina et ses collègues (2023), les concentrations des extraits carot no idiques ($10 \mu\text{g/mL}$) de *Halorhabdus utahensis* cultivés sur du glucose et du xylose étaient supérieures aux antioxydants sélectionnés comme molécules de comparaison, avec des valeurs respectives de $46,1 \pm 0,8$ et $40,1 \pm 0,8$ % ($p < 0.0001$).

Afin de faciliter la comparaison des activités des divers extraits carot no idiques, les concentrations efficaces médianes (EC50) ont été calculées   partir des courbes montrant le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration des extraits, en utilisant le logiciel Graphpad Prism version 8.4.3 (Chen et al., 2013).

L'EC50 est un indice utilisé pour évaluer l'activité antioxydante. Il représente la concentration du substrat nécessaire pour réduire 50 % la concentration initiale du radical. La valeur de l'EC50 est inversement proportionnelle   la capacité antioxydante d'un composé (Barros et al., 2007).

L'analyse de variance à un facteur a montré une différence extrêmement significative ($p < 0,0001$) entre les EC50 des extraits (**Tableau 13**). Parmi les deux extraits caroténoïdiques testés, celui provenant de la souche KH12 s'est révélé le plus actif, avec une EC50 d'environ 0,883 $\mu\text{g/mL}$.

Selon Giani et *al.* (2022), *Halorubrum* sp. BS1 a présenté des valeurs comprises entre 6 et 9 $\mu\text{g/mL}$ pour l'inhibition de 50% du radical DPPH, qui sont des concentrations inférieures à celles détectées dans les extraits de *Haloferax. mediterranei*. Ces différences entre les essais pourraient être attribuées à la composition de chaque extrait de caroténoïde haloarchéal qui pourrait interagir différemment avec les radicaux utilisés. Il convient également de mentionner que les effets antioxydants de l'acide ascorbique varient d'une étude à l'autre, ce qui pourrait être dû à des variations des méthodes appliquées.

Tableau 13. Valeurs d'EC50 d'activité antioxydante des extraits caroténoïdiques vis-à-vis du radical DPPH.

Extraits	L'EC50 ($\mu\text{g/mL}$)
KH12	0,872
MD15	0,883

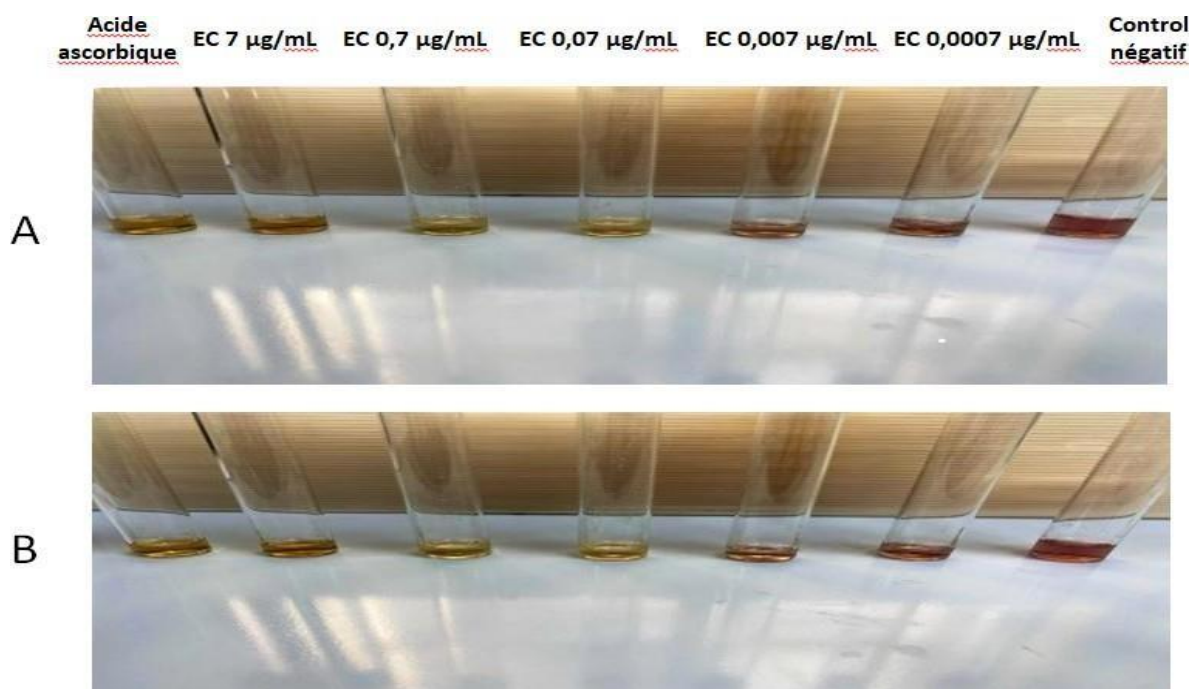


Figure 23 : Variation de la couleur du réactif DPPH,

A: extrait caroténoïdique de la souche MD15 et B : extrait caroténoïdique de la souche la souche KH12.

✓ Test ABTS

Le potentiel antioxydant des extraits caroténoïdiques a également été évalué en utilisant le radical cationique ABTS⁺. La réduction de ce radical est illustrée dans la **figure 24**. Les résultats obtenus montrent des tendances comparables à celles observées dans le test au DPPH. L'activité antiradicalaire de tous les extraits caroténoïdiques testés a augmenté proportionnellement à la concentration de caroténoïdes. A une concentration de 7,0 µg/ml, la souche KH12 a montré une meilleure activité de 90,60%. Cependant, la souche MD15 dans la même concentration a inhibé 89,20 % du radical ABTS⁺.

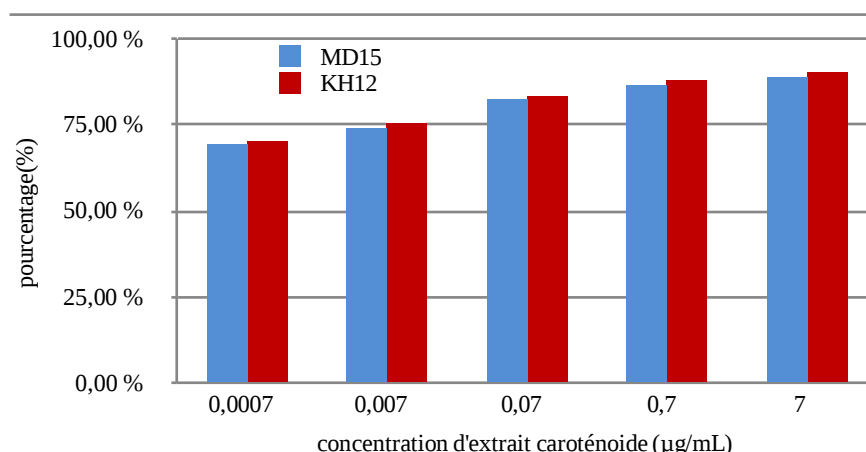


Figure 24. Pourcentage d'inhibition du radical ABTS⁺ en fonction des concentrations d'extraits caroténoïdique.

Les valeurs des EC₅₀ ont montré une différence extrêmement significative à $p < 0,0001$ (**Tableau 14**). Tout comme pour le test DPPH, l'EC₅₀ de l'extrait caroténoïdique de la souche KH12 est d'environ 0,9104 µg/mL. En revanche, celle de l'extrait de la souche MD15 est avec une valeur de 0,9115 µg/mL.

Selon Giani et al. (2022), tous les extraits de caroténoïdes haloarcheae ont démontré une plus grande efficacité que l'acide ascorbique pour éliminer le cation radical ABTS. Les valeurs d'IC₅₀ obtenues ont également démontré que ces extraits de caroténoïdes présentaient un potentiel antioxydant supérieur à celui rapporté pour d'autres espèces haloarchéennes. Par

exemple, il serait nécessaire d'utiliser des concentrations supérieures à 16 µg/mL pour éliminer au moins 50 % des radicaux ABTS en utilisant des extraits de caroténoïdes provenant d'*Halococcus morrhuae*, de *Halobacterium salinarum* et de *Thermus filiformis* (Mandelli et al., 2012). Les autres valeurs rapportées de l'IC50 pour cela sont les suivantes : 0,8 µg/mL pour la souche *Haloterrigena* sp.

Tableau 14. Valeurs d'EC50 d'activité antioxydante des extraits caroténoïdiques vis-à-vis du radical ABTS+.

Extraits	L'EC50 (µg/mL)
KH12	0,9104
MD15	0,9115

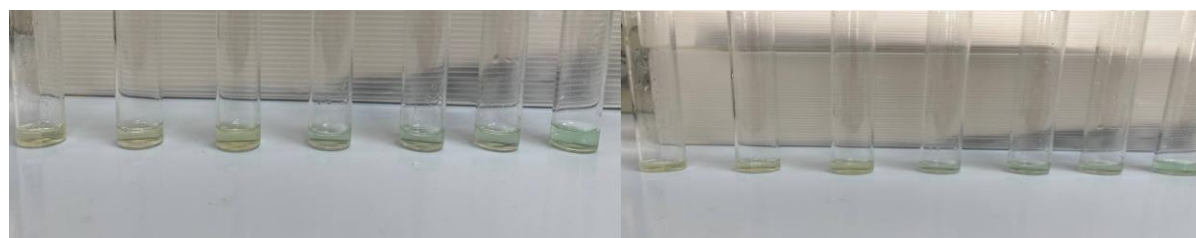


Figure 25. variation de la couleur de réactifs ABTS+. A correspond à la souche MD15 et B à la souche KH12.

✓ Réduction de fer (FRAP)

Le principe de l'essai FRAP est basé sur la capacité des antioxydants à réduire le complexe de Fe(III) 2,4,6-tripyridyl-s-triazine au complexe Fe(II) 2,4,6-tripyridyls-triazine dans un environnement acide. Comme le complexe réduit est coloré, la réaction peut être surveillée à la longueur d'onde d'absorption maximale de 593 nm par un spectrophotomètre. Les résultats de l'activité réductrice de l'extrait méthanoïque de l'extrait étudiée sont représentés dans la figure 18. Nous constatons que la capacité réductrice est proportionnelle à l'augmentation de la concentration. Cela implique que la hausse de l'absorbance dans le milieu réactionnel indique l'augmentation de la réduction de fer.

Les résultats de l'activité réductrice de l'extrait méthanoïque de l'extrait étudiée sont représentés dans la **figure 26**. Nous constatons que la capacité réductrice est proportionnelle à l'augmentation de la concentration. Cela implique que la hausse de l'absorbance dans le milieu réactionnel indique l'augmentation de la réduction de Fer.

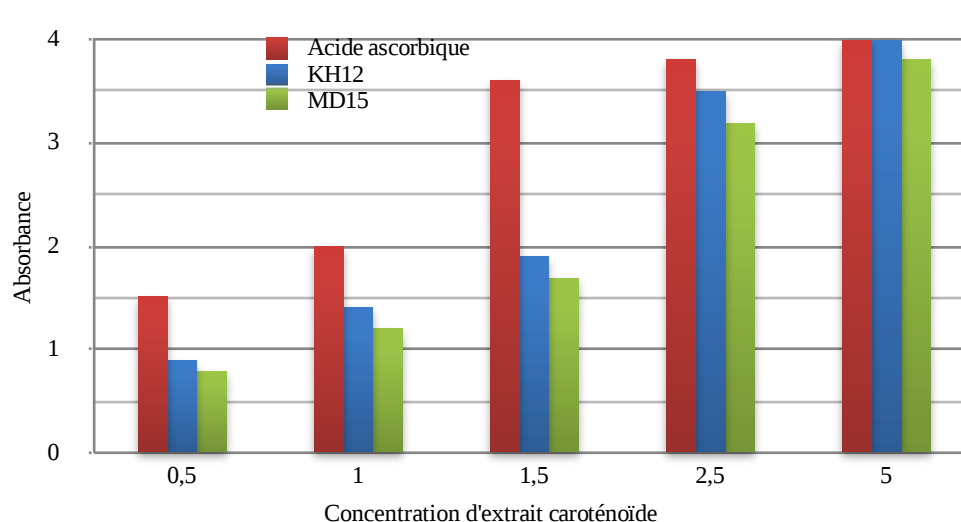


Figure 26. Activité réductrice des extraits caroténoïdiques des souches halophiles extrêmes MD15 et KH12.

Selon le **tableau 15**, les extraits caroténoïdiques des deux souches MD15 et KH12 ont des propriétés antioxydantes similaires à celui du produit de référence (acide ascorbique). Tandis que la culture de *Halorhabdus utahensis* dans un milieu contenant deux pour cent de glucose et un pourcent de xylose étaient moins antioxydants que l'acide ascorbique (Serino et *al.*, 2023).

Tableau 15. EC50 en (ug/ml) des extraits méthanoïques de caroténoïdes et l'acide ascorbique.

Extraits	L'EC50 (µg/mL)
KH12	0,4968
MD15	0,5108
Acide Ascorbique	0,5

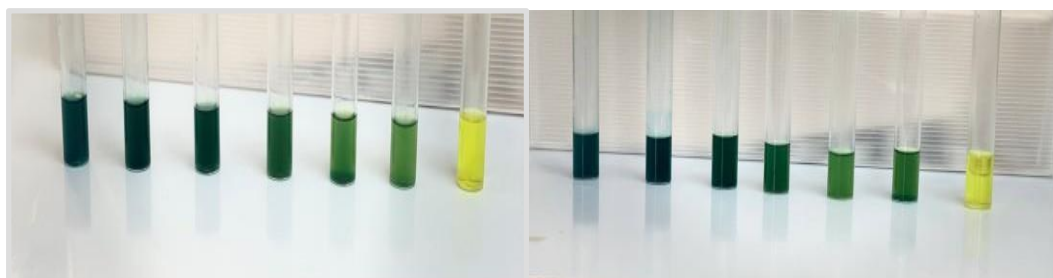


Figure 27. Variation de la couleur de réactif de FRAP en fonction de la concentration des extraits caroténoïdiques A correspond à l'extrait caroténoïdique de la souche MD15 et B à l'extrait caroténoïdique de la souche KH12.

Selon les résultats globaux, les extraits ont démontré leur efficacité antioxydante sur tous les essais choisis, confirmant ainsi la capacité des souches halophile extrêmes MD15 et KH12, à fournir des agents antioxydants qui agissent par transfert d'électrons à des espèces radicales ou à des métaux avec des nombres d'oxydation élevés. Les même résultats ont été observé chez la souche *Halorhabdus utahensis* (Serino et *al.*, 2023).

Grâce à leur activité antioxydante, les caroténoïdes peuvent être employés comme colorants ou éléments fonctionnels dans les secteurs de l'alimentation, de la cosmétique et de la pharmacie (Agarwal et *al.*, 2023). Selon Anunciato et Rocha Filho (2012), l'ajout de caroténoïdes aux aliments peut avoir des effets positifs considérables sur la santé, et leur utilisation en tant qu'antioxydants dans le domaine de la cosmétique progresse encore davantage.

III.5 L'évaluation de l'activité antimicrobienne des caroténoïdes

Le traitement des infections bactériennes repose principalement sur l'utilisation des antibiotiques. L'utilisation répandue et parfois inappropriée de ces médicaments peut conduire à la sélection de souches multi-résistantes, soulignant ainsi l'importance de diriger la recherche vers la découverte de nouvelles approches. Ces efforts pourraient ouvrir la voie à de nouveaux traitements basés sur des produits naturels.

Dans cette étude, l'activité antibactérienne des deux extraits caroténoïdiques a été évaluée à l'aide de la méthode de diffusion sur milieu gélosé. Cette méthode qualitative offre une première indication sur la capacité d'un composé à inhiber la croissance des micro-organismes.

Ce test a été mené sur deux groupes de micro-organismes. Le premier groupe comprenait six souches bactériennes et une levure pathogène responsable de maladies humaines, tandis que le second groupe était constitué de deux souches phytopathogènes.

Pour évaluer l'activité antibactérienne, nous avons mesuré le diamètre de la zone d'inhibition autour des disques imprégnés des extraits à tester. Pour une évaluation précise de leur efficacité, le diamètre pris en compte était calculé en soustrayant le diamètre de la zone d'inhibition du contrôle négatif (méthanol) de celui de l'extrait testé.

Tous les résultats de cette étude sont consignés dans le tableau D Annexe 05.

➤ Les souches bactériennes

Les résultats (**figure 28**) montrent que les extraits caroténoïdiques ont provoqué des zones d'inhibition variables, variant de 9 à 16 mm, indiquant une activité antibactérienne qui varie selon la souche testée. Selon Tekwi et *al.* (2012), un extrait est considéré comme ayant une activité antibactérienne si la zone d'inhibition mesurée est égale ou supérieure à 10 mm. Cependant, il est important de noter que la faible solubilité de nos extraits peut entraîner une diffusion lente dans le milieu gélosé, ce qui pourrait influencer la formation d'une zone d'inhibition.

L'extrait caroténoïdique de la souche KH12 a montré une activité antibactérienne significativement plus élevée que celui de MD15 contre les bactéries et la levure pathogène humaine, avec des zones d'inhibition variant entre 9 et 14 mm (**figure 29**). La variation de l'activité antibactérienne des extraits pourrait être attribuée à des différences dans leur composition. Selon Ibrahim (2012), l'activité d'un extrait ne dépend pas d'un constituant actif principal, mais plutôt de la synergie des différents caroténoïdes présents dans cet extrait.

Il est important de souligner que l'extrait de la souche KH12 a également montré la plus grande activité antioxydante parmi tous les extraits testés. Cette constatation suggère qu'il pourrait y avoir une corrélation entre ces deux activités. De nombreux travaux ont déjà rapporté une telle observation lors de l'évaluation des activités biologiques des composés naturels. (De Freitas Araújo et *al.*, 2012 ; Balraj et *al.*, 2014 ; Rostami et *al.*, 2016 ; Santos et *al.*, 2016 ; Wang et *al.*, 2018 ; Sahli et *al.*, 2020).

Nos résultats sont similaires à ceux obtenus dans d'autres études sur l'activité antibactérienne des pigments produits par des bactéries halophiles et halotolérantes. Par exemple, Suresh et *al.* (2015) ont observé que les pigments extraits de la souche *Halolactibacillus alkaliphilus* MSRD1 inhibent *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella paratyphi* et *Staphylococcus aureus*, avec des zones d'inhibition variant de 6 à 16 mm. De même, Ravikumar et *al.* (2016) ont rapporté que les pigments produits par la souche *Halomonas* sp. KT-02 inhibent la croissance d'*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella* sp., avec des diamètres d'inhibition allant de 9 à 12 mm.

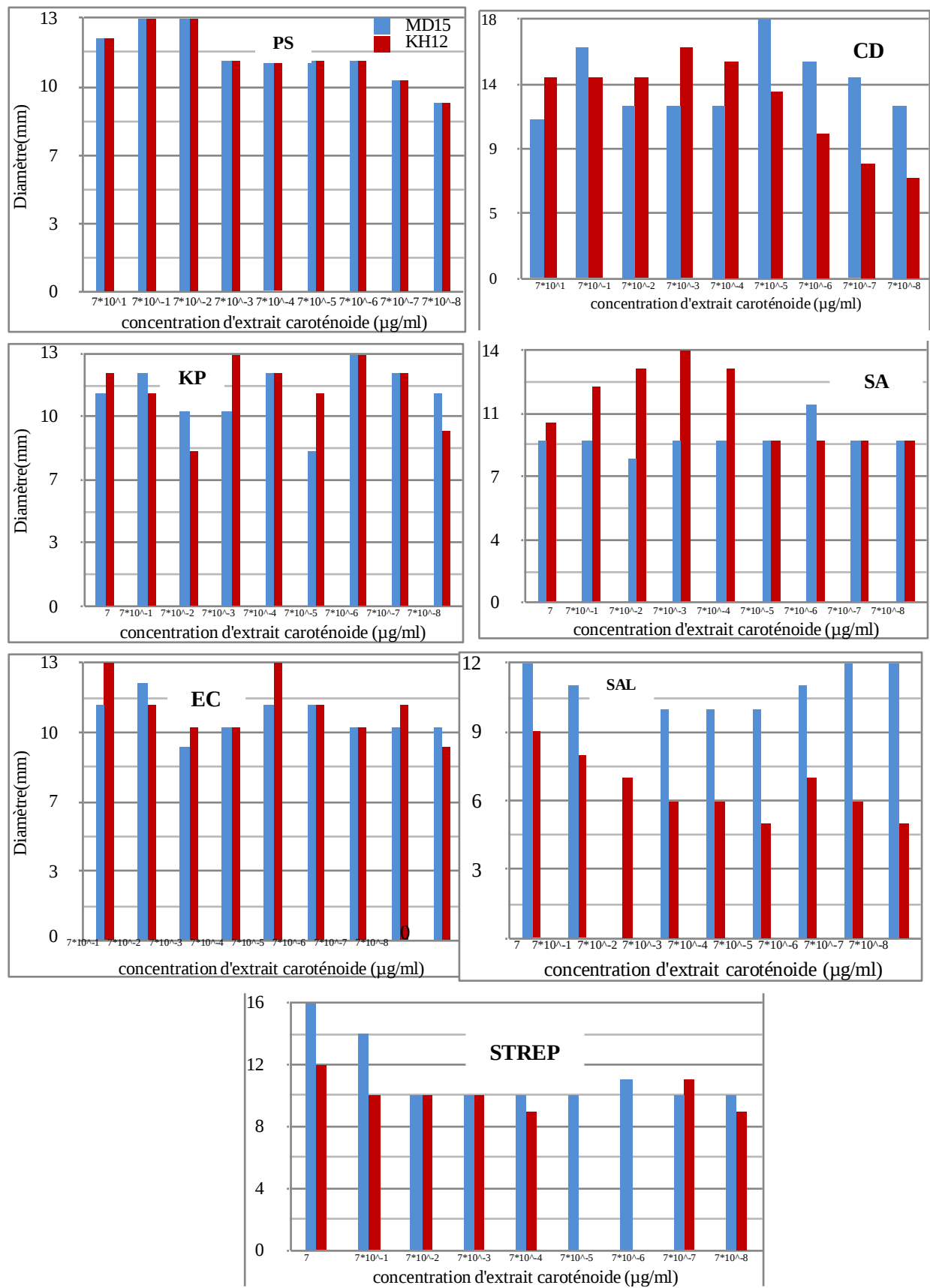


Figure 28. Le pouvoir antibactérien en fonction de la concentration d'extrait caroténoïdiques de la souche MD15 et KH12.

Parmi les souches testées, *Streptococcus aureus*, une bactérie à Gram positif, s'est avérée être plus sensible aux extraits caroténoïdiques que *Escherichia coli*, une bactérie à Gram négatif. Cette différence pourrait être attribuée à la structure différente de leur paroi cellulaire.

Les bactéries à Gram négatif possèdent une membrane externe qui entoure leur paroi cellulaire, formant une barrière imperméable aux composés hydrophobes et aux molécules de poids moléculaire élevé grâce aux lipopolysaccharides et aux porines. En revanche, la paroi des bactéries à Gram positif, bien que constituée principalement de peptidoglycane, ne présente pas cette perméabilité sélective, ce qui limite principalement la diffusion des molécules de plus de 50 kDa (Basli et al., 2012).

On note que pour les souches *Streptococcus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* le pouvoir antibactérien est proportionnel à l'augmentation de la concentration. Cependant, la souche *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* et *Candida albicans* leur pouvoir antibactérien augmente avec la concentration décroissante.

Pour les souches *Streptococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Candida albicans* et *Klebsiella pneumoniae*, l'effet antibactérien semble augmenter proportionnellement à la concentration. En revanche, pour *Staphylococcus aureus*, l'efficacité antibactérienne semble croître avec une faible concentration.

➤ Les souches fongiques

D'après les résultats du tableau C Annexe 05, il semble que les extraits caroténoïdiques montrent une sensibilité plus marquée envers les bactéries pathogènes humaines qu'envers les phytopathogènes.

Il est observé que le diamètre d'inhibition des deux extraits contre les deux phytopathogènes est de 6mm après sept jours d'incubation à température ambiante (le diamètre du disque). La croissance de ces phytopathogènes n'est donc pas affectée par les extraits caroténoïdiques.

On constate qu'après sept jours d'incubation à une température ambiante le diamètre d'inhibition pour les deux extraits contre les deux phytopathogène est inférieur à 6mm (le

diamètre du disque). En conséquence que nous extrait caroténoïdique ont aucun effet sur la croissance de ces phytopathogènes.

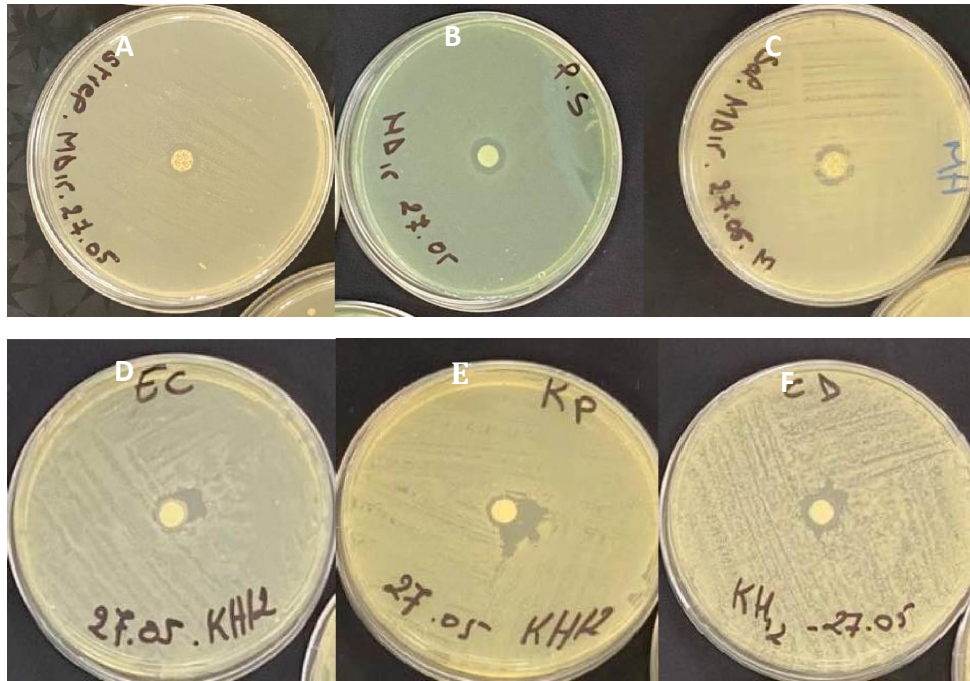


Figure 29. Exemples de pouvoir antibactérien des extraits caroténoïdiques. A : extrait de la souche MD15 contre *Streptococcus aureus* ; B : extrait de la souche MD15 contre *Pseudomonas aeruginosa* ; C : extrait de la souche MD15 contre *Salmonella* ; D : extrait de la souche KH12 contre *Escherichia coli* ; E : extrait de la souche KH12 contre *Klebsiella pneumoniae* ; F : extrait de la souche KH12 contre *Candida albicans*.

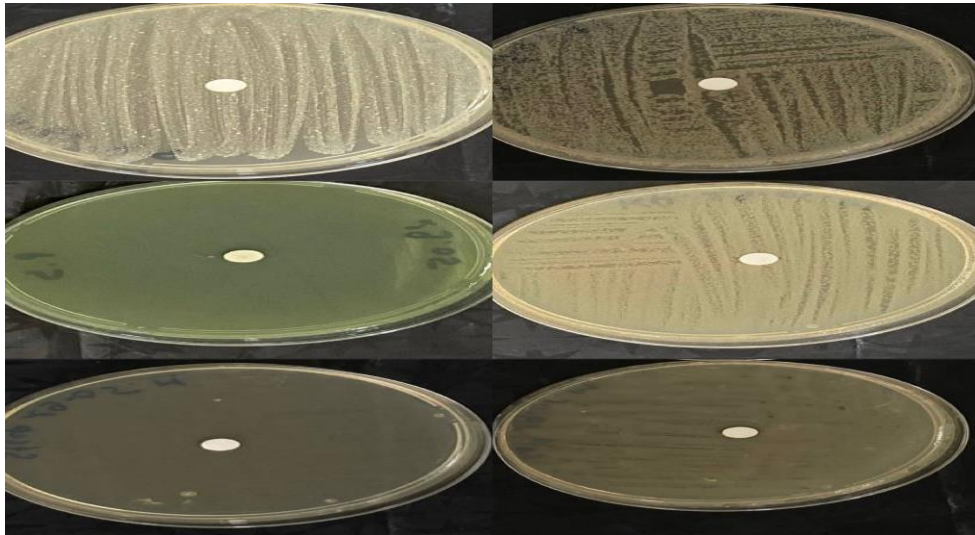


Figure 30. Le contrôle négatif du pouvoir anti bactérien de solvant chlorometanolique contre les souches testées

Conclusion générale

Les Archaea halophiles extrêmes dominent les milieux hypersalins. Elles sont capables de maintenir l'équilibre de leur pression osmotique cellulaire et de résister aux effets dénaturants des sels. En réponse à ces conditions difficiles, ces microorganismes ont développé au cours de l'évolution un large éventail de voies métaboliques. Par conséquent, ils représentent une source potentielle de biomolécules d'intérêt industriel et biotechnologique, notamment les pigments.

Notre étude visait principalement à examiner les aspects morphologiques et biochimiques des souches archéennes élaborer par l'unité de recherche « MétaGénomique et BioMathématique » (MGBM), à améliorer leur capacité de production de caroténoïdes, ainsi qu'à évaluer les propriétés oxydantes et antibactériennes de ces composés.

L'examen physico-chimique des échantillons a révélé un pH neutre à légèrement basique, une salinité élevée avec une prédominance des ions sodium et chlorure, ainsi que la présence de ions magnésium, sulfate et calcium

Les deux souches sont caractérisées par leur halophilie extrême, leur mésophilie et leur neutrophilie. Elles sont toutes de Gram négatif et présentent une morphologie cellulaire varient selon la souche, cocci, en paire ou en chaînette. Leur production de caroténoïdes varie d'une souche à l'autre, avec des quantités mesurées entre 0,1 et 3,42 µg/mL.

Cette étude aussi fait état d'une production accrue du caroténoïde total par les deux souches en utilisant une approche RSM-CCD basée sur logiciel Minitab 14.2 et ces stratégies et processus de fermentation ont permis d'augmenter la productivité.

L'évaluation du pouvoir antioxydant in vitro à l'aide des tests de piégeage des radicaux libres et de réduction du Fer a révélé que nos extraits caroténoïdiques présentent un potentiel antioxydant élevé. Les souches KH12 et MD15 ont montré des EC50 presque similaires à celle de l'antioxydant standard (acide ascorbique).

Nos extraits caroténoïdiques ont également été testés pour leur activité antimicrobienne contre deux catégories de microorganismes : une première catégorie comprenant 6 souches bactériennes pathogènes pour l'homme et une levure, et une seconde catégorie comprenant 2 souches phytopathogènes, en utilisant la méthode de diffusion sur disque. Les résultats ont montré des zones d'inhibition variables, allant de 0 à 16 mm, indiquant une activité

antimicrobienne variable selon la souche testée. L'extrait caroténoïdique de la souche KH12 a démontré l'activité inhibitrice la plus marquée contre les microorganismes pathogènes pour l'homme. En revanche, aucun effet n'a été observé contre les phytopathogènes avec les extraits caroténoïdiques des deux souches.

Ces résultats soulignent que la production de caroténoïdes par biosynthèse microbienne est une alternative à la synthèse chimique conventionnelle et à la production végétale.

Il apparaît clair, sur la base des résultats obtenus, que cette recherche possède plusieurs implications pratiques. En effet, les caroténoïdes peuvent efficacement servir comme colorants pour la volaille, le bétail et les aliments pour poissons. Autres applications très prometteuses sont liés à la biomédecine (antioxydants, antitumoraux, agents de prévention des maladies du cœur, précurseurs de la vitamine A et activateurs de la production d'anticorps).

Cependant, Plusieurs pistes restent à explorer quant à l'utilisation de ce pigment.

- Tout d'abord, des essais de mise à l'échelle (scaling-up) s'avèrent indispensables pour assurer l'éventuelle production industrielle du pigment caroténoïde.
- Tester des substrats bon marché tels que le jus de date pour une approche économique et respectueuse de l'environnement.
- Optimiser la production des caroténoïdes des souches halophiles extrêmes en impliquant d'autres paramètres opératoires tels que les sources d'ions métalliques, aération et autres inducteurs des caroténoïdes.

Références Bibliographiques

- Abbes, M., H. Baati, S. Guermazi, C. Messina, A. Santulli, N. Gharsallah et E. Ammar. (2013). Biological properties of carotenoids extracted from *Halobacterium halobium* isolated from a Tunisian solar saltern. *BMC complementary and alternative medicine*, 13(1), 255. [<https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-255>].
- Abrevaya, X. C. (2013). Features and Applications of Halophilic Archaea. In O. V. Singh Ed. *Extremophiles*: Springer, p. 123-158. [<https://doi.org/10.1002/9781118394144.ch5>]
- Akmoussi-Toumi, S., S. Khemili-Talbi, S. Kebbouche-Gana, N. Lenchi-Izouine, M. Khelfaoui, A. Sayah, G. Bouarab, I. Ferrioune, W. Mokhtari et A. Najjari. (2020). Diversity of Culturable Halophilic Archaea and Bacteria from Chott Tinsilt and El Malah Salt-Lake in Algeria. *Current Research in Bioinformatics*, 8(1), 46-54.[<https://doi.org/10.3844/ajbsp.2019.46.54>]
- Alfonzo, A., W. Randazzo, M. Barbera, C. Sannino, O. Corona, L. Settanni, G. Moschetti, A. Santulli et N. Francesca. (2017) Effect of salt concentration and extremely halophilic archaea on the safety and quality characteristics of traditional salted anchovies. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 26(5), 620-637. [<https://doi.org/10.1080/10498850.2016.1251521>]
- Amoozegar, M. A., M. Siroosi, S. Atashgahi, H. Smidt et A. Ventosa. (2017) Systematics of haloarchaea and biotechnological potential of their hydrolytic enzymes. *Microbiology*, 163(5), 623-645. [<https://doi.org/10.1099/mic.0.000463>]
- Amoozegar, M. A., M. Siroosi, S. Atashgahi, H. Smidt et A. (2017) Ventosa. Systematics of haloarchaea and biotechnological potential of their hydrolytic enzymes. *Microbiology*, 163(5), 623-645. [<https://doi.org/10.1099/mic.0.000463>]
- Andrei, A.-Ş., H. L. Banciu et A. Oren.(2012) Living with salt: metabolic and phylogenetic diversity of archaea inhabiting saline ecosystems. *FEMS Microbiology Letters*, 330(1), 1-9. [<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02526.x>]
- Asker, D., T. Awad et Y. Ohta. Lipids of *Haloferax alexandrinus* strain TMT: an extremely halophilic canthaxanthin-producing archaeon. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2002, 93(1), 37-43. [[https://doi.org/10.1016/s1389-1723\(02\)80051-2](https://doi.org/10.1016/s1389-1723(02)80051-2)]
- Averhoff.B.,Muller.V .(2010) Exploring research frontiers in microbiology: recent advances in halophilic and thermophilic extremophiles.*ResearchinMicrobiology*.161,506-514
- Balraj, J., K. Pannerselvam et A. Jayaraman. (2014) Isolation of pigmented marine bacteria *Exiguobacterium* sp. from peninsular region of India and a study on biological activity of purified pigment. *International Journal of Science and Technology Research*, 3(3), 375-384.
- Basli, A., M. Chibane, K. Madani et N. Oukil. (2012) Activité antibactérienne des polyphénols extraits d’une plante médicinale de la flore d’Algérie: *Origanum glandulosum* Desf. *Phytothérapie*, 10(1), 2-9. [<https://doi.org/10.1007/s10298-012-0683-9>]
- Besse, A., J. Peduzzi, S. Rebuffat et A. Carré-Mlouka. (2015) Antimicrobial peptides and proteins in the face of extremes: Lessons from archaeocins. *Biochimie*, 118, 344-355. [<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.06.004>]
- Bonete, M. J. et R. M. Martínez-Espinosa. (2011) Enzymes from Halophilic Archaea: Open Questions. In A. Ventosa, A. Oren et Y. Ma eds. *Halophiles and Hypersaline Environments: Current Research and Future Trends*. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, p. 359-371. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-45796-2_19]
- Bowers, K. J. et J. Wiegel. (2011) Temperature and pH optima of extremely halophilic archaea: a mini-review. *Extremophiles*, 15(2), 119-128. [<https://doi.org/10.1007/s00792-010-0347-y>]
- Bowers, K.J., Mesbah, N.M., Wiegel, J. (2009). Biodiversity of poly-extremophilic bacteria: does combining the extremes of high salt, alkaline pH and elevated temperature approach a doi:10.3390/md16100372

- Britton, G., S. Liaaen-Jensen et H. Pfander. (1995) Carotenoids, Volume 1B: Spectroscopy. Edition ed. : Birkhäuser Basel, ISBN 9783764329099.
- Calegari-Santos, R., R. A. Diogo, J. D. Fontana et T. M. B Bonfim. (2016) Carotenoid production by halophilic Archaea under different culture conditions. *Current Microbiology*, 72(5), 641-651. [<https://doi.org/10.1007/s00284-015-0974-8>]
- Charlesworth, J. et B. P. Burns. (2016) Extremophilic adaptations and biotechnological applications in diverse environments. *AIMS Microbiol*, 2(3), 251 -261. [<https://doi.org/10.3934/microbiol.2016.3.251>]
- De Freitas Araújo, M. G., F. Hilário, W. Vilegas, L. C. Dos Santos, I. L. Brunetti, C. E. Sotomayor et T. M. Bauab. (2012) Correlation among antioxidant, antimicrobial, hemolytic, and antiproliferative properties of *Leiothrix spiralis* leaves extract. *International journal of molecular sciences*, 13(7), 9260-9277. [<https://doi.org/10.3390/ijms13079260>]
- De La Haba, R. R., C. Sánchez-Porro, M. C. Marquez et A. Ventosa. (2011) Taxonomy of Halophiles. In K. Horikoshi ed. *Extremophiles Handbook*. Tokyo : Springer Japan, p. 255-308. [https://doi.org/10.1007/978-4-431-53898-1_13]
- De La Vega, M., A. Sayago, J. Ariza, A. G. Barneto et R. León. (2016) Characterization of a bacterioruberin producing Haloarchaea isolated from the marshlands of the Odiel river in the southwest of Spain. *Biotechnology progress*, 32(3), 592-600. [<https://doi.org/10.1002/btpr.2248>]
- Del Campo JA, García-González M. (2007), Guerrero MG Culture extérieure de microalgues pour la production de caroténoïdes : état actuel et perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnologie*. 74 : 1163-1174. est-ce que je: 10.1007/s00253-007-0844-9.
- Dyall-Smith, M. et A. Oren. (2006) Culture-dependent study of microbial diversity of lake Chaka. *Applied and environmental microbiology*, 72(11), 7427. [<https://doi.org/10.1128/aem.01401-06>]
- Dyall-Smith, M. et A. Oren. (2006), Culture-dependent study of microbial diversity of lake Chaka. *Applied and environmental microbiology*, 72(11), 7427. [<https://doi.org/10.1128/aem.01401-06>]
- Edbeib, M. F., R. A. Wahab et F. Huyop. (2016), Halophiles: biology, adaptation, and their role in decontamination of hypersaline environments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(8), 135. [<https://doi.org/10.1007/s11274-016-2081-9>]
- Edbeib.M.F., Wahab.A.R. , Huyop.F .(2016), Halophiles : biologie, adaptation et leur rôle dans la décontamination des milieux hypersalins. *World J Microbiol Biotechnol*. 32:135
- Elbanna, K., I. M. Ibrahim et A.-M. Revol-Junelles.(2015), Purification and characterization of haloalkali-thermophilic protease from *Halobacterium* sp. strain HP25 isolated from raw salt, Lake Qarun, Fayoum, Egypt. *Extremophiles*, 19(4), 763-774. [<https://doi.org/10.1007/s00792-015-0752-3>]
- Enache, M., G. Teodosiu, T. Itoh, M. Kamekura et H. Stan-Lotter. (2017), Halophilic microorganisms from man-made and natural hypersaline environments: Physiology, ecology, biotechnological potential. In *Adaption of Microbial Life to Environmental Extremes*. : Springer, p. 201-226.[https://doi.org/10.1007/978-3-319-48327-6_8]
- Falb, M., K. Müller, L. Königsmaier, T. Oberwinkler, P. Horn, S. Von Gronau, O. Gonzalez, F. Pfeiffer, E. Bornberg-Bauer et D. Oesterhelt.(2008), Metabolism of halophilic archaea. *Extremophiles*, 12(2), 177-196. [<https://doi.org/10.1007/s00792-008-0138-x>]
- Fang, C.-J., K.-L. Ku, M.-H. Lee et N.-W. (2010), Su. Influence of nutritive factors on C50 carotenoids production by *Haloferax mediterranei* ATCC 33500 with two-stage cultivation. *Bioresource technology*, 101(16), 6487-6493. [<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.044>]

- Fariq, A., Yasmin, A. & Jamil, M. (2019). Production, caractérisation et activités antimicrobiennes des biopigments par *Aquisalibacillus elongatus* MB592, *Salinicoccus sesuvii* MB597 et *Halomonas aquamarina* MB598 isolés de la gamme de sel de Khewra, Pakistan. *Extremophiles* 23, 435–449. <https://doi.org/10.1007/s00792-019-01095-7>
- Farkas, Á., T. Bencsik et J. Deli. (2020). Carotenoids as Food Additives. In: E. Jacob-Lopes, M. ueiroz et L. Zepka eds. *Pigments from Microalgae Handbook*. Cham : Springer International Publishing, p. 421-474. [https://doi-org443.webvpn.jnu.edu.cn/10.1007/978-3-030-50971-2_17]
- Fathepure .BZ. (2014) Recent studies in microbial degradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments. *Front Microbiol* 5:173. doi:10.3389/fmicb.2014.00173
- Fendrihan, S., A. Legat, M. Pfaffenhuemer, C. Gruber, G. Weidler, F. Gerbl et H. Stan-Lotter. (2006), Extremely halophilic archaea and the issue of long-term microbial survival. *Re/views in environmental science and bio/technology*, 5(2-3), 203-218. [<https://doi.org/10.1007/s11157-006-0007-y>]
- Fernandes, A. S., T. C. Do Nascimento, E. Jacob-Lopes, V. V. De Rosso et L. Q. Zepka. (2018), Carotenoids: a brief overview on its structure, biosynthesis, synthesis, and applications. *Progress in Carotenoid Research*, 1. [<https://doi.org/10.5772/intechopen.79542>]
- Franzmann, P. D., E. Stackebrandt, K. Sanderson, J. K. Volkman, D. E. Cameron, P. L. Stevenson, T. A. Mcmeekin et H. R. Burton. (1988), *Halobacterium lacusprofundi* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from Deep Lake, Antarctica. *Systematic and Applied Microbiology*, 11(1), 20-27. [[https://doi.org/10.1016/s0723-2020\(88\)80044-4](https://doi.org/10.1016/s0723-2020(88)80044-4)]
- Gallen, C. et J. Pla. (2013), Allergie et intolérance aux additifs alimentaires. *Revue Française d'Allergologie*, 53, 9-18. [[https://doi.org/10.1016/s1877-0320\(13\)70044-7](https://doi.org/10.1016/s1877-0320(13)70044-7)]
- Ghosh, S., S. Kumar et S. K. Khare. (2019), Microbial diversity of saline habitats: An overview of biotechnological applications. In B. Giri et A. Varma eds. *Microorganisms in Saline Environments: Strategies and Functions*. Cham : Springer International Publishing, p. 65-92. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-18975-4_4]
- Giani, M., I. Garbayo, C. Vílchez et R. M. Martínez-Espinosa. (2019) Haloarchaeal carotenoids: healthy novel compounds from extreme environments. *Marine drugs*, 17(9), 524. [<https://doi.org/10.3390/md17090524>]
- Giddings, L.-A. et D. J. Newman.(2019) Bioactive compounds from terrestrial Extremophiles. In L. A. Giddings et D.J. Newman eds. *Bioactive Compounds from Terrestrial Extremophiles*. Cham : Springer International Publishing, p. 1-75. [https://doi.org/10.1007/978-3-319 13260-0_1]
- Gupta, R. S., S. Naushad et S. Baker.(2015) Phylogenomic analyses and molecular signatures for the class Halobacteria and its two major clades: a proposal for division of the class Halobacteria into an emended order Halobacteriales and two new orders, Haloferacales ord. nov. and Natrialbales ord. nov., containing the novel families Haloferacaceae fam. nov. and Natrialbaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(3), 1050-1069. [<https://doi.org/10.1099/ijs.0.070136-0>]
- Gupta, R. S., S. Naushad, R. Fabros et M. Adeolu. A.(2016) phylogenomic reappraisal of familylevel divisions within the class Halobacteria: proposal to divide the order Halobacteriales into the families Halobacteriaceae, Haloarculaceae fam. nov., and Halococcaceae fam. nov., and the order Haloferacales into the families, Haloferacaceae and Halorubraceae fam nov. *Antonie van Leeuwenhoek*, 109(4), 565-587. [<https://doi.org/10.1007/s10482-016- 0660-2>]
- Hacène, H., F. Rafa, N. Chebhouni, S. Boutaiba, T. Bhatnagar, J. C. Baratti et B. Ollivier. (2004), Biodiversity of prokaryotic microflora in El Golea Salt lake, Algerian Sahara. *Journal of Arid Environments*, 58(3), 273-284.

- Hou J, Cui H-L.(2017) In vitro antioxidant, antihemolytic, and anticancer activity of the carotenoids from halophilic Archaea. *Curr Microbiol* ;75:266-71
- Hwang Chi Young, Eui-Sang Cho, Sungjun Kim, Kyobum Kim and Myung-Ji Seo (2024). Optimization of bacterioruberin production from *Halorubrum ruber* and assessment of its antioxidant potential. *Microbial Cell Factories* 23:2. <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02274-0>
- Inés Garbayo (2018). Optimization of Growth and Carotenoid Production by *Haloferax Kandler*, O. et H. König. Cell wall polymers in Archaea (Archaeobacteria). *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 1998, 54(4), 305-308. [<https://doi.org/10.1007/s000180050156>]
- Kates, M.(1996) Structural analysis of phospholipids and glycolipids in extremely halophilic archaeobacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 25(2), 113-128. [[https://doi.org/10.1016/0167-7012\(96\)00010-3](https://doi.org/10.1016/0167-7012(96)00010-3)]
- Kebbouche-Gana, S., M. L. Gana, S. Khemili, F. Fazouane-Naimi, N. A. Bouanane, M. Penninckx et H. Hacene.(2009) Isolation and characterization of halophilic Archaea able to produce biosurfactants. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36, 727–738. [<https://doi.org/10.1007/s10295-009-0545-8>]
- Kharroub, K. (2007) Identification et étude moléculaire des bactéries et des archéobactéries aérobies halophiles de la sebkha Ezzemoul (Ain M'Lila). Thèse de doctorat Université Mentouri. Constantine.
- Kharroub, K., M. Gomri, M. Aguilera et M. (2014) Monteoliva-Sánchez Diversity of hydrolytic enzymes in haloarchaea isolated from Algerian sabkhas. *African Journal of Microbiology Research* , 8(52), 3992-4001. [<https://doi.org/10.5897/AJMR2014.7183>]
- Klingl, A. (2014), S-layer and cytoplasmic membrane–exceptions from the typical archaeal cell wall with a focus on double membranes. *Frontiers in microbiology*, 2014, 5, 624. [<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00624>]
- Kumar, V. et S. K. Tiwari. (2019) Halocin diversity among halophilic archaea and their applications. In T. Satyanarayana, B.N. Johri et S.K. Das eds. *Microbial Diversity in Ecosystem Sustainability and Biotechnological Applications: Volume 1. Microbial Diversity in Normal & Extreme Environments*. Singapore : Springer Singapore, p. 497-532. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-8315-1_16]
- Machmudah, S. et M. Goto.(2013) Methods for Extraction and Analysis of Carotenoids. In K.G. Ramawat et J.-M. Mérillon eds. *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, p. 3367-3411. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_145]
- Majeed, H. Z. (2017) Antimicrobial activity of *Micrococcus luteus* carotenoid pigment. *AlMustansiriyah Journal of Science*, 28(1), 65-70. [<https://doi.org/10.23851/mjs.v28i1.314>].
- Mandelli, F., V. S. Miranda, E. Rodrigues et A. Z. Mercadante. Identification of carotenoids with high antioxidant capacity produced by extremophile microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012, 28(4), 1781-1790.[<https://doi.org/10.1007/s11274-011-0993-y>]
- Mart.v (2011) Adaptation de l'Archaea halophile *Halobacterium salinarum* aux stress environnementaux : mécanismes de survie et rôle de la protéolyse intracellulaire. l'Institut de Biologie Structurale
- Martinez G.M., Pire C., Martinez-Espinosa R.M. (2022). Hypersaline environments as natural sources of microbes with potential applications in biotechnology: The case of solar evaporation systems to produce salt in Alicante County (Spain).
- Martins, F. C. O. L., M. A. Sentanin et D. De Souza.(2019), Analytical methods in food additives determination: Compounds with functional applications. *Food Chemistry*, 272, 732 750. [<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.060>]
- mediterranei Using Response Surface Methodology. *Drugs*, 16, 372

- Menasria, T., M. Aguilera, H. Hocine, L. Benammar, A. Ayachi, A. Si Bachir, A. Dekak et M. Monteoliva-Sánchez. (2017) Diversity and bioprospecting of extremely halophilic archaea isolated from Algerian arid and semi-arid wetland ecosystems for halophilic-active hydrolytic enzymes. *Microbiological Research*, [https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.12.011] *Microbial Sciences*, 3 , art. no. 100136. https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100136
- Minegishi, H., A. Echigo, S. Nagaoka, M. Kamekura et R. Usami.(2010), *Halarchaeum acidiphilum* gen. nov., sp. nov., a moderately acidophilic haloarchaeon isolated from commercial solar salt. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(11), 2513- 2516. [https://doi.org/10.1099/ijs.0.013722-0]
- Montero-Lobato Zaida, Adrián Ramos-Merchante, Juan Luis Fuentes, Ana Sayago, Ángeles Fernández-Recamales, Rosa María Martínez-Espinosa, José María Vega, Carlos Vílchez and Inés Garbayo (2018). Optimization of Growth and Carotenoid Production by *Haloferax mediterranei* Using Response Surface Methodology. *Drugs*, 16, 372; doi:10.3390/md16100372
- Naghoni, A., G. Emtiazi, M. A. Amoozegar, M. S. Cretoiu, L. J. Stal, Z. Etemadifar, S. A. (2017), Shahzadeh Fazeli et H. Bolhuis. Microbial diversity in the hypersaline Lake Meyghan, Iran. *Scientific Reports*, 7(1), 115-122. [https://doi.org/10.1038/s41598-017-11585-3]
- Noby N., Sherine N. Khattab and Nadia A. Soliman (2023). Sustainable production of bacterioruberin carotenoid and its derivatives from *Arthrobacter agilis* NP20 on whey-based medium: optimization and product characterization. *Bioresources and Bioprocessing* 10:46. https://doi.org/10.1186/s40643-023-00662-3
- Oren, A., A. Ventosa et M. Kamekura. *Halobacteria*. (2017) In W. B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. DeVos, B. Hedlund et S. Dedysh eds. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. : John Wiley & Sons, Ltd, p. 1 - 5 . [https:// doi. org/ 10.1002/9781118960608.cbm00026.pub2]
- Oren, A. (2014a) Taxonomy of halophilic Archaea: current status and future challenges. *Extremophiles*, 18(5), 825-834. [https://doi.org/10.1007/s00792-014-0654-9]
- Oren, A.(2014b), The family Halobacteriaceae. *The Prokaryotes*, 41-121. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-38954-2_313]
- Rampelotto, P. H.(2013), *Extremophiles and extreme environments*. *Life*, 3(3), 482-485. [https://doi.org/10.3390/life3030482]
- Rao AV, Rao LG Caroténoides et santé humaine. *Pharmacol. Rés.* (2007) ; 55 : 207-216:10.1016/j.phrs.2007.01.012.
- Ravikumar, S., G. Uma et R. (2016), Gokulakrishnan. Antibacterial property of halobacterial carotenoids against human bacterial pathogens. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 75, 253-257.
- Recamales, R. M. Martínez-Espinosa, J. M. Vega, C. Vílchez et I. Garbayo.(2018), Optimization of growth and carotenoid production by *Haloferax mediterranei* using response surface methodology. *Marine drugs*, 2018, 16(10), 372. [https://doi.org/10.3390/md16100372]
- Rodrigo-Baños, M., I. Garbayo, C. Vílchez, M. J. Bonete et R. M. Martínez-Espinosa.(2015) Carotenoids from haloarchaea and their potential in biotechnology. *Marine drugs*, 13(9), 5508-5532. [https://doi.org/10.3390/md13095508]
- Rostami, H., H. Hamed et M. Yolmeh.(2016), Some biological activities of pigments extracted from *Micrococcus roseus* (PTCC 1411) and *Rhodotorula glutinis* (PTCC 5257). *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 2016 , 29 (4) , 684 - 695 . [https:// doi. org/ 10.1177/0394632016673846

- Santos, U. P., J. F. Campos, H. F. V. Torquato, E. J. Paredes-Gamero, C. A. Carollo, L. M. Estevinho, K. De Picoli Souza et E. L. Dos Santos.(2016), Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties as well as the phenolic content of the extract from *Hancornia speciosa* Gomes. *PLoS One*, 11(12), e0167531.[<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167531>]
- Schröder, C., C. Burkhardt et G. Antranikian. (2020), What we learn from extremophiles. *ChemTexts*, 6(1), 8. [<https://doi.org/10.1007/s40828-020-0103-6>]
- Silva, T. R., R. S. N. Tavares, R. Canela-Garayoa, J. Eras, M. V. N. Rodrigues, I. A. NeriNuma, G. M. Pastore, L. H. Rosa, J. a. A. Schultz, H. M. Debonisi, L. R. G. Cordeiro et V. M. Oliveira.(2019), Chemical characterization and biotechnological applicability of pigments isolated from antarctic bacteria. *Marine Biotechnology*, 21(3), 416-429. [<https://doi.org/10.1007/s10126-019-09892-z>]
- Singh, A. et A. K. Singh.(2017), Haloarchaea: worth exploring for their biotechnological potential. *Biotechnology Letters*, 39(12), 1793-1800. [<https://doi.org/10.1007/s10529-017-2434-y>]
- Squillaci, G., R. Parrella, V. Carbone, P. Minasi, F. La Cara et A. Morana.(2017), Carotenoids from the extreme halophilic archaeon *Haloterrigena turkmenica*: identification and antioxidant activity. *Extremophiles*, 21(5), 933-945. [<https://doi.org/10.1007/s00792-017-0954-y>]
- Srivastava, P. et M. Kowshik.(2015), Biosynthesis of nanoparticles from halophiles. In D.K. Maheshwari et M. Saraf eds. *Halophiles: Biodiversity and Sustainable Exploitation*. Cham : Springer International Publishing, p. 145-159. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-14595-2_4]
- Stan-Lotter, H. et S. Fendrihan.(2015) Halophilic Archaea: Life with Desiccation, Radiation and Oligotrophy over Geological Times. *Life*, 5(3), 1487-1496. [<https://doi.org/10.3390/life5031487>]
- Strati, I. F. et V.(2014) Oreopoulou Recovery of carotenoids from tomato processing by-products – a review. *Food Research International*, 65, 311-321. [<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.09.032>]
- Suresh, M., B. Renugadevi, S. Brammavidhya, P. Iyapparaj et P. (2015), Anantharaman Antibacterial activity of red pigment produced by *Halolactibacillus alkaliphilus* MSR1—an Isolate from Seaweed. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176(1), 185-195. [<https://doi.org/10.1007/s12010-015-1566-6>]
- Syutkin, A. S., M. G. Pyatibratov et O. V. Fedorov. (2014), Flagella of halophilic archaea: Differences in supramolecular organization. *Biochemistry (Moscow)*, 79(13), 1470- 1482. [<https://doi.org/10.1134/s0006297914130033>]
- Tenchov, B., E. M. Vescio, G. D. Sprott, M. L. Zeidel et J. C. Mathai.(2006), Salt tolerance of archaeal extremely halophilic lipid membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 281(15), 10016-10023. [<https://doi.org/10.1074/jbc.m600369200>]
- Torregrosa-Crespo, J., C. Pire et R. Martínez-Espinosa. Biocompounds from haloarchaea and their uses in biotechnology. In H. Sghaier, A. Najjari et K. Ghedira eds.(2017), *Archaea: New Biocatalysts, Novel Pharmaceuticals and Various Biotechnological Applications*. BoD–Books on Demand , p. 63-82. [<https://doi.org/10.5772/intechopen.69944>]
- Torregrosa-Crespo, J., R. M. Martínez-Espinosa, J. Esclapez, V. Bautista, C. Pire, M. Camacho, D. J. Richardson et M. J. Bonete.(2016) Chapter Two - Anaerobic metabolism in *Haloferax* genus: denitrification as case of study. In R.K. Poole ed. *Advances in Microbial Physiology*. : Academic Press, vol. 68, p. 41-85. [<https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2016.02.001>]
- Torregrosa-Crespo, J., Z. Montero, J. L. Fuentes, M. Reig García-Galbis, I. Garbayo, C. Vílchez et R. M. Martínez-Espinosa. (2018), Exploring the valuable carotenoids for the large-scale production by marine microorganisms. *Marine drugs*, 16(6), 203. [<https://doi.org/10.3390/md16060203>]
- Ventosa, A.(2006), Unusual micro-organisms from unusual habitats: hypersaline environments. In H.M. Lappin-Scott, N.A. Logan et P.C.F. Oyston eds. *Prokaryotic Diversity: Mechanisms and*

- Significance. Cambridge : Cambridge University Press, p. 223-254. [<https://doi.org/10.1017/cbo9780511754913.015>]
- Vílchez, C., E. Forján, M. Cuaresma, F. Bédmar, I. Garbayo et J. M. Vega.(2011) Marine carotenoids: biological functions and commercial applications. *Marine drugs*, 9(3), 319- 333. [<https://doi.org/10.3390/md9030319>]
- Wang, H., S. Liu, M. Zhao, J. Cao, B. Huang et Z. Niu. (2019), Research progress on the harm of illegal addition of industrial dyes in food. *Journal of Food Safety and Quality*, 10(1), 1- 7.
- Wang, L., Y. Wu, J. Xie, S. Wu et Z. Wu. (2018), Characterization, antioxidant and antimicrobial activities of green synthesized silver nanoparticles from *Psidium guajava* L. leaf aqueous extracts. *Materials Science and Engineering: C*, 86, 1-8. [<https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.01.003>]
- Yang, Y., R. Yatsunami, A. Ando, N. Miyoko, T. Fukui, S. Takaichi et S. Nakamura. (2015), Complete biosynthetic pathway of the C50 carotenoid bacterioruberin from lycopene in the extremely halophilic archaeon *Haloarcula japonica*. *Journal of bacteriology*, 197(9), 1614-1623. [<https://doi.org/10.1128/jb.02523-14>]
- Yin, J., J.-C. Chen, Q. Wu et G.-Q. (2015), Chen. Halophiles, coming stars for industrial biotechnology. *Biotechnology Advances*, 33(7), 1433-1442.[<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.008>]

Annexes

❖ Annexe 01

Composition du	NaCl	Mg So	K 2S	Amidon	Extrait de	Peptone	CaCl ₂	Eau distillé	pH
SH	140g	60g	5g	2g	2g	5g	0,1g	1L	7
SH modifier	100g	60g	5g	2g	2g	5g	0,1g	1L	6
	250g	60g	5g	2g	2g	5g	0,1g	1L	9
	100g	60g	5g	2g	2g	5g	0,1g	1L	6
	250g	60g	5g	2g	2g	5g	0,1g	1L	9
	100g	60g	5g	0,5g	0,5g	5g	0,1g	1L	6
	250g	60g	5g	0,5g	0,5g	5g	0,1g	1L	9
	100g	60g	5g	0,5g	0,5g	5g	0,1g	1L	6
	250g	60g	5g	0,5g	0,5g	5g	0,1g	1L	9
	100g	60g	5g	2g	0,5g	5g	0,1g	1L	6
	250g	60g	5g	2g	0,5g	5g	0,1g	1L	9
	100g	60g	5g	2g	0,5g	5g	0,1g	1L	6
	250g	60g	5g	2g	0,5g	5g	0,1g	1L	9
	100g	60g	5g	0,5g	2g	5g	0,1g	1L	6
	250g	60g	5g	0,5g	2g	5g	0,1g	1L	9
	100g	60g	5g	0,5g	2g	5g	0,1g	1L	6
	250g	60g	5g	0,5g	2g	5g	0,1g	1L	9
	25g	60g	5g	0,25	1,25g	5g	0,1g	1L	7,5
	325g	60g	5g	2,75	1,25g	5g	0,1g	1L	7,5
	175g	60g	5g	1,25	2,75g	5g	0,1g	1L	7,5
	175g	60g	5g	1,25	0,25g	5g	0,1g	1L	7,5
	175g	60g	5g	1,25	1,25g	5g	0,1g	1L	7,5
	175g	60g	5g	1,25	1,25g	5g	0,1g	1L	7,5
	175g	60g	5g	1,25	1,25g	5g	0,1g	1L	7,5
	175g	60g	5g	1,25	1,25g	5g	0,1g	1L	4,5
	175g	60g	5g	1,25	1,25g	5g	0,1g	1L	10,5

Tableau A. Composition des milieux de culture utilis

❖ Annexe 02

La préparation d'une solution de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) à une concentration de $100\ \mu\text{M}$ a été réalisée en utilisant précisément $0,0394\ \text{g}$ ($39,4\ \text{mg}$) de DPPH, calculés pour obtenir la concentration souhaitée. La quantité exacte de DPPH a été soigneusement pesée pour assurer l'exactitude de la concentration finale. Ensuite, les $0,0394\ \text{g}$ de DPPH ont été dissous dans $100\ \text{mL}$ de méthanol pur, un solvant approprié pour cette application en raison de sa capacité à dissoudre le DPPH de manière efficace et stable. Le processus de dissolution a été mené sous agitation douce afin de garantir une distribution uniforme du réactif dans le solvant. Par mesure de précaution, l'incubation de la solution de DPPH, a été réalisée à l'abri de la lumière pour préserver la stabilité du DPPH, sensible à la dégradation photochimique.

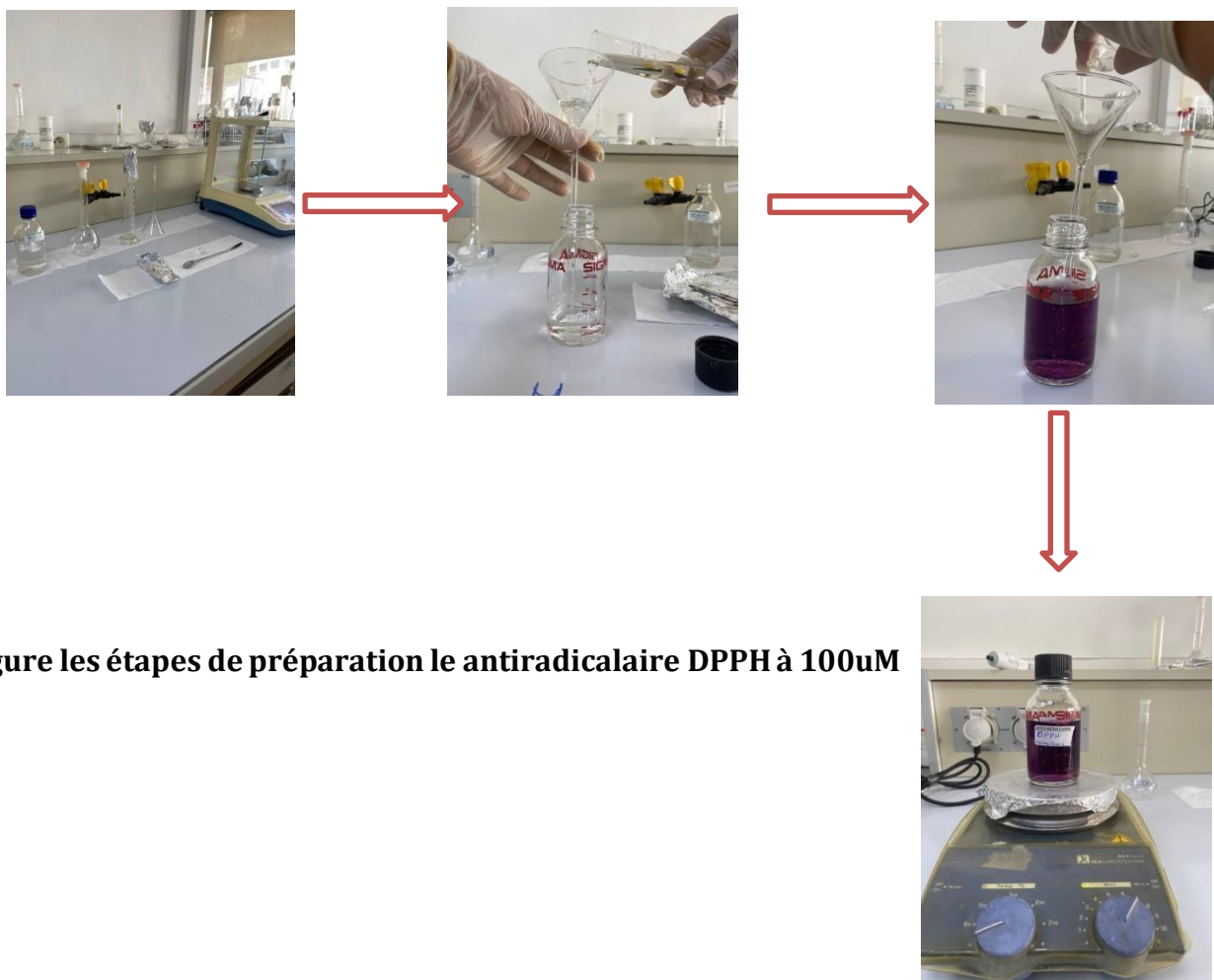


Figure les étapes de préparation le antiradicalaire DPPH à $100\ \mu\text{M}$

❖ Annexe 03

Pour préparer 100 mL d'une solution tampon phosphate à pH 6,6, commencez par peser avec précision 1,74 g de dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4). Dissolvez le KH_2PO_4 dans environ 80 mL d'eau distillée dans un bécher, en agitant doucement pour assurer une dissolution complète. Ensuite, ajustez le pH de la solution en ajoutant progressivement du phosphate disodique (Na_2HPO_4) tout en mesurant le pH avec un pH-mètre après chaque ajout. Continuez à ajuster jusqu'à ce que le pH de la solution atteigne 6,6. Une fois le pH stabilisé, complétez le volume à 100 mL avec de l'eau distillée en ajoutant prudemment le reste du volume nécessaire. Assurez-vous de mélanger la solution tampon soigneusement pour garantir une homogénéité avant de l'utiliser dans vos expériences ou tests biochimiques.

❖ Annexe 04

Tableau B : les résultats de la sensibilité aux antibiotiques

Antibiotique	La souche MD15	La souche KH12
Erytromycine	R é s i s t a n t e (la zone inférieure à 6)	R é s i s t a n t e (la zone inférieure à 6)
Kanamycine	R é s i s t a n t e (la zone inférieure à 6)	R é s i s t a n t e (la zone inférieure à 6)
Chloramphenicol	R é s i s t a n t e (la zone inférieure à 6)	R é s i s t a n t e (la zone inférieure à 6)
BCT	Sensible (zone de 18 mm)	Sensible (zone de 16mm)
Novomycine	Sensible (zone de 31 mm)	Sensible (zone de 30 mm)
Vancomycine	R é s i s t a n t e (la zone inférieure à 6)	R é s i s t a n t e (la zone inférieure à 6)
Céfépime	R é s i s t a n t e (la zone inférieure à 6)	R é s i s t a n t e (la zone inférieure à 6)
Acide Nalidixic	R é s i s t a n t e (la zone inférieure à 6)	R é s i s t a n t e (la zone inférieure à 6)
Pénicilline	R é s i s t a n t e (la zone inférieure à 6)	R é s i s t a n t e (la zone inférieure à 6)
Ciprofloxacine	R é s i s t a n t e (la zone inférieure à 6)	R é s i s t a n t e (la zone inférieure à 6)
Ampicilline	R é s i s t a n t e (la zone inférieure à 6)	R é s i s t a n t e (la zone inférieure à 6)
Tétracycline	Sensible (zone de 32 mm)	R é s i s t a n t e (la zone inférieure à 6)
Céfoxitine	R é s i s t a n t e (la zone inférieure à 6)	R é s i s t a n t e (la zone inférieure à 6)
Triméthoprim sulfaméthoxazole	Sensible (zone de 30 mm)	R é s i s t a n t e (la zone inférieure à 6)

Gentamicine	R é s i s t a n t e (la zone inférieure à 6)	R é s i s t a n t e (la zone inférieure à 6)
Streptomycine	R é s i s t a n t e (la zone inférieure à 6)	R é s i s t a n t e (la zone inférieure à 6)

Annexe 05

Les souches testés	7* 1 0 ⁻¹ µm/ ml	7* 1 0 ⁻¹ µm/ ml	7* 1 0 ⁻² µm/ ml	7*10 ⁻³ µm/ ml	7* 10 ⁻⁴ µm/ml	7* 1 0 ⁻⁵ µm/ ml	7*1 0 ⁻⁶ µm /	7*10 ⁻⁷ µm / ml	7* 1 0 ⁻⁸ µm/ ml
Les souches bactériennes									
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	12m m	10m m	10m m	10mm	11mm	12m m	12 m m	12m m	10m
<i>Escheichia coli</i> ATCC 25922	13 mm	11 mm	10 mm	10 mm	13 mm	11 mm	10 m m	11 mm	9 mm
<i>Staphylococcus aureus</i> ATTC 25923	10m m	12m m	13m m	14mm	13mm	9m m	9m m	9mm	9m m
<i>KP</i>	12m m	11m m	8m m	13mm	12mm	11m m	13 m	12m m	9m m
<i>Salmonella</i>	9m	8m	7m	6mm	6mm	6m	6m	6mm	6m
<i>Streptococcus</i>	12m	10m	10m	10mm	9mm	0m	0m	11m	9m
Les souches fungiques									
<i>C a n d i d a Albicans</i> ATCC 27853	14m m	14m m	14m m	16mm	15mm	13m m	10m m	8m m	7m m
<i>Alternaria</i>	6m	6m	6m	6mm	6mm	6m	6m	6m	6m
<i>Verticilium</i>	6m	6m	6m	6mm	6mm	6m	6m	6m	6m

Tableau C : les résultats de l'activité antibactérienne des différents concentrations d'extrait caroténoidique KH12

Les souches testés	7* 1 0 - 1 µm/ ml	7* 1 0 - 1 µm/ ml	7* 1 0 - 2 µm/ ml	7*10- 3 µm/ ml	7* 10 -4 µm/ml	7* 1 0 - 5 µm/ ml	7*1 0 - 6 /	7*10 - 7 µm / ml	7* 1 0 - 8 µm/ ml
Les souches bactériennes									
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	12m m	10m m	10m m	10mm	11mm	12m m	12 m m	12m m	10m
<i>Escheichia coli</i> ATCC 25922	11 mm	12 mm	9 mm	10 mm	11 mm	11 mm	10 m	10 mm	10 mm
<i>Staphylococcus aureus</i> ATTC	9 mm	9 mm	8 mm	9 mm	9 mm	9m m	11 m m	9mm	9m m
<i>KP</i>	11m m	12m m	10m m	10mm	12mm	8m m	13 m	12m m	11m m
<i>Salmonella</i>	12m m	11m m	0m m	10mm	10mm	10m m	11 m	12m m	12m m
<i>Streptococcus</i>	16m m	14m m	10m m	10mm	10mm	10m m	10 m	10m m	10m m
Les souches fungiques									
<i>C a n d i d a Albicans</i> ATCC	11m m	16m m	12m m	12mm	12mm	18m m	15m m	14 mm	12m m
<i>Alternaria</i>	6m	6m	6m	6mm	6mm	6m	6m	6m	6m
<i>Verticilium</i>	6m	6m	6m	6mm	6mm	6m	6m	6m	6m

Tableau C : les résultats de l'activité antibactérienne des différents concentrations d'extrait caroténoïdique MD15