

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*  
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences et de la Nature et de la Vie  
Département de Microbiologie.  
Filière : Biologie.  
Option : Biotechnologie Microbienne.



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle  
En vue de l'obtention du diplôme

**MASTER**

***Thème***

**Isolement, caractérisation et optimisation  
de la production de molécules bioactives  
d'une souche d'actinomycète : *Streptomyces*  
sp. SRC3**

Présenté par :

M<sup>elle</sup> RABIA FARIDA & M<sup>elle</sup> RAHMOUNI SIHAM

Soutenu le : **14 Juin 2015**

Devant le jury composé de :

Mr KECHA Mouloud	professeur	Président
Melle. DJINNI Ibtissem	MCB	Encadreur
Mme. BOUDRIES_ SOUAGUI Samiha	MAA	Examineur
Mme . ARKOUB_ DJOUDI Warda	MCB	Co-encadreur

**Année universitaire : 2014 / 2015**

# *Remerciements*

*Remercions tout d'abord Dieu tout puissant de m'avoir donné la force de réaliser ce travail*

*Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et nos vifs remerciement à : Notre promotrice M<sup>elle</sup> DJINNI Ibtissem, qui a accepté de nous accueillir dans le laboratoire de microbiologie. Nous lui témoignons, nos gratitude et nos reconnaissances.*

*Nos remerciements s'adressent aussi à M<sup>me</sup> ARKOUB Warda, notre Co-promotrice. Qui nous a prodigé de précieux conseils, de ses orientations, ses encouragements qui nous ont permis de mener à bien ce travail.*

*Nous tenons à remercier les membres de jury: M<sup>r</sup> KECHA Mouloud et M<sup>me</sup> BOUDRIES\_SOUAGUI Samiha, qui ont évalué notre travail pendant notre soutenance.*

*Nous remercions l'ensemble du personnel du laboratoire pour nous avoir permit d'effectuer les différents tests et analyses et pour avoir mis à notre disposition le matériel et les moyens nécessaires à la réalisation de notre travail*

*Nous tenons à exprimer nos sentiments de reconnaissance à toutes les personnes qui ont participé à ce travail, qui nous ont appris une infinité de choses et qui nous ont aidé, conseillé et soutenu à tout moment afin de réaliser ce travail dans les meilleurs conditions.*

*Siham & Frida*

# *Dédicaces*

*J'ai le plaisir de dédier ce modeste travail :*

*A la mémoire de mon très chère père, à qui je dois tout, tant le souvenir de ses conseils, de son soutien dans les moments importants de ma vie et de ses encouragements qui m'ont permis d'aller de l'avant. Que dieu l'accueille dans son vaste paradis.*

*A celle qui est mon exemple de la réussite, que j'ai tant aimé et respecté, qui m'a donnés de l'amour ; de la tendresse, du soutien et de la force, ma très chère mère, que Dieu te protège et te prête longue et heureuse vie.*

*A mes chers frères et sœurs qui m'ont soutenu sur tous les plans, aux quels je souhaite beaucoup de réussite et tout le bonheur du monde. Qu'ils trouvent dans ce travail la preuve modeste d'une reconnaissance infinie et d'un profond amour.*

*A mes très chères amies Farida, Meriem, Manel, Lynda, Siham, Sonia et Rima, ensemble nous avons partagés d'agréables moments tout au long de la réalisation de ce travail et durant notre cursus universitaire.*

*SIHAM*

# *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail aux êtres les plus chers  
au monde :*

*A ceux qui sont mon exemple de réussite, que j'ai  
tant aimés et respectés, qui m'ont donné de l'amour ;  
de la tendresse, du soutien et de la force, mes très  
chers parents, que Dieu vous protège et vous prête  
longue et heureuse vie, que ce travail soit le  
témoignage profond de mon amour.*

*A mes très chers frères Karim, Zouheir et Bilal  
Qui m'ont soutenu avec leurs encouragements qui  
m'ont mené à cet aboutissement, auxquels je souhaite  
beaucoup de réussite et tout le bonheur du monde.*

*A mes très chères amies, Siham, Meriem, Manel,  
Dalila, Dania, Siham et Sonia ensemble nous avons  
partagés d'agréables moments tout au long de la  
réalisation de ce travail et durant notre cursus  
universitaire.*

*FARIDA*

Tableau N°	Titre	Page
I	Valeurs extrêmes des paramètres opératoires étudiés	16
II	Matrice d'expériences de "Plackett et Burman"	16
III	Matrice d'expériences pour le germe <i>C. albicans</i>	17
IV	Matrices d'expériences correspondantes aux bactéries tests pour $k=1$ et $N= 2 (2^k)$	17
V	Les valeurs extrêmes des paramètres opératoires étudiés	18
VI	Activité antagoniste, exprimée en zones d'inhibition, des 39 souches d'actinomycètes isolées à partir de sédiments de rivière	21
VII	Caractéristiques macromorphologiques de la souche SRC3 après 21 jours d'incubation sur les différents milieux ISP à 28°C	25
VIII	Caractéristiques macromorphologiques de la souche SRC3 après 3, 7, 14, 21 jours d'incubation, à 28°C	Annexe III
XI	Caractéristiques physiologiques et biochimique de l'isolat SRC3	27
X	Moyenne des zones d'inhibition obtenues par le plan PB sur les 13 milieux de culture à l'égard de différents germes cibles	29
XI	Caractéristiques morphologiques de la souche SRC3 après 10 jours d'incubation à 28°C sur les différents milieux de Czapeck	Annexe V
XII	Matrice des expériences pour $k = 3$ et $N = 8 (2^k)$	32
XIII	Valeurs de diamètre des zones d'inhibition au centre du domaine d'étude	32
XIV	Valeurs des coefficients de régression	32 et 33
XV	Les Valeurs de $t_j$	34
XVI	Les Valeurs des paramètres du plan en étoile	36
XVII	Les valeurs des coefficients du modèle de second degré avec interaction	36
XVIII	Les valeurs de $t_j$	37
XIX	les moyennes de diamètre des zones d'inhibition (Y) pour les 2 germes cibles	39
XX	Valeurs des zones d'inhibition au centre du domaine d'étude	40
XXI	les valeurs des coefficients de régression pour les 2 germes testés	40
XXII	Les valeurs de $t_j$ pour les 2 germes cibles	40
XXIII	Les valeurs des coefficients du modèle de second degré correspondants aux germes <i>Vibrio cholerae</i> et SARM	41
XXIV	Les valeurs de $t_j$ des deux germes cibles	42



Figure N°	Titre	Page
1	Morphologies des actinomycètes rencontrées au cours de cultures liquides	2
2	Cycle de développement du genre <i>Streptomyces</i> sur milieu solide	4
3	Vue d'ensemble du site de prélèvement : Oued Ziama (Ziama Mansouriah)-Jijel	11
4	La mise en évidence de l'activité antimicrobienne des isolats d'actinomycètes sur milieu Mueller-Hinton par la méthode des cylindres d'agar	13
5	Histogramme du nombre d'isolats d'actinomycètes obtenus en fonction des trois milieux de culture sélectifs utilisés	19
6	Taux d'activité antimicrobienne des 36 isolats d'actinomycètes à l'égard des germes cibles testé.	22
7	Activité antagoniste de l'isolat SRC3 à l'égard de 4 bactéries cibles	23
8	Activité antagoniste de l'isolat SRC3 à l'égard des germes cibles sur 3 milieux de culture différents	23
9	Activité antagoniste de l'isolat SRC3 à l'égard de (a) <i>V. cholerae</i> , (b) SARM et (c) <i>C. albicans</i>	24
10	Macromorphologie de la souche SRC3 sur les milieux de culture ISP et Czapeck après 21 jours d'incubation à 28°C.	25
11	La micromorphologie de la souche SRC3 observée au microscope optique aux grossissements (10x1.25) et( 100x1.25) après coloration de Gram	26
12	Effet des paramètres de culture, étudiés sur milieu Czapeck, sur l'activité antibactérienne de la souche SRC3 vis-à-vis de SARM	29
13	Effet des paramètres de culture, étudiés sur milieu Czapeck, sur l'activité antibactérienne de la souche SRC3 vis-à-vis de <i>V. cholerae</i>	30
14	Effet des paramètres de culture, étudiés sur milieu Czapeck, sur l'activité antimicrobienne de la souche SRC3 vis-à-vis de <i>C. albicans</i>	30
15	surface de réponse (a) et courbe isoreponse (b) pour $x_2 = 0$	38

**Liste des abréviations**

**ATTC** : American Type Culture Collection

**DAP** : Acide Diaminopimélique

**DAB** : Acide diaminobutyrique

**GYEA**: Glucose-Yeast- Extract Agar

**ISP** : International *Streptomyces* Project

**PB** : Plackett et Burman

**V.C.R** : Variable Centré Réduite



**Liste des tableaux**  
**Liste des figures**  
**Liste des abréviations**

<b>Introduction</b> .....	1
---------------------------	---

## PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralité sur les actinomycètes .....	2
II. Ecologie, taxonomie et importance des actinomycètes.....	3
1. Ecologie des actinomycètes.....	3
2. Cycle de développement des actinomycètes .....	3
3. Taxonomie des actinomycètes .....	3
4. Critères d'identification des actinomycètes .....	4
4.1 Critères morphologiques.....	4
4.2 Critères chimique.....	5
4.3 Critères moléculaires .....	5
4.4 Critères physiologiques .....	5
5. Importance des actinomycètes .....	6
III. Effet des paramètres de cultures sur la production d'antibiotiques.....	6
1. Influence de la source de carbone, d'azote .....	6
2. Influence des sels minéraux .....	7
3. Influence du pH et de la Température.....	7
IV. Les plans d'expériences.....	7
1. Définition.....	7
2..Modélisation .....	8
3.. Matrice d'expériences.....	9
4..Modèle polynomial de premier degré.....	9
5.Plans de Plackett et Burman .....	10

## PARTIE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Matériel.....	11
II. Méthodes.....	11
II.1 Isolement et criblage des souches d'actinomycètes productrices de molécules bioactives	
1. Origine et prélèvement des échantillons .....	11
2. Isolement des actinomycètes.....	11

3. Milieux de cultures utilisés .....	11
4. Criblage et purification des souches d'actinomycètes.....	12
III. Mise en évidence de l'activité antagoniste des souches d'actinomycètes isolées.....	12
1. Les germes cibles.....	12
2. Standardisation de l'inoculum des germes cibles.....	12
3. Technique des cylindres d'agar.....	13
IV. Sélection du meilleur milieu de production des molécules actives pour la souche sélectionnée .....	14
V. Etude des caractères morphologiques et physiologique.....	14
1. Caractères morphologiques .....	14
2. Caractères physiologiques.....	14
VI. Modélisation de l'activité antimicrobienne de la souche sélectionnée.....	15

### PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. Isolement et criblage des souches d'actinomycètes.....	19
II. Mise en évidence de l'activité antagoniste des souches d'actinomycètes isolées.....	20
1. Sélection du meilleur milieu de production des molécules actives pour la souche sélectionnée SRC3.....	23
III. Etude des caractères morphologiques et physiologiques de la souche sélectionnée.....	24
1. Caractères macromorphologiques .....	24
2. Caractères microomorphologiques .....	26
3. Caractères physiologiques .....	26
IV. Modélisation de l'activité antimicrobienne de la souche SRC3.....	28
1. Plans de Plackett-Burman (PB).....	28
2. Modélisation de l'activité antifongique de la souche SRC3 à l'égard de <i>C. albicans</i> ..	31
2.1. Elaboration du modèle de premier degré .....	31
2.2. Elaboration du modèle du second degré .....	35
3. Modélisation de l'activité antibactérienne de la souche SRC3 à l'égard de SARM et <i>V. cholerae</i> .....	39
3.1. Elaboration du modèle de premier degré .....	39
3.2. Calcul des coefficients du modèle.....	40
3.3 Analyse statistique de l'équation de régression. ....	40
3.4. Elaboration du modèle du second degré .....	41
3.5. Discussion .....	42
Conclusion.....	44

### Références bibliographiques

### Annexes

### Résumé

# *Introduction*

Depuis la découverte de la Pénicilline par Alexander Fleming en 1928, les antibiotiques ont eu un immense impact dans le traitement des infections causées par des microorganismes pathogènes. Cependant, l'antibiothérapie abusive, l'automédication ainsi que leur utilisation intensive en agriculture a conduit à l'émergence de souches multi-résistantes aux antibiotiques. Il en résulte qu'à l'heure actuelle, aucune classe d'antibiotique ; aussi bien d'origine naturelle que synthétique ; n'échappent à ce phénomène. Ce phénomène de multi-résistance est particulièrement observé en milieu hospitalier où, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), il y'aurait chaque jour un million d'infections de type nosocomial dans le monde (**Données de OMS**).

Le SARM est l'un des principaux pathogènes associés aux infections nosocomiales, il est l'agent le plus fréquemment impliqué dans les bactériémies responsable de nombreuses infections et d'un nombre considérable de pneumonies nosocomiales (**Marie-Claude et al., 2012**). Par ailleurs, les candidoses dues aux levures du genre *Candida* est en particulier *Candida albicans* représentent la cause majeure des infections nosocomiales opportunistes d'origine mycosique (**Lagane, 2007**).

Sous l'effet de la demande croissante de nouvelles molécules bioactives efficaces, la recherche et le développement de nouveaux produits dotés d'activités biologiques nouvelles a été propulsé au rang des défis les plus importants pour l'humanité du 21<sup>ème</sup> siècle. De nombreuses recherches se sont orientées vers l'étude des bactéries appartenant à l'ordre *Actinomycetales*, ces dernières sont réputées pour leur grande production de métabolites bioactifs (**Okami et Hotta, 1988**). Par ailleurs, des études d'optimisation doivent être réalisées afin d'améliorer cette production et cela en déterminant les conditions physiologiques et nutritionnelles amenant à une production maximale des molécules d'intérêt (**Singh et al., 2009 ; Vijayakumar et al., 2010**).

L'objectif principal de cette étude s'inscrit dans cette optique qui s'organise autour de trois parties : La première partie fait état des connaissances existantes sur les actinomycètes et de leurs capacités à produire des substances biologiquement actives ainsi que des notions fondamentales relatives aux plans d'expériences.

La deuxième partie expose l'ensemble des méthodes expérimentales mises en œuvre dans l'isolement et le criblage des actinomycètes à partir de sédiments de rivière, de la mise en évidence de leurs activités antagonistes, de l'étude des caractères morphologiques et physiologiques ainsi que la modélisation de l'activité antimicrobienne par le biais de la méthode des plans d'expériences.

La troisième partie retrace et discute les résultats obtenus au cours de cette étude.

*Partie I: Synthèse  
bibliographique*

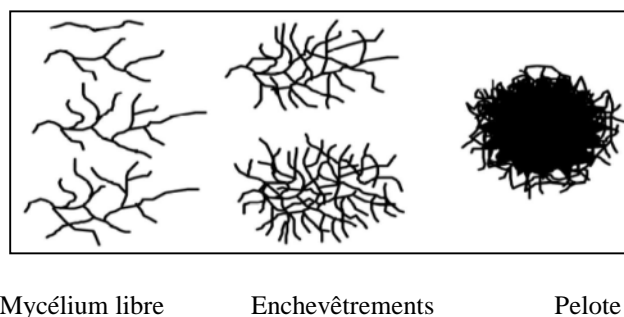
## I. Généralités sur les actinomycètes

Les actinomycètes sont des bactéries qui doivent leur nom à leurs croissance qui donne lieu à des colonies circulaires, constituées d'hyphes se propagent par croissance centrifuge tout au tour du germe qui leurs a donné naissance cité par **Kitouni, 2007**, ce qui explique leurs dénomination provenant de deux substantifs grecs "actino" et "mycète" qui signifient "champignons à rayons" ou "champignons rayonnants" (**Gottlieb, 1973**).

Les actinomycètes sont des bactéries à Gram positif à GC% supérieur à 55% (**Goodfellow, 1983**). La plupart sont saprophytes et aérobies, bien qu'il existe des formes anaérobies regroupant généralement des espèces pathogènes (**Andariambololona, 2010**). Ils sont hétérotrophes, utilisant des molécules organiques soit par fermentation ou par oxydation et dans ce dernier cas, les espèces sont généralement micro-aérophiles (**Mariat et Sebald, 1990**).

Les actinomycètes forment généralement des hyphes ramifiés et des spores asexuées, pouvant survivre pendant de longues périodes sous des conditions hostiles (**Panchanathan et al., 2013**). Ils sont généralement mésophiles, préfèrent un pH neutre ou peu alcalin, d'autres sont thermophiles tolérant des températures avoisinant 50°C et peuvent aller jusqu'à 60°C (**Omura, 1992**).

Sur milieu solide, les actinomycètes forment en une semaine environ des colonies souvent pigmentées (gris, vert, rose, crème, jaune, bleu) ayant un diamètre compris entre 1 à 10 mm, provenant de l'accumulation d'hyphes ramifiés à contours lisses ou échancrés à aspect compact, poudreux ou rugueux cité par **Kitouni, 2007**. Alors que sur milieu liquide, ils forment des mycéliums qui se ramifient et s'agrègent pour former une pelote composée d'une masse dense d'hyphes enroulés généralement en forme sphérique tel que représenté sur la figure 1 (**Belyagoubi, 2014**).



**Figure1:** Morphologies des actinomycètes rencontrées au cours de cultures liquides (**Amanullah et al., 2000**)

## II. Ecologie, taxonomie et importance des actinomycètes

### II.1. Ecologie des actinomycètes

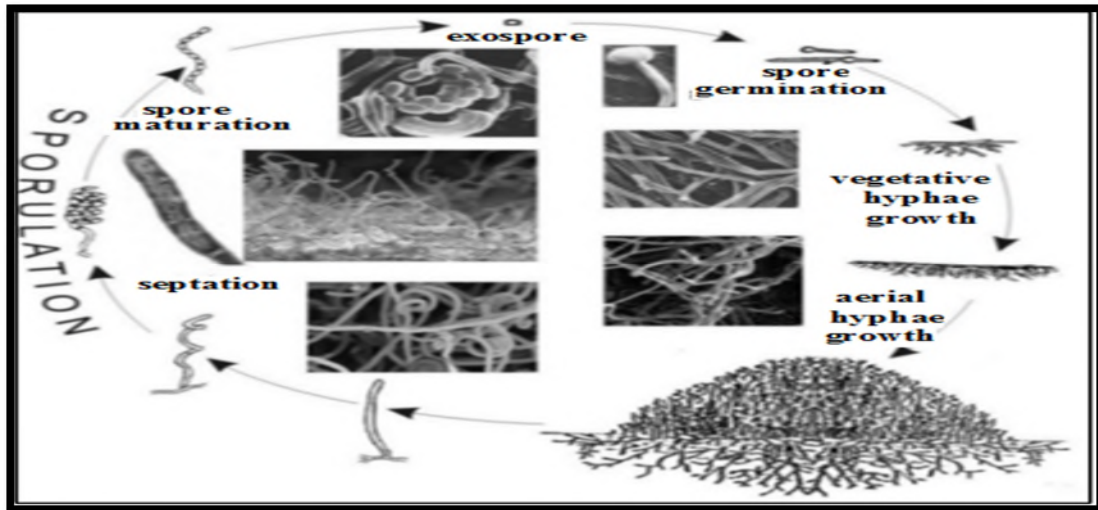
La grande capacité d'adaptation des actinomycètes aux différentes conditions environnementales ainsi que leur grande variabilité métabolique leur permet d'être répartis dans presque tous les écosystèmes avec, toutefois, une certaine préférence pour le sol qui demeure le réservoir le plus riche (**Lechevalier, 1981; Goodfellow et Williams, 1983**). Cependant, la dominance des actinomycètes dans le sol est destinée au genre *Streptomyces* ce qui s'explique par la résistance à la dessiccation de leurs spores (**Eughusen, 1956**). Ces microorganismes représentent 80% de la microflore tellurique (**Singh et al., 2006**). Par ailleurs, les actinomycètes ont été également isolés à partir de nombreux environnements aquatiques y compris des eaux de mer et sédiments marins (**Jensen et al., 1991; Ghanem et al., 2000**). D'autre part, les actinomycètes isolés à partir des eaux douces appartiennent le plus souvent aux genres *Micromonospora*, *Streptosporangium*, *Nocardia* et *Streptomyces*. Ils sont retrouvés également dans les sources hydrothermales, tel que le genre *Thermoactinomyces* (**Enghusen, 1956**) et dans les sols pollués par des hydrocarbures ou des métaux lourds (**Lechevalier, 1981**).

### II.2. Cycle de développement des actinomycètes

Les actinomycètes possèdent un cycle de développement complexe (figure 2), il débute par la germination d'une spore qui donne naissance à un mycélium primaire formé d'hyphes qui se ramifient. Le développement du mycélium du substrat vers la partie superficielle donne le mycélium secondaire ou aérien, les extrémités des hyphes aériens se différencient pour former des spores qui sont des agents de dissémination (**Kim et al., 2004 ; Smaoui, 2010**). Ces hyphes aériens sont plus épais et beaucoup moins ramifiés que les hyphes du substrat et sont en général pigmentés (**Theilleux, 1993**).

### II.3. Taxonomie des actinomycètes

Avec les récentes éditions du manuel de taxonomie bactérienne, plusieurs formes bactériennes non mycéliennes ont été rattachées aux actinomycètes sous la base de leurs parentés phylogénétiques. Avec la version 2012 du manuel de la systématique bactérienne, les actinomycètes sont rattachés au phylum *Actinobacteria* qui comprend 5 classes, 15 ordres, 43 familles et 203 genres (**Goodfellow, 2012**).



**Figure 2 :** Cycle de développement du genre *Streptomyces* sur milieu solide (Jakimowicz, 2007)

## II.4. Critères d'identification des actinomycètes

La taxonomie des actinomycètes est basée sur plusieurs critères : morphologiques, chimiques, physiologiques et moléculaires. L'identification des genres est facilitée par les études morphologiques tandis que les critères physiologiques et moléculaires séparent les espèces (Smaoui, 2010).

### II.4.1. Critères morphologiques

#### II.4.1.1. Critères macromorphologiques

Les caractères culturels typiques des actinomycètes sont :

- La présence ou absence du mycélium aérien (MA) et /ou du mycélium du substrat (MS), l'aspect de leurs colonies et leurs couleur
- La production et la couleur des pigments diffusibles dans le milieu de culture.

#### II.4.1.2. Critères micromorphologiques

L'observation microscopique des colonies d'actinomycètes a permis de mettre en évidence certaines structures telles que:

- La fragmentation ou non du mycélium de substrat.
- La formation de spores exogènes sur le mycélium aérien et/ ou du substrat, leurs formes, leurs tailles et leurs agencement (isolées, en chaînes)
- La formation de spores endogènes hautement résistantes à la chaleur : cas de *Thermoactinomyces*
- La présence de spores mobile, (*Planomonospora*, *Planobispora*, *Spirillospora*, *Actinoplanes*) ou non mobile (*Streptomyces*, *Streptosporagium*, *Micromonospora*)

Ils existent d'autres structures morphologiques telles que les sclérotés et les synnemata qui sont



présents respectivement chez les genres *Chainia* et *Actinosynnema* ainsi que la formation ou non de sporanges (Djaballah, 2010).

#### II.4.2. Critères chimiques

L'utilisation des caractères chimiques dans un objectif taxonomique posé aux actinomycètes a été initié par Becker et al., (1964) ainsi que par Yamagushi, (1965) et Lechevalier et Lechevalier, (1970) à travers l'analyse des constituants de la paroi cellulaire en acides aminés, glucides et lipides.

##### II.4.2.1. Acides aminés et sucres

L'acide aminé caractérisant les actinomycètes est le DAP (acide diaminopimélique) qui est soit absent ou présent sous deux formes LL ou DL (mésó). Il peut être remplacé par la lysine, l'ornithine ou l'acide diaminobutyrique (DAB) (Becker et al., 1965). D'autre part, les glucides caractéristiques rencontrés chez les actinomycètes sont principalement les couples "arabinoses-galactoses", "arabinose-xylose", "rhamnose-galactose", ainsi que le madurose ou (3- O- methyl galactose) (Lechevalier et Lechevalier, 1970).

##### II.4.2.2. Les acides gras et les phospholipides

La composition en acide gras (pariétaux et membranaires) a contribué dans la séparation entre certains genres et est ainsi utilisée en combinaison avec les autres critères chimiques. Les acides gras qui constituent la paroi des actinomycètes sont des chaînes qui peuvent être droites ou ramifiées, des molécules saturées ou insaturées (Kroppenstedt et al., 1990; Rainey et al., 1996). Par ailleurs, la diversité des phospholipides a permis à Lechevalier et al., (1977) de distinguer cinq chimiotypes notés de PI à PV et caractérisés par la présence généralement d'un ou de deux phospholipides caractéristiques.

#### II.4.3. Critères moléculaires

Trois critères sont classiquement recherchés :

- Le coefficient de Chargaff ou GC% (Stackebrandt et al., 1981b).
- Le taux d'hybridation ADN/ADN (Wayne et al., 1987).
- Séquençage des ARN ribosomiaux 16 et 5S.

#### II.4.4. Critères physiologiques

En plus des critères moléculaires, la détermination des espèces d'actinomycètes se base également sur les caractères physiologiques. Ceux-ci consistent en des tests de dégradation de différents composés organiques (glucidiques, lipidiques et protéiques, polymères complexes) résistance à divers agents physique et chimique, tels que la résistance aux antibiotiques, la tolérance aux pH, à la température et à la salinité (NaCl), phénol, tellurite de potassium.

## II.5. Importance des actinomycètes

### II.5.1. En agronomie

Les actinomycètes représentent un pourcentage élevé de la biomasse microbienne du sol. Ils ont la capacité de produire une large variété d'hydrolases extracellulaires qui leur confère un rôle dans la décomposition de la matière organique (Valois, 1996). En effet, ils ont un rôle important dans le processus de recyclage contribuant ainsi à la fertilisation des sols (Goodfellow et al., 1984). Ils ont un grand pouvoir de transformation des substances organiques complexes difficilement ou non dégradables par les autres microorganismes tels que, les polysaccharides, les lignocelluloses et la chitine (Lechevalier, 1981 ; Goodfellow et Williams, 1983). En outre, ils jouent un rôle significatif dans la fixation de l'azote et l'amélioration des paramètres physiques du sol (Goodfellow et Williams, 1983).

### II.5.2. En biotechnologie

Les actinomycètes ont été commercialement exploités pour la production de produits pharmaceutiques et nutritionnels. En effet, la production d'enzymes par le genre *Streptomyces* a révélé un potentiel biotechnologique intéressant (Hodgson, 2000), ainsi que les inhibiteurs d'enzymes tel que l'acide clavulanique (Demain, 2000).

### II.5.3. Dans le domaine médical et vétérinaire

Les actinomycètes ont fourni un nombre considérable de composés bioactifs de haute valeur commerciale et sont recherchés de façon régulière dans le but de découvrir de nouvelles substances bioactives (Vijayakumar et al., 2007).

Le genre *Streptomyces* est la source la plus importante de métabolites secondaires présentant une activité biologique d'intérêt pour la santé humaine et animale: antibactérienne (streptomycine, tétracycline, chloramphénicol), antifongique (nystatine), antivirale (tunicamycine), antiparasitaire (ivermectine), immunosuppressive (rapamycine), antitumorale (actinomycine, mitomycine C, anthracyclines), inhibiteur d'enzyme (acide clavulanique) (Demain, 2000)

## III. Effet des paramètres de cultures sur la production d'antibiotiques

### III.1. Influence de la source de carbone et d'azote

Le choix de la source de carbone utilisée par les microorganismes influence fortement la croissance bactérienne ainsi que la production de molécules actives (Martin et Demain, 1980; Doull et Vining, 1990; Spizek et Tichy, 1995). Siddique et al., (2013) ont démontré que la croissance de *Streptomyces avermitilis* 41445 ainsi que la production d'ivermectine B1b sont influencées par la vitesse de métabolisation de source de carbone dont la

dégradation rapide de glucose aboutit à la diminution du rendement, en parallèle l'amidon représente un bon élément pour la croissance de la souche étudiée. D'autre part la production d'antibiotiques est en relation directe avec la nature et la concentration de la source d'azote, en effet, les ions ammonium exercent un effet négatif sur la production d'antibiotique, ces ions inhibent dans de nombreux cas la formation des précurseurs (Omura *et al.*, 1984; Tanaka *et al.*, 1986)

### III.2. Influence des sels minéraux

Saha *et al.*, (2005) rapportent que la production de streptomycine et la tétracycline est améliorée par l'addition de 0.5% à 1% de NaCl, alors que des concentrations plus élevées répriment leur biosynthèse. D'autre part, plusieurs oligoéléments (Mn, Fe, Cd, Zn) sont utilisés comme cofacteurs pour la croissance des microorganismes à des concentrations très faibles (Strub, 2008).

### III.3. Influence du pH et de la Température

Les conditions de culture comme le pH influencent fortement le métabolisme secondaire ainsi que la production d'antibiotiques (James *et al.*, 1991). En effet, l'étude menée par Elibol (2002) a rapporté que la culture de *S. coelicolor* A3 sans contrôle du pH produit de l'actinorhodine, alors que lorsque le pH est maintenu à une valeur de 7,2 la culture produit un autre métabolite l'undecylprodigiosine.

La température est un autre paramètre important influençant la production de métabolites secondaires. Bien que ce soit un fait établi, Sharon *et al.*, (2014) ont rapporté que la température optimale de production de métabolites bioactifs varie entre 25 et 28°C pour les actinomycètes du genre *Streptomyces* et qu'un écart par rapport à cet intervalle influence l'efficacité de la molécule active produite.

## IV. Les plans d'expériences

### IV.1. Définition

Un plan d'expérience offre une stratégie optimale d'organisation des essais afin d'obtenir des conclusions solides et adéquates de manière efficace et économique. La méthodologie des plans d'expériences se base sur le fait qu'une expérience convenablement organisée, conduira fréquemment à une analyse et à une interprétation statistique relativement simple des résultats (Karam, 2004). De manière générale, la méthode des plans d'expériences cherche à déterminer et à établir les liens existants entre deux types de variables:

- **La réponse:** grandeur de sortie ou grandeur étudiée.

- **Les facteurs** : grandeurs physiques modifiables par l'expérimentateur, sensées influées sur les variations de la réponse (**Goupy, 1999 ; Goupy, 2005**).

**IV.2. Modélisation**

La modélisation est l'objet même du plan d'expériences, elle permet une fois que les facteurs influents sont identifiés, de trouver la forme de cette influence et l'équation ou la fonction qui décrit les variations du phénomène étudié en fonction des facteurs influents (**Goupy, 1999 ; Box et al., 1978**).

Toute réponse expérimentale peut être écrite sous la forme suivant :

$$y = f(Z_1, Z_2, \dots, Z_k) + \varepsilon \dots \dots \dots (1)$$

y : réponse expérimentale

Z<sub>k</sub> : facteurs contrôles

ε : erreur expérimentale. Ou f est une fonction inconnue (modèle théorique) des facteurs influents contrôlés (Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub>, ..... Z<sub>k</sub>)

L'équation de régression obtenue sur la base de l'expérience s'écrit sous la forme suivante :

$$\hat{y} = b_0 + \sum_{j=1}^k b_j x_j + \sum_{\substack{u, j=1 \\ u \neq j}}^k b_{uj} x_u x_j + \sum_{j=1}^k b_{jj} x_j^2 \dots \dots \dots (2)$$

Où x<sub>j</sub> sont les coordonnées des facteurs Z<sub>j</sub> exprimée en variables centrées réduites, (j=1, ..., k), ŷ est l'estimé (valeur prédite par le modèle) de y (valeur expérimentale).

Chaque valeur expérimentale y<sub>i</sub> sujette aux erreurs aléatoires ε<sub>i</sub> à distribution normale telle que (**Benoit et al., 1994 ; Goupy, 1999**) :

$$y_i = \hat{y}_i + \varepsilon_i \dots \dots \dots (3)$$

On appelle les coefficients :

**b**<sub>0</sub> : Terme constant de l'équation de régression, **b**<sub>j</sub> : Effets linéaires, **b**<sub>u j</sub> : Effets d'interactions, **b**<sub>jj</sub> : effets quadratiques.

**IV.3. Matrice d'expérience**

La matrice d'expérience est un tableau de n lignes et k colonnes, regroupant les conditions expérimentales d'un plan d'expériences.

n et k correspondent respectivement au nombre d'expériences et au nombre des variables codées.

**IV.4. Modèle polynomial de premier degré**

**IV.4.1. Plan factoriel complet à deux niveaux avec interactions (2<sup>k</sup>)**

Ces plans possèdent un nombre de niveaux limité à deux pour chaque facteur. Toutes les combinaisons de niveaux sont effectuées au cours de l'expérimentation. Ces plans peuvent être utilisés indistinctement pour les variables continues et pour les variables discrètes (**Goupy,2006**). Le nombre d'expériences (N) à réaliser est en fonction du nombre (k) de paramètre (facteurs) tel que: N = 2<sup>k</sup>.

**IV.4.2. Calcul des coefficients du modèle**

La valeur de chaque coefficient est le produit scalaire de la colonne y par la colonne x<sub>j</sub> correspondante, divisé par le nombre d'essais N. Ainsi pour les effets linières, les valeurs des coefficients sont déterminées par :

$$b_j = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_{ji} y_i, \quad j=0,1,\dots,k \quad (4)$$

Et celles des coefficients d'interactions par :

$$b_{uj} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_u x_j)_i y_i, \quad j=1,\dots,k, \quad u=1,\dots,k, \quad j \neq u \quad (5)$$

$$b_{ujf} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_u x_j x_f)_i y_i \quad (6)$$

**IV.5. Variable centrée réduite**

La notion de YATE permet une combinaison simple des niveaux et permet un calcul aisé des effets et interactions. Les niveaux sont représentés par les signes (+) et (-) symbolisent respectivement la valeur haute et basse d'un facteur. Ces deux modifications entraînent l'introduction de nouvelles variables que l'on appelle variables centrées réduites (V.C.R.) ou unités codées (**Ozil, 1997 ; Goupy ;2005 ; Benoit et al., 1994 ; Antony, 2003**).

La formule de codage qui permet le passage des variables d'origine, aux variables centrées réduites x. Elle est donnée par la formule suivante :

$$x_j = \frac{Z_j - Z_j^0}{\Delta Z_j}, \quad j=1,2,\dots,k \quad (7)$$

tels que :  $Z_j^0 = \frac{Z_{jmax} + Z_{jmin}}{2}$  et  $\Delta Z_j = \frac{Z_{jmax} - Z_{jmin}}{2}$

x<sub>j</sub> est la variable centrée réduite correspondant à la variable naturelle Z<sub>j</sub>.

Le point de coordonnées  $(Z_1^{\circ}, Z_2^{\circ}, Z_K^{\circ})$  est dénommé centre du plan; est l'unité ou intervalle de variation suivant l'axe des  $Z_j$ ,  $Z_{j\max}$  et  $Z_{j\min}$  sont les niveaux supérieur et inférieur des facteurs qui constituent les frontières du domaine d'étude.

#### V. Plans de Plackett et Burman

Les plans de Plackett et Burman sont des plans de criblage basés sur des matrices d'Hadamard. Ils complètent les plans factoriels  $2^k$ . Les matrices d'Hadamard sont des matrices carrés dont les éléments sont soit -1 soit +1 et dont le nombre de lignes (ou de colonnes) est multiple de 4. Ces matrices de Plackett et Burman sont intéressantes car elles permettent d'économiser les essais par rapport aux matrices des plans factoriels.

Les facteurs des plans de Plackett et Burman ne prennent que deux niveaux et il n'y généralement pas de point centrale car on ne cherche pas à modéliser les résultats (**Goupy, 2005**).

*Partie II :*  
*Matériel et Méthodes*

## I. Matériel

Le matériel utilisé dans ce travail est résumé en Annexe I.

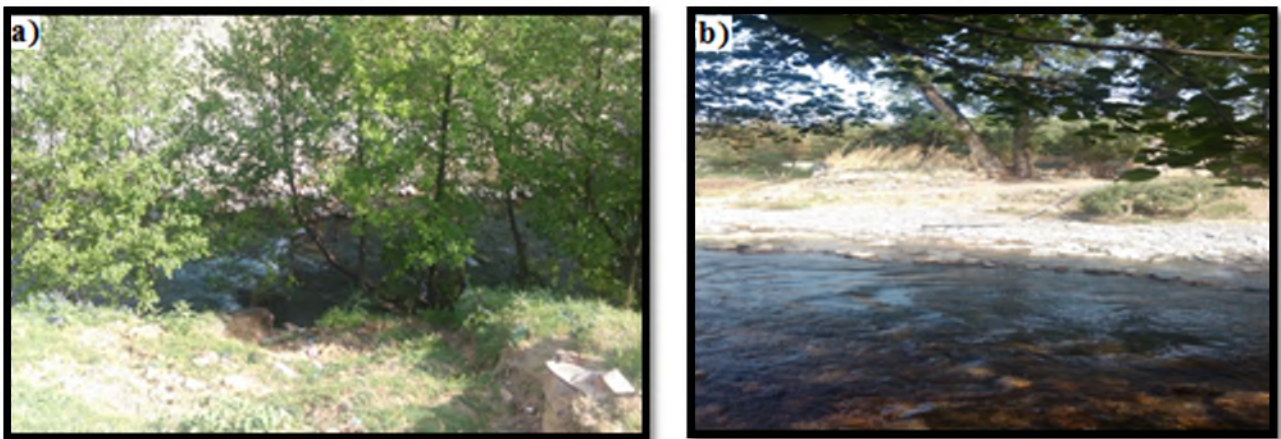
## II. Méthodes

### II.1. Isolement et criblage des souches d'actinomycètes productrices de molécules bioactives

#### II.1.1. Origine et prélèvement des échantillons

Le prélèvement des échantillons a été réalisé par M<sup>elle</sup> DJINNI à partir de sédiments de rivière prélevés dans la région de Ziama Mansouriah (Oued Ziama) situé à mi chemin entre les wilayas de Bejaia et Jijel en Janvier 2015. Le prélèvement a été effectué dans des conditions d'asepsies rigoureuses en utilisant un dispositif tubulaire stérile. Les échantillons étaient au nombre de 3 et le transport vers le laboratoire a été effectué à température ambiante.

Les photographies (a) et (b) de la figure 3 ci-dessous présentent une vue générale du site.



**Figure 3 :** Vue d'ensemble du site de prélèvement : Oued Ziama (Ziama Mansouriah)-Jijel

#### II.1.2. L'isolement des actinomycètes

Les isolats prélevés ont été obtenus à partir de sédiments de rivière par la méthode des suspensions dilutions réalisée comme suit:

Dix gramme de sédiments sont mis en suspension dans 90 mL d'eau physiologique stérile puis des dilutions décimales sont réalisées jusqu'à  $10^{-6}$ , un volume de 1 mL de suspensions : la solution mère, les dilutions  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  et  $10^{-6}$  ont été étalées sur des boites de Pétri contenant les milieux d'isolement sélectifs des actinomycètes à raison de 3 boites par dilution. Les boitesensemencées sont incubées à 28°C et la lecture est faite quotidiennement à partir du 3<sup>ème</sup> jour.

#### II.1.3. Milieux de cultures utilisés

Les milieux de cultures utilisés sont au nombre de 3: amidon caséine agar (SCA) (Williams et Kuster, 1964), Gousse (Ivantiskaya et al., 1978) et Czapeck (Lawrence, 1956) préconisés pour l'isolement sélectif des actinomycètes. Les milieux ont été additionnés de



K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> à raison de 50µg /mL afin d'inhiber le développement des champignons filamenteux (Jiang *et al.*, 2013).

La composition des milieux de culture utilisés est donnée en Annexe II.

#### **II.1.4. Criblage et purification des souches d'actinomycètes**

Après des observations quotidiennes sur les différents milieux de culture, des souches d'actinomycètes ont été sélectionnées en fonction de leur aspect morphologique, ces colonies ont été purifiées par des repiquages successifs sur les milieux de culture dont elles proviennent puis des noms leur ont été attribués et conservées à 4°C.

### **III. Mise en évidence de l'activité antagoniste des souches d'actinomycètes isolées**

Les souches d'actinomycètes isolées ont fait l'objet d'un test d'antagonisme visant à tester leur activité antimicrobienne vis-à-vis de germes cibles dans le but de sélectionner la(les) souches les plus performantes pour la suite de l'étude.

#### **III.1. Les germes cibles**

Les microorganismes cibles utilisés dans cette étude sont présentés ci-dessous:

##### **Bactéries à Gram positif**

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- *Staphylococcus aureus* résistant à la méthiciline (SARM) ATCC 43300.
- *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

##### **Bactérie à Gram négatif**

- *Escherichia coli* ATCC 25922.
- *Salmonella typhi* ATCC 14028.
- *Vibrio cholerae* ATCC 14035.
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

**Levure :** *Candida albicans* ATCC 10231.

#### **III.2. Standardisation de l'inoculum des germes cibles**

La standardisation des germes cibles utilisés suit la méthode des suspensions dilutions corrélés à la mesure de la densité optique à différentes longueurs d'onde de chaque germe étudiés, après un balayage au spectrophotomètre des longueurs d'ondes ont été fixées pour chaque germe: SARM à 525 nm, *Vibrio cholerae* à 600 nm, *Pseudomonas aeruginosa* à 537 nm, *E. coli* à 530 nm, *Staphylococcus aureus* 525 nm, qui correspond à une DO de 0.5 de la solution mère, la charge de l'inoculum utilisé est de 10<sup>7</sup> UFC/ mL (Billerbeck *et al.*, 2002).

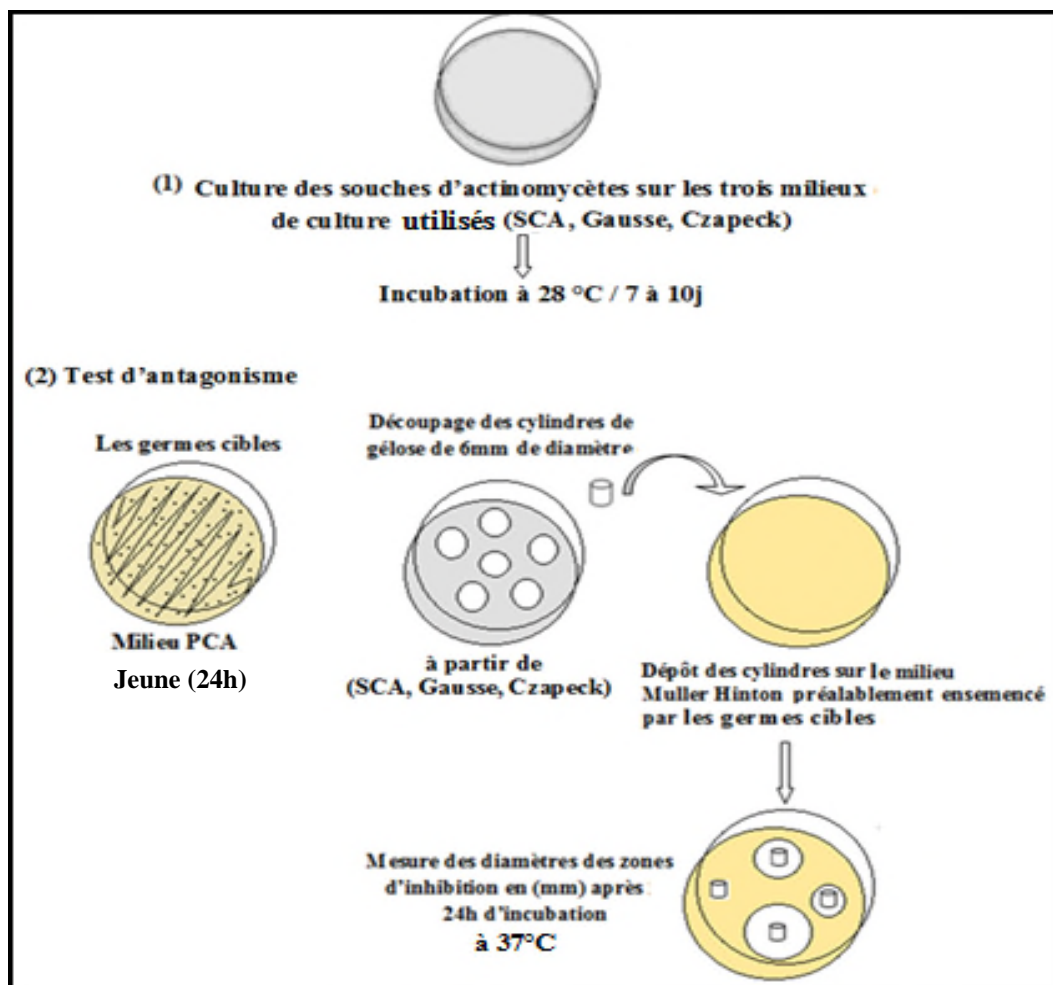
### III.3. La sélection de souches actives par la technique des cylindres d'agar

L'activité antimicrobienne des souches isolées a été évaluée par la technique des cylindres d'agar recommandée par **Bastide et al., (1986)** et schématisées en figure 4.

Les isolats d'actinomycètes obtenus ont été ensemencés sur les trois milieux de culture cités précédemment et incubés pendant 7 à 10 jours à 28°C. Après incubation, des cylindres d'agar de 6 mm de diamètre ont été découpés avec un emporte-pièce stérile puis déposés à la surface des boîtes de Pétri contenant le milieu Mueller Hinton (MH) préalablement ensemencé par les germes cibles cités précédemment. Pour une meilleure diffusion des composés bioactifs les boîtes ensemencées ont été maintenues à 4°C pendant 2 heures puis incubées à 37°C pendant 24h. Le diamètre des zones d'inhibition sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse et exprimés en millimètre.

#### Remarques

- Le mycélium doit être en contact direct avec le germe cible utilisé.
- L'inoculum ne doit pas être utilisé au delà de 15 minutes après sa préparation.



**Figure 4:** La mise en évidence de l'activité antimicrobienne des isolats d'actinomycètes sur milieu Mueller-Hinton par la méthode des cylindres d'agar (**Bastide et al., 1986**)

#### IV. Choix du meilleur milieu de production des molécules actives pour la souche sélectionnée

Dans le but de déterminer le meilleur milieu de production de(s) molécule(s) bioactive(s) produite(s) par la souche performante préalablement sélectionnée, trois milieux de culture de compositions différentes ont été utilisés à savoir les milieux SCA, Czapeck et Gausse. L'incubation des boîtes est réalisée pendant 7 à 10 jours à 28°C et l'activité antagoniste est mise en évidence vis-à-vis des germes cibles cités plus haut, par la méthode des cylindres d'agar préalablement décrite.

Le milieu de culture ayant permis à l'isolat d'actinomycète de fournir le plus haut pouvoir antagoniste exprimé en terme de zone d'inhibition est sélectionné comme milieu de base pour l'étude de l'optimisation de cette production.

#### V. Etude des caractères morphologiques et physiologiques

##### V.1. Caractères macromorphologiques

Cette étude vise à apprécier la croissance et la couleur des mycéliums aérien et du substrat, ainsi que les pigments solubles produits sur différents milieux de culture suggérés par l'"International *Streptomyces* Project" ou ISP : ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ISP6, et sur les trois milieux de culture : SCA, Gausse et Czapeck. La lecture est faite après 3, 7, 14 et 21 jours d'incubation à 28°C.

##### V.2. Caractères micromorphologiques

Dans le but d'étudier l'agencement des spores des souches sélectionnées, ainsi que la fragmentation des mycéliums aérien et du substrat, des observations ont été réalisées directement sur les boîtes de Pétri à l'aide d'un microscope optique à grossissement (10) après 14 jours d'incubation à 28°C sur le milieu Czapeck .

##### V.3. Caractères physiologiques

Une série de tests physiologiques a été réalisée pour la différenciation des espèces d'actinomycètes. Les tests effectués sont cités ci-dessous et les méthodes ainsi que la composition des milieux de culture utilisés sont détaillés en Annexe II.

- Hydrolyse de l'amidon et de la gélatine (**Marchal et Bourdon, 1987**), du tween 80 (**Sierra, 1957**), de la caséine du lait écrémé et de la tyrosine (**Gordon et al., 1974**),
- Dégradation des composés glucidiques ou leurs dérivés comme seule source de carbone réalisée sur milieu ISP9 recommandé par **Shirling et Gottlieb, (1966)**. Les sources de carbone testées sont: D-glucose, D-arabinose, fructose, lactose, mannitol, D-xylose, mannose, cellulose, agarose, tryptose et rhamnose.

- Sensibilité ou non à différentes concentration de NaCl (0%,1%, 3%, 5%, 7%, 10% et 15%), sur milieu GYEA (Glucose-Yeast-Extract-Agar).
- Utilisation des sels de sodium : Acétate; Citrate et Oxalate (**Gourdon et al ., 1974**).
- Résistance ou sensibilité à certains agents physiques: la croissance à différents pH (5.2, 7.2, 9.2 et 11.2) et à différentes température 4°C, 28°C, 37°C, 44°C et 50°C.
- Sensibilité ou résistance aux différentes familles d'antibiotiques sur milieu Mueller Hinton (**Athalye et al., 1985**).

**Tétracycline:** (TE 30µg), **Amoxicillave:** (AMC 30µg), **Oxacilline:** (OX 1µg), **Piperacilline** (PI 100µg), **Pénicilline G:** (P 10µg), **Tobramycine:** (TOB 10µg), **Gentamycine:** (GEN 10µg), **Erythromycine:** (E 15µg), **Amoxicilline:** (AMX 25µg).

- Sensibilité ou résistance de germes testés aux différents familles d'antibiotiques.
- Etude de la résistance ou la sensibilité des souches d'actinomycètes aux métaux lourds :

A fin de mettre en évidence la résistance ou la sensibilité des souches d'actinomycètes isolées aux métaux lourds, des milieux de culture gélosés ont été préparés en utilisant une gélose nutritive contenant différents métaux sous forme de sels organique à savoir le zinc (ZnSO<sub>4</sub>), le fer (FeN<sub>3</sub>O<sub>9</sub>), le chrome (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), le cuivre (CuSO<sub>4</sub>), le cadmium (Cd<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>), ainsi que l'ensemble de ces derniers à raison de 50 mg/L (**Daboor et al., 2014**). La croissance des isolats a été observée après 3, 7 et 14 jours d'incubation à 28°C. L'appréciation de la résistance ou de la sensibilité des isolats testées vis-à-vis de(s) métaux lourds est traduite par la croissance ou l'absence de cette dernière de la soucheensemencée.

## **VI. Modélisation de l'activité antimicrobienne de la souche sélectionnée**

Après sélection de la meilleure souche active et du meilleur milieu de production, des essais d'optimisation ont été réalisé dans le but d'améliorer la production de molécules bioactives.

En premier lieu, l'étude de l'influence de sept paramètres opératoires sur la production d'antibiotiques a été réalisée à savoir; la concentration en amidon, en KCl, en K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, en NaNO<sub>3</sub>, en MgSO<sub>4</sub>(7H<sub>2</sub>O), le pH et le temps d'incubation. A cet effet, un plan d'expériences de "Plackett et Burman (PB)" a été élaboré par l'utilisation d'un logiciel de modélisation nommé "Minitab 16.0"

En second lieu, une fois les facteurs les plus significatifs sont identifiés, une modélisation de l'activité antimicrobienne est réalisée par le biais d'un plan factoriel complet avec interaction afin d'évaluer les effets d'interaction de ces facteurs. Les valeurs choisies des différents facteurs opératoires étudiés à différents niveaux sont regroupées dans le tableau I.

**Tableau I** : Valeurs extrêmes des paramètres opératoires étudiés

Paramètres opératoires	Niveau bas (-1)	Centre (0)	Niveau haut (+1)
x1	6	10	14
x2	0.3	0.5	0.7
x3	0.6	1	1.4
x4	1	3	5
x5	0.3	0.5	0.7
x6	5.2	7.2	9.2
x7	4	7	10

**Note:** x1: Amidon (g/L), x2: KCl (g/L), x3: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (g/L), x4: NaNO<sub>3</sub> (g/L), x5: MgSO<sub>4</sub> (g/L), x6: pH x7: Temps d'incubation (J)

Treize milieux de culture Czapeck à des concentrations variables ont été préparés selon la matrice des expériences données par le logiciel "Minitab 16.0" et représentée dans le tableau II. La souche sélectionnée estensemencée sur chaque milieu et incubée à 28°C pendant 4, 7 et 10 jours d'incubation.

**Tableau II** : Matrice d'expériences de "Plackett et Burman"

z1: Amidon (g/l), z2: KCl (g/l), z3: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (g/l), z4: NaNO<sub>3</sub> (g/l), z5: MgSO<sub>4</sub> (g/l), z6: pH, z7: Temps d'incubation (J), C: milieu Czapeck

Nombre d'expériences	z1	z2	z3	z4	z5	z6	z7	x1	x2	x3	x4	x5	x6	x7
C01	14	0.7	0.6	5	0.7	5.2	10	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1
C02	6	0.7	0.6	1	0.3	9.2	10	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1
C03	14	0.3	1.4	5	0.3	9.2	4	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1
C04	6	0.3	0.6	5	0.7	9.2	4	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
C05	6	0.3	1.4	5	0.7	5.2	10	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1
C06	14	0.3	1.4	1	0.3	5.2	10	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1
C07	14	0.7	0.6	5	0.3	5.2	4	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1
C08	6	0.7	1.4	1	0.7	5.2	4	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1
C09	14	0.7	1.4	1	0.7	9.2	4	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1
C10	14	0.3	0.6	1	0.7	9.2	10	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1
C11	6	0.3	0.6	1	0.3	5.2	4	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
C12	6	0.7	1.4	5	0.3	9.2	10	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1
C13	10	0.5	1	3	0.5	7.2	7	0	0	0	0	0	0	0

Après avoir sélectionné les paramètres opératoires significatifs à l'égard de *C. albicans*, de *V. cholerae* et du SARM, nous avons élaboré un modèle factoriel de premier degré pour chaque germe étudié. huit milieux de culture Czapeck ont été préparés avec des concentrations variables des facteurs opératoires à savoir KCl, le MgSO<sub>4</sub> et le temps d'incubation à l'égard de *C. albicans*. La matrice d'expériences pour  $k=3$  et  $N= 8$  ( $2^k$ ) est représentée dans le tableau III ci-dessous.

**Tableau III:** Matrice d'expériences pour *C. albicans*

Nombre d'expériences	z <sub>1</sub>	z <sub>2</sub>	z <sub>3</sub>	x <sub>0</sub>	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>
C01	0.3	0.3	4	1	-1	-1	-1
C02	0.7	0.3	4	1	+1	-1	-1
C03	0.3	0.7	4	1	-1	+1	-1
C04	0.7	0.7	4	1	+1	+1	-1
C05	0.3	0.3	10	1	-1	-1	+1
C06	0.7	0.3	10	1	+1	-1	+1
C07	0.3	0.7	10	1	-1	+1	+1
C08	0.7	0.7	10	1	+1	+1	+1

**Note:** x<sub>0</sub>: variable fictive, z<sub>1</sub>: KCl (g/L), z<sub>2</sub>: MgSO<sub>4</sub> (g/L), z<sub>3</sub>: Temps d'incubation, C: milieu Czapeck

Cependant la modélisation de l'activité antibactérienne à l'égard de deux germes cibles à savoir SARM et *V. cholerae* est réalisée avec en seul paramètre opératoire pour chaque germe qui sont le pH et la concentration en KCl respectivement. Les matrices d'expériences correspondantes à ces 2 germes pour  $k=1$  et  $N= 2$  ( $2^k$ ) sont illustrées dans les tableaux IV a et IV b suivants.

**Tableau IV a:** Matrice d'expériences pour le germe SARM

Nombre d'essais	z	x <sub>0</sub>	x <sub>1</sub>
C <sub>1</sub>	5.2	1	-1
C <sub>2</sub>	9.2	1	+1

**Tableau IV b :** Matrice d'expériences pour le germe *V. cholerae*

Nombre d'essais	z'	x <sub>0</sub>	x <sub>1</sub>
C <sub>1</sub>	0.3	1	-1
C <sub>2</sub>	0.7	1	+1

**Note:** x<sub>0</sub>: variable fictive, z: KCl (g/L), z': le pH, C : milieu Czapeck

Des essais supplémentaires ont été réalisés en appliquant le plan en étoile pour les 3 germes étudiés pour l'élaboration du modèle de second degré à savoir SARM, *V. cholerae* et *C. albicans*. Les valeurs extrêmes des paramètres opératoires étudiés à différents niveaux sont regroupées dans les tableaux V (a, b, c).

**Tableau V a:** Valeurs extrêmes des paramètres opératoires étudiés à l'égard de *C. albicans* pour le plan en étoile

Nombre d'expériences	$z_1$	$z_2$	$z_3$	$x_0$	$x_1$	$x_2$	$x_3$
$C_1$	0.1	0.5	7	1	$-\alpha$ (-1.68)	0	0
$C_2$	0.9	0.5	7	1	$+\alpha$ (+1.68)	0	0
$C_3$	0.5	0.1	7	1	0	$-\alpha$ (1.68)	0
$C_4$	0.5	0.9	7	1	0	$+\alpha$ (+1.68)	0
$C_5$	0.5	0.5	1	1	0	0	$-\alpha$ (-1.68)
$C_6$	0.5	0.5	13	1	0	0	$+\alpha$ (+1.68)

Note:  $x_0$ : variable fictive,  $z_1$ : KCl (g/L),  $z_2$ : MgSO<sub>4</sub> (g/L),  $z_3$ : Temps d'incubation, C: milieu Czapeck

**Tableau V b:** Valeurs extrêmes des paramètres opératoires étudiés à l'égard de *V. cholerae*

Nombre d'expériences	$z$	$x_0$	$x_1$
$C_1$	0.1	1	$-\alpha$ (-1.19)
$C_2$	0.9	1	$+\alpha$ (+1.19)

Note:  $x_0$ : variable fictive,  $z_1$ : KCl (g/L), C: milieu Czapeck

**Tableau V c:** Valeurs extrêmes des paramètres opératoires étudiés à l'égard de SARM

Nombre d'expériences	$z$	$x_0$	$x_1$
$C_1$	3.2	1	$-\alpha$ (-1.19)
$C_2$	11.2	1	$+\alpha$ (+1.19)

Note:  $x_0$ : variable fictive,  $z_1$ : pH, C: milieu Czapeck

*Partie III :*  
*Résultats et discussions*



Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Microbiologie générale de l'université A. Mira de Bejaia durant la période allant du 19/03/2015 au 01/06/2015.

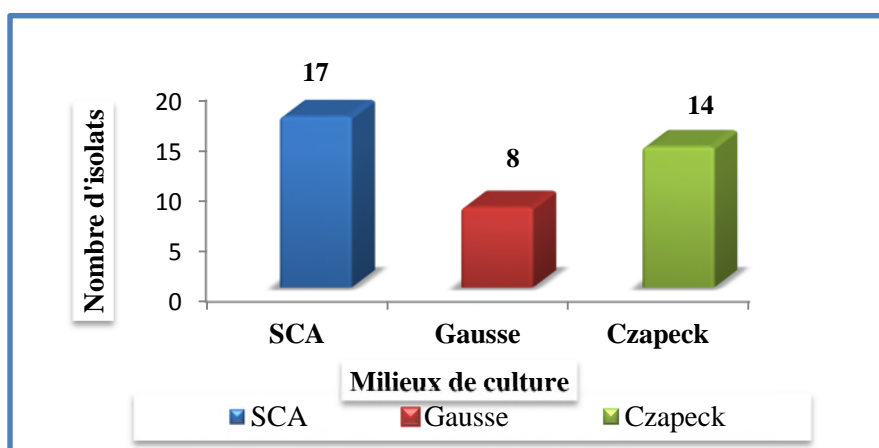
Dans ce chapitre, seront présentés les résultats et les discussions des quatre parties de cette étude, relatives à l'isolement et au criblage des souches d'actinomycètes, l'étude de leurs activités antagonistes vis-à-vis de germes pathogènes suivi de l'étude des caractères morphologiques et physiologiques de la souche sélectionnée. L'influence des paramètres de culture sur la production de molécules actives sera également abordée ainsi que la description de l'élaboration du modèle mathématique à travers l'utilisation de la méthode des plans d'expériences.

### I. Isolement et criblage des souches d'actinomycètes productrices d'antibiotiques

Dans le but d'augmenter la probabilité d'isolement de genres rares, trois milieux de culture sélectifs des actinomycètes ont été employés. Au total, 39 isolats présentant une morphologie caractéristique des actinomycètes ont été obtenues par la méthode des suspensions-dilutions et ce à partir de 3 échantillons de sédiments de rivière prélevés dans la région de Ziama Mansouriah (Oued Ziama).

Les colonies d'actinomycètes ont été reconnues par leur aspect morphologique caractéristique. Elles apparaissent sèches, rugueuses, colorées ou non, adhérent à la gélose et présentent un mycélium végétatif et aérien, certaines montrent seulement un mycélium du substrat.

Le nombre d'isolats obtenus à partir de chaque milieu de culture spécifique est représenté dans la figure 5 ci-dessous.



**Figure 5:** Histogramme du nombre d'isolats d'actinomycètes obtenus en fonction des trois milieux de culture sélectifs utilisés

Les résultats obtenus montrent clairement que le milieu SCA est le milieu le plus favorable pour l'isolement des actinomycètes à partir des sédiments de rivière. En effet, 17 isolats ont été obtenus sur milieu SCA, 14 sur milieu Czapeck et seulement 8 souche ont été recensées sur milieu Gausse.

Au cours de notre étude, le criblage orienté en employant 3 milieux d'isolements différents a été choisi pour mettre en évidence la présence ou l'absence de genres rares d'actinomycètes dans les sédiments de rivière. Cette stratégie s'accorde parfaitement avec celle de plusieurs auteurs. En effet, d'après **Cross, (1982)**, il est conseillé de varier les stratégies et les milieux d'isolements dans le même screening afin de réussir l'isolement de la plupart de la flore actinomycétale présente dans l'échantillon.

Pour les trois milieux utilisés, nous observons une différence importante du nombre de souches actinomycétales isolées. Cette différence peut être expliquée par la présence, dans le milieu SCA, de caséine et de sels minéraux, qui stimulent la croissance des actinomycètes préférentiellement aux autres bactéries (**Boughachiche et al., 2005**).

De plus, plusieurs travaux ont confirmé l'efficacité de ce milieu pour l'isolement sélectif des actinomycètes à partir d'écosystèmes variés (**Sharma et al., 2011, Gayathri et al., 2011**)

## II. Mise en évidence de l'activité antagoniste des souches d'actinomycètes isolées

Dans le but d'étudier la capacité des 39 isolats d'actinomycètes obtenus à produire des molécules bioactives, un test d'antagonisme, basé sur la méthode des cylindres d'agar, a été effectué et cela vis-à-vis de germes pathogènes : une bactérie à Gram négatif, une bactérie à Gram positif et une levure. Les résultats de ce test sont résumés dans le tableau VI.

Les résultats montrent que le spectre d'activité antimicrobienne des 39 souches d'actinomycètes est variable en fonction des germes cibles testés mais également en fonction de la nature du milieu de culture utilisé pour leur isolement.

En effet, il en ressort clairement que parmi tous les isolats testés, trois souches à savoir : SRSC5, SRSC15 et SRC3 présentent une activité relativement significative aussi bien vis-à-vis de bactérie à Gram négatif qu'à Gram positif (*E. coli*, SARM) mais également vis-à-vis de la levure *C. albicans*, comparativement aux autres isolats où la plupart présentent un effet inhibiteur variable alors qu'elles se sont révélées inactives à l'encontre de *C. albicans*. Par ailleurs, l'isolat SRC3 présente des activités importantes vis-à-vis de *C. albicans* et *E. coli* avec des zones d'inhibition de 19 mm et 16 mm respectivement. Selon **Boughachiche et al., (2005)** et **Boudemagh et al., (2005)**, cette différence au niveau des zones d'inhibition peut être expliquée par le fait qu'une souche d'actinomycète peut produire plusieurs molécules

antimicrobiennes (différents spectres d'action) dont la nature dépend de la composition du milieu de culture.

**Tableau VI :** Activité antagoniste, exprimée en diamètre de zones d'inhibition, des 39 souches d'actinomycètes isolées à partir de sédiments de rivière

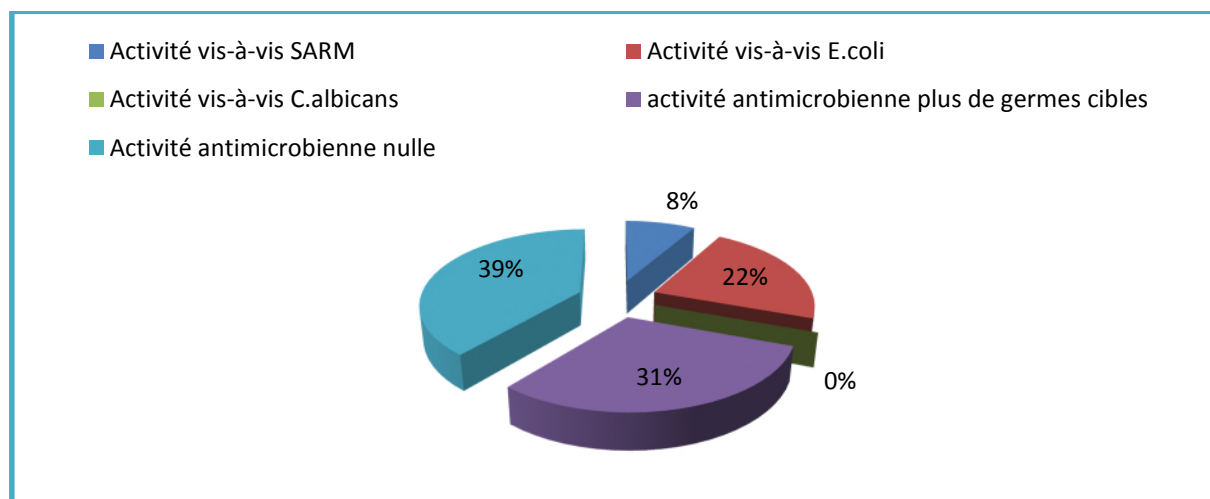
Souches	Activité antimicrobienne (mm)		
	<i>E. coli</i>	SARM	<i>C. albicans</i>
SRSC1	14	0	0
SRSC2	10	0	0
SRSC3	10	10	0
SRSC4	13.5	10.5	0
<b>SRSC5</b>	<b>24</b>	<b>12</b>	<b>10</b>
SRSC6	0	0	0
SRSC7	25	13	0
SRSC8	10.5	0	0
SRSC9	8	0	17
SRSC10	7.5	0	0
SRSC11	13	0	0
SRSC12	11	0	0
SRSC13	0	8	0
SRSC14	0	0	0
<b>SRSC15</b>	<b>14</b>	<b>15.5</b>	<b>17.5</b>
SRSC16	0	20	0
SRSC17	0	0	0
SRG1	0	0	0
SRG2	0	0	0
SRG3	0	0	0
SRG4	0	0	0
SRG5	11.5	10	0
SR G6	0	0	0
SRG7	0	0	0
SRG8	15	15	0
SRC1	0	0	0
SRC2	0	8	0
<b>SRC3</b>	<b>16</b>	<b>11</b>	<b>19</b>
SRC4	0	0	0
SRC5	0	0	0
SRC6	ND	ND	ND
SRC7	8	11.5	11
SRC8	0	0	0
SRC9	ND	ND	ND
SRC10	ND	ND	ND
SRC11	7	0	0
SRC12	7	7.5	0
SRC13	0	0	0
SRC14	23	0	0

**Note :** SRSC (Sédiment, Rivière, Starch Caséin), SRG (Sédiment, Rivière, Gausse), SRC (Sédiment, Rivière, Czapeck), ND: Non déterminé

D'autre part, nous remarquons que l'activité antimicrobienne des isolats varie également en fonction du milieu de culture d'origine des souches. En effet, les résultats illustrent que les souches obtenues sur milieu Gausse ne présentent globalement aucune activité vis-à-vis des trois germes test utilisés à l'exception d'isolats SRG5 et SRG8 qui

présentent une activité antibactérienne. Alors que les 14 et 17 isolats obtenues sur milieu Czapeck et SCA présentent au moins un effet antagoniste à l'encontre des germes testés. De plus, l'étude du taux de l'activité antimicrobienne des souches obtenues en fonction des germes cibles testés nous a permis de classer ces dernières.

La figure 6 suivante illustre le taux d'activité antimicrobienne des 36 isolats à l'égard de germes cibles

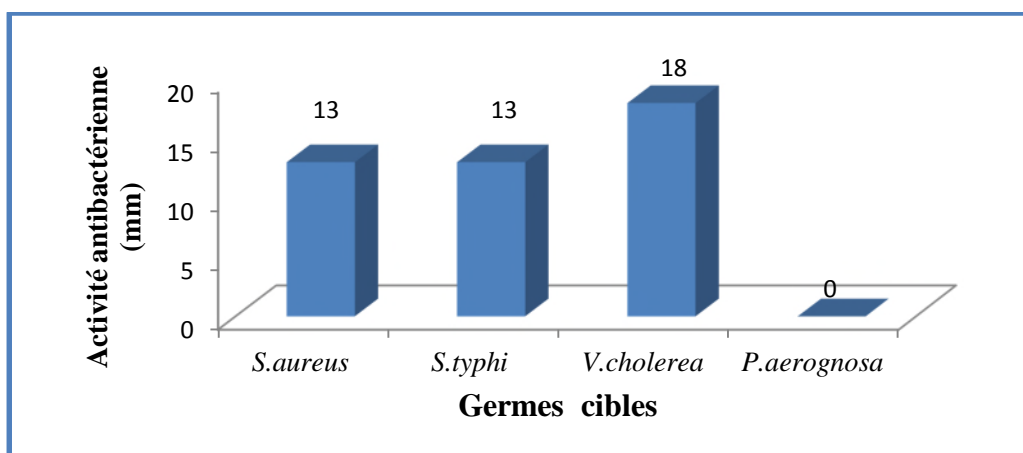


**Figure 6:** Taux d'activité antimicrobienne des 36 isolats d'actinomycètes à l'égard des germes cibles testés.

Selon les résultats illustrés dans la figure 6, il apparaît clairement que 31 % des souches isolées possèdent la capacité d'inhiber la croissance d'au moins deux germes cibles alors que 22% des isolats présentent des activités antagonistes uniquement vis-à-vis de *E. coli*, 8% vis-à-vis de SARM avec, toutefois, un pourcentage important d'isolats n'ayant présenté aucune activité antimicrobienne.

Ce test d'antagonisme nous a permis de sélectionner parmi les 36 isolats testés, la souche la plus active notée SRC3, pour la suite de notre étude ; du fait que son activité antimicrobienne est la plus importante à l'égard, aussi bien, de *E. coli*, de SARM qu'à l'égard de la levure *C. albicans*.

D'autre part, afin d'élargir la gamme des germes cibles utilisés et par conséquent l'activité antagoniste de la souche SRC3, 4 germes test ont été additionnés au panel à savoir *Vibrio cholerae* ATCC 14035, *Salmonella Typhi* ATCC 14028, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Les résultats de cette étude sont présentés dans la figure 7.



**Figure 7 :** Activité antagoniste de la souche SRC3 à l'égard de 4 bactéries cibles

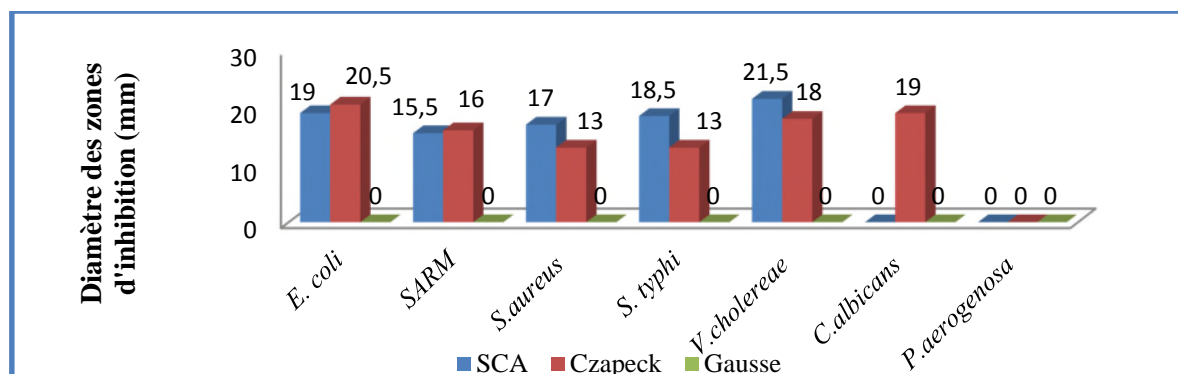
De la figure 7, il en résulte que la plus forte activité antibactérienne de la SRC3 obtenue est celle à l'encontre de *V. cholerae* avec une zone d'inhibition de 18 mm suivi de *S. Typhi* et de *S. aureus* avec 13 mm alors qu'aucun antagonisme n'est observé vis-à-vis de *P. aeruginosa*.

### II.1. Sélection du meilleur milieu de production des molécules actives pour la souche sélectionnée SRC3

Afin de sélectionner le meilleur milieu de production de substances actives, la souche SRC3 préalablement sélectionnée a été cultivée sur trois milieux de culture de compositions différentes à savoir SCA, Czapeck et Gause puis incubée pendant 7 jours à 28°C. La mise en évidence de l'activité antimicrobienne a été réalisée par la méthode des cylindres d'agar.

Le milieu pour lequel la souche présente une production maximale de l'activité antimicrobienne a été sélectionné pour la suite de notre travail.

Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 8 ci-dessous.



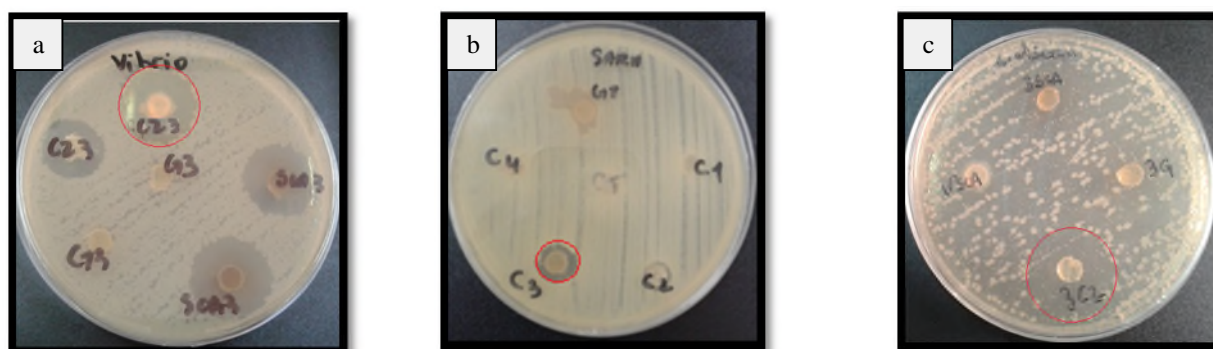
**Figure 8 :** Activité antagoniste de la souche SRC3 à l'égard des germes cibles en fonction des milieux de culture

D'après les résultats obtenus, il est clairement remarquable que la souche étudiée présente des activités antimicrobiennes relativement variables aussi bien vis-à-vis des bactéries à Gram positif que à Gram négatif ainsi qu'à l'encontre de la levure *C. albicans*, en fonction du milieu de culture considéré. En effet, les diamètres des zones d'inhibition varient entre 20.5 et 0 vis à vis de *E. coli*, entre 16 et 0 mm vis-à-vis du SARM, 21,5 et 0 à l'égard de *V. cholerae*, 17 et 0 vis-à-vis de *S. aureus*, 18,5 et 0 à l'égard de *S. typhi* et entre 19 et 0 mm *C. albicans* tandis qu'aucune activité n'a été enregistrée à l'égard de *P. aeruginosa*.

D'autre part, nous remarquons que les activités les plus importantes ont été enregistrées en utilisant le milieu Czapek, avec des diamètres de 20,5 mm vis à vis de *E. coli*, 16 mm vis-à-vis de SARM et 19 mm vis-à-vis *C. albicans*, 18 mm pour *V. cholerae*, 13 mm pour *S. aureus* et *S. Typhi* comparativement aux deux autres milieux de culture utilisés SCA et Gausse, d'une part, et un spectre d'activité plus large en utilisant ce même milieu come milieu de production.

A la lumière de ces résultats, le milieu Czapeck a été sélectionné comme étant le meilleur milieu de production de substances actives et a pour ce fait été retenu pour la suite du travail.

La figure 9 suivantes montrent quelques une des activités antimicrobiennes d'isolat SRC3 vis-à-vis de quelques germes cibles



**Figure 9** : Photographies illustrant l'activité antagoniste de l'isolat SRC3 à l'égard de (a) *V. cholerae*, (b) SARM et (c) *C. albicans*

### III. Etude des caractères morphologiques et physiologiques de la souche sélectionnée

#### III.1. Caractères macromorphologiques

Les propriétés culturales de l'isolat SRC3 sélectionné et cultivé sur différents milieux de culture ISP à 28°C pendant 21 jours sont présentées dans le tableau VII ci-dessous. La

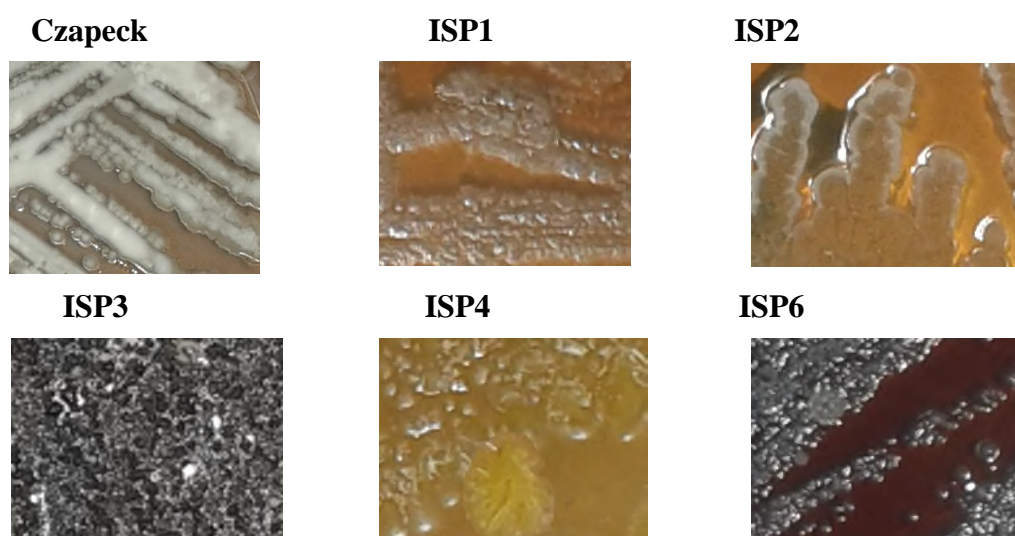
macromorphologie de la souche SRC3 sur milieu Czapeck après 3, 7, 14 et 21 jours est regroupée dans le tableau VIII donné en Annexe III.

**Tableau VII :** Caractéristiques macromorphologiques de la souche SRC3 après 21 jours d'incubation sur les différents milieux ISP à 28°C

Souche SRC3	MA	MS	Pigment diffusibles	Aspect des colonies	Croissance
ISP1	Blanc	Jaune	–	Colonies rugueuse, sec	++++
ISP2	blanc aux extrémités	Marron claire	–	Colonies rugueuses, craquelé	++++
ISP3	Noir	Noir	–	Colonies poudreuses	++++
ISP4	Blanc	Jaune	–	Colonies bombés à centre rugueux	++++
ISP6	Gris claire blanchâtre	Blanc	Marron à violet foncé (pigments mélanoides)	Colonies légèrement bombés, rugueux	+++

**Note:** + + + +, Excellente croissance; -, Absence de croissance

La souche SRC3 présente une excellente croissance sur différents milieux de culture à savoir Czapeck, ISP1, ISP2, ISP3, ISP4 et ISP6 après 21 jours d'incubation à 28°C. La production du mycélium aérien (MA) est observée sur tous ces milieux. Il présente une couleur grise avec une teinte blanchâtre autour des colonies sur milieu Czapeck et d'une couleur blanche sur ISP1, ISP2 et ISP4 avec un aspect craquelé, il est de couleur noir sur ISP3 et gris claire à blanc sur ISP6 avec production de pigment mélanoides d'une couleur marron à violet foncée. Le mycélium de substrat se manifeste par une couleur jaune claire sur Czapeck, ISP1 et ISP4. La morphologie de la souche SRC3 sur les milieux de culture ISP est représentée dans la figure 10 ci-dessous.



**Figure 10:** Macromorphologie de la souche SRC3 sur les milieux de culture ISP et Czapeck après 21 jours d'incubation à 28°C.

### III.2. Caractères micromorphologiques

Les observations microscopiques effectuées aux grossissements GX10 et GX100 ont permis de déterminer que les filaments du mycélium aérien de la souche SRC3 sont non cloisonnés et fins, présentant des chaînes de spores immobiles de forme spiralée qui se fragmentent en spores sphériques. Les sporophores, les sporanges, les spores mobiles, les synnemata et les sclérotés sont absents.

La figure 11 illustre la micromorphologie de la souche SRC3 observée au microscope optique aux grossissements (x10) observé directement sur la boîte de Pétri et ( x100) après coloration de Gram.



**Figure 11 (a):** Observation microscopique de la souche SRC3 (GX100) cultivée pendant 14 jours à 28°C après coloration de Gram



**Figure 11 (b) :** Observation microscopique de la souche SRC3 (GX10) cultivée pendant 14 jours à 28°C

En se basant sur les caractéristiques morphologiques de la souche étudiée, il a été possible de la rattacher au genre *Streptomyces*. En effet, les bactéries appartenant à ce genre actinomycetale présente des caractéristiques typiques et facilement reconnaissables, particulièrement la forme des colonies ainsi que leurs aspect (présence de MA et du MS) mais également la disposition des chaînes de spores et leur agencement. Le nom *Streptomyces* sp.SRC3 lui a donc été attribué.

### III.3. Caractères physiologiques

Les résultats des différents caractères physiologiques et biochimiques de la souche SRC3 sont réunis dans le tableau IX. Ces résultats nous fournissent des éléments essentiels pour la classification de notre souche.



Tableau IX a: Caractéristiques physiologiques et biochimique de l'isolat SRC3

Test	Résultat	Test	Résultat
<b>Dégradation des glucides sur ISP9</b>		<b>Croissance à différentes T°</b>	
Témoin négatif	-	4 °C	-
D-glucose	+	28 °C	++++
Xylose	+++	37 °C	++++
Mannose	+++	44 °C	-
L-arabinose	-	50 °C	-
Cellulose	+++		
Agarose	+	<b>Croissance aux différents pH</b>	
D-mannitol	+++	5.2	+
Tryptose	±	7.2	++++
L- ramnose	++	9.2	++++
Lactose	±	11.2	++
<b>Dégradation de</b>		<b>Croissance aux différentes concentrations de NaCl sur le milieu GYEA</b>	
Tyrosine	++	0%	++
Tween 80	-	1%	+
Lait écrémé	-	3%	±
<b>Dégradation des sels de sodium</b>		5%	±
Acétate de sodium	-	7%	-
Citrate de sodium	-	10%	-
Oxalate de sodium	-	15%	-
<b>Réduction des métaux lourds</b>		<b>Résistance ou sensibilité aux antibiotiques</b>	<b>Diamètres des zones d'inhibitions (mm)</b>
Zinc	++	Amoxicilline 25 µg	0
Cuivre	++	Oxacilline 1µg	0
Chrome	++	Pénicilline G 10µg	0
Fer	+	Amoxicillave 30µg	0
Cadmium	±	Tobramycine 10µg	13
Mélange de métaux	-	Erythromycine 15µg	14
		Piperacilline 100µg	13
		Tétracycline 30µg	30
		Gentamycine 10µg	11.5
			15

**Note :** ++++: Excellente croissance, +++: Très bonne croissance, ++: croissance Moyenne., +: Faible croissance, ± : développement du mycélium de substrat uniquement - : Absence de croissance.

D'après les résultats obtenus et illustrés dans le tableau IX ci dessus, il est clairement remarquable que la souche étudiée, se développe en présence de D-xylose, mannose, cellulose, D-mannitol, rahmnose, avec une légère croissance (développement du mycélium de substrat uniquement) en présence de D-glucose, agarose, tryptose et lactose après 14 jours d'incubation à 28°C. Cependant, l'isolat ne dégrade pas l'arabinose, la caséine, le tween 80, et les 3 sels de sodium testés (Acétate, citrate et oxalate), toutefois, elle présente une bonne croissance en présence de la L-tyrosine.

La souche SRC3 présente une bonne croissance sur milieu Czapeck à pH 7.2 et 9.2 après 7 jours d'incubation à 28°C, et plutôt faible à pH 5.2 et moyenne à pH 11.2. De plus, elle présente une excellente croissance à 28 et 37°C, alors qu'aucun développement n'est observé à 4, 44, 50°C. Elle est capable de croître à des concentrations en NaCl allant jusqu'à 5g/mL, tandis qu'à des concentrations relativement élevée 10g/mL et 15g/mL, la croissance est inexistante, de ce fait, elle est défini comme étant une souche halophile modérée selon la classification de Kushner, 1987 (**Tang et al., 2003**).

Concernant le pouvoir réducteur de la souche aux métaux lourds utilisés, les résultats obtenus montre que l'isolat étudié présente une bonne croissance en présence de Zn, Cu et Cr, mais une faible croissance en présence de Cd et Fe, alors qu'aucune croissance n'a été observé en présences des tous les métaux lourds. Ces résultats nous ouvrent de nouvelles perspectives d'étude sur l'utilisation éventuelle de cette souche dans le domaine de la décontamination des sols. D'autre part, la souche SRC3 est résistante à l'Amoxicilline (25 µg), Oxacilline (1 µg), Pénicilline G (10 µg), des antibiotiques interférant dans la synthèse de peptidoglycane et est modérément résistante à l'Amoxicillave (30 µg), Tobramycine (10 µg), Erythromycine (15 µg), Tétramycine (30 µg), Gentamycine (10 µg). De plus la souche est sensible en présence de Pipéracilline (100 µg) avec un diamètre d'inhibition de 30 mm.

#### **IV. Modélisation de l'activité antimicrobienne de la souche SRC3**

##### **IV.1 Plan d'expériences de Plackett-Burman (PB)**

Dans le but de déterminer les facteurs influençant la production de molécules bioactives par la souche SRC3, une matrice d'expériences du plan de Plackett et Burman a été élaborée à l'aide du logiciel Minitab 16.0. Le choix des facteurs et leurs niveaux de variations a été effectué en tenant compte des limites expérimentales de la croissance de la souche étudiée.

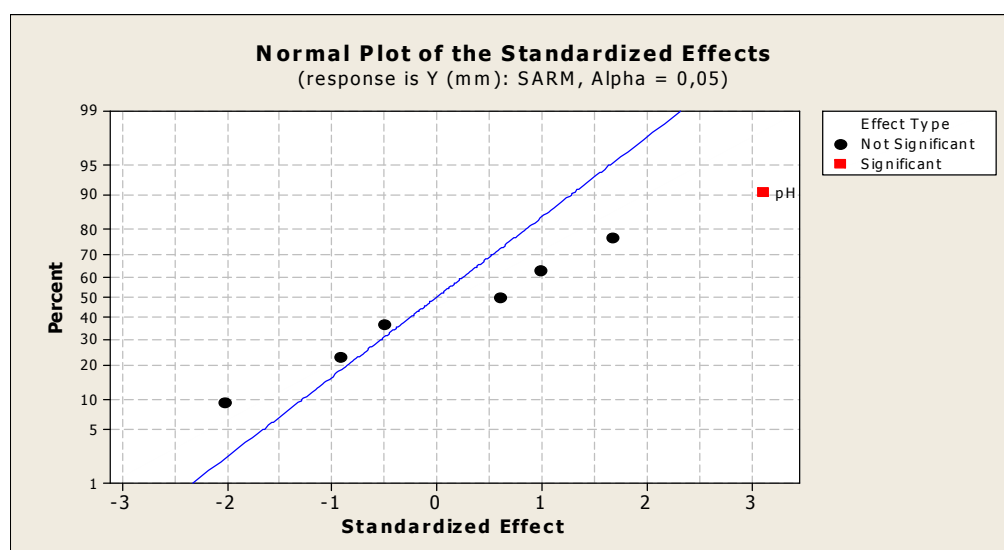
L'effet des facteurs étudiés dans le cadre du plan de Plackett et Burman (amidon, NaNO<sub>3</sub>, KCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> (7H<sub>2</sub>O), pH et le temps d'incubation) a permis de mesurer la

réponse Y qui est l'activité antimicrobienne estimée en millimètre à l'égard de trois germes cibles à savoir SARM, *V. cholerae* et *C. albicans*. La modélisation des résultats par le logiciel Minitab 16.0 a permis de sélectionner parmi les sept paramètres opératoires cités les facteurs les plus significatifs sur la production d'antibiotiques. L'ensemble des résultats est synthétisé dans le Tableau X ci dessous, représentant la moyenne des trois répétitions du test d'activité pour chaque germe cible étudié ainsi que les effets obtenus illustrés dans les figures 12, 13 et 14.

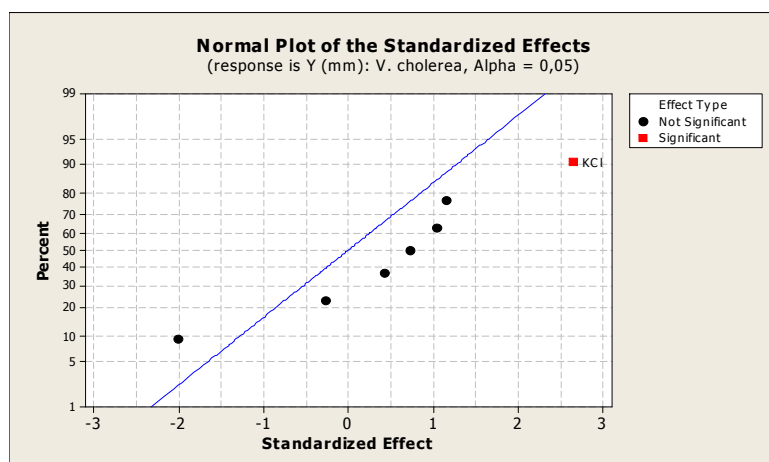
**Tableau X:** Moyenne des zones d'inhibition obtenues par le plan PB sur les 13 milieux de culture à l'égard de différents germes cibles

Germes cibles / Nombre d'expériences	SARM (Y) (mm)	<i>V. cholerae</i> (Y) (mm)	<i>C. albicans</i> (Y) (mm)
C01	8.33	18.06	14.56
C02	9.33	18	16
C03	8.06	11.33	0
C04	12.66	19.06	0
C05	8.33	13.46	11.66
C06	9.2	13	12.5
C07	7.16	10.43	0
C08	8.33	13.8	0
C09	7.83	17.83	0
C10	10.66	6.5	0
C11	7.83	11.16	0
C12	12.33	14.73	13.06
C13	9.92	18.16	14.33

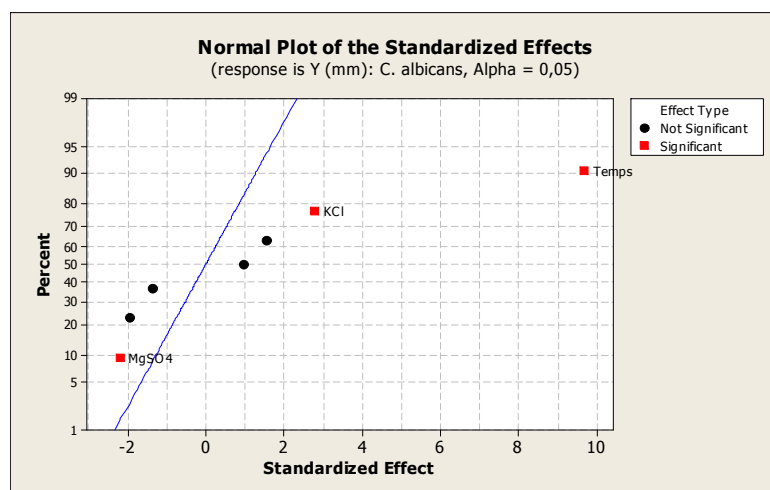
C : Milieu Czapeck



**Figure 12:** Effet des paramètres de culture, étudiés sur milieu Czapeck, sur l'activité antibactérienne de la souche SRC3 vis-à-vis de SARM



**Figure 13:** Effet des paramètres de culture, étudiés sur milieu Czapeck, sur l'activité anti-*Vibrio cholerae* de la souche SRC3



**Figure 14 :** Effet des paramètres de culture, étudiés sur milieu Czapeck, sur l'activité anti-*C. albicans* de la souche SRC3

Suite aux résultats obtenus et illustrés dans les figures 12, 13 et 14, il apparaît clairement que les paramètres de culture ayant des effets significatifs diffèrent d'un germe cible à un autre. En effet, le seul paramètre significatif influençant l'activité antibactérienne vis-à-vis du SARM est le pH initial du milieu de culture. Contrairement à *V. cholerae* où le KCl est le seul facteur significatif influençant la réponse. Concernant la levure *C. albicans*, les résultats démontrent clairement l'effet significatif de 3 paramètres à savoir le KCl, le MgSO<sub>4</sub> (7H<sub>2</sub>O) et le temps d'incubation.

A la lumière des résultats obtenus du plan de Plackett et Burman, les paramètres de culture significatifs influençant l'activité antimicrobienne ont été sélectionnés et retenus pour la suite de la modélisation.

D'autre part, la macromorphologie de la souche SRC3 a également été étudiée, après 10 jours d'incubation à 28°C, sur les 13 milieux de culture préparés selon la matrice du plan de Plackett et Burman et les résultats sont résumés dans le tableau XI et présenté en Annexe V.

La souche étudiée présente des morphologies différentes en fonction des milieux de culture utilisés. En effet, nous remarquons que le mycélium aérien est de couleur blanche sur la majorité des milieux (C1, C2, C3, C6, C8, C10, C11) avec, toutefois, une légère variation de cette dernière sur les milieux C5 et C9 où le MA est de couleur blanche avec une teinte grisâtre alors qu'elle est gris clair avec une teinte blanche sur le milieu C12. Les milieux C4, C7 et C13 ont permis d'avoir des colonies dépourvues de mycélium aérien.

D'autre part, la couleur du mycélium de substrat varie entre jaune clair, beige et blanc. La croissance de la souche est excellente sur pratiquement tous les milieux utilisés, présentant un aspect poudreux et rugueux, à l'exception des milieux C4, C7 et C13 où le MA est absent.

#### **IV.2. Modélisation de l'activité antifongique de la souche SRC3 à l'égard de *C. albicans***

Les plans composites centrés se prêtent au déroulement séquentiel d'une étude. La première étape consiste à appliquer un plan factoriel complet à deux niveaux avec interactions, complété par des points au centre du domaine d'étude. Quand les tests de validation du modèle sont positifs, l'étude s'achève, sinon, des essais supplémentaires sont entrepris pour établir un modèle de second degré.

##### **IV.2.1. Elaboration du modèle de premier degré**

Les paramètres opératoires ( $Z_1$ ,  $Z_2$ ,  $Z_3$ ) considérés pour la modélisation de l'activité antifongique de la souche SRC3 à l'égard de *C. albicans* et codées  $x_j$  ainsi que la moyenne de diamètre des zones d'inhibition ( $Y$ ) et donné dans le tableau XII a ci-dessous.

Dans notre cas le nombre  $N$  de combinaisons possibles des trois facteurs ( $k$ ) sur deux niveaux est égal à  $2^k = 8$ .

**Tableau XII** : Matrice des expériences pour  $k = 3$  et  $N = 8$  ( $2^k$ )

Nombre d'essais	$z_1$	$z_2$	$z_3$	$x_0$	$x_1$	$x_2$	$x_3$	Y (mm)
C1	0.3	0.3	4	1	-1	-1	-1	10.16
C2	0.7	0.3	4	1	+1	-1	-1	10.2
C3	0.3	0.7	4	1	-1	+1	-1	11.13
C4	0.7	0.7	4	1	+1	+1	-1	10.83
C5	0.3	0.3	10	1	-1	-1	+1	7
C6	0.7	0.3	10	1	+1	-1	+1	7
C7	0.3	0.7	10	1	-1	+1	+1	8.33
C8	0.7	0.7	10	1	+1	+1	+1	8.16

**Note:**  $x_0$ : variable fictive,  $z_1$ : KCl (g/L),  $z_2$ : MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (g/L),  $z_3$ : Temps d'incubation, C: milieu Czapeck

La moyenne des zones d'inhibitions des 8 milieux de culture est  $\bar{y} = 9.10$  mm. Le nombre ( $n_0$ ) d'expériences au centre du domaine expérimental est de 3, les diamètres des zones d'inhibition ainsi obtenues sont rassemblés dans le tableau XIII.

**Tableau XIII**: Valeurs des diamètres des zones d'inhibition au centre du domaine d'étude

$n_0$	$y_0$ (mm)
1	14,5
2	14
3	14,5

La moyenne des valeurs de la zone d'inhibition au centre du domaine est :  $\bar{y}_0 = 14,33$  mm

#### IV.2.1.1 Calcul des coefficients du modèle

Les coefficients de l'équation de régression  $b_j$  sont obtenus par le produit scalaire de la colonne  $y$  par les colonnes  $x_j$  correspondantes divisé par le nombre d'expériences  $N$ . les valeurs de ces coefficients sont regroupées dans le tableau XIV.

**Tableau XIV** : Valeurs des coefficients de régression

Terme constant	Effets linéaires		
$b_0$	$b_1$	$b_2$	$b_3$
9.10	-0.054	0.512	-1.48

Effets d'interactions			
b <sub>12</sub>	b <sub>13</sub>	b <sub>23</sub>	b <sub>123</sub>
-0.062	0.012	0.112	0.021

#### IV.2.1.2. Analyse statistique de l'équation de régression

##### ➤ Vérification de la signification des coefficients par le test de Student

Le test de Student permet de déterminer si parmi les coefficients du modèle, il existe des coefficients non significatifs, lesquels seront éliminés de l'équation de régression car leur influence sur l'activité antifongique est négligeable. La procédure de calcul consiste à déterminer (Katarou, 1974; Sadou et Sadou, 1991; Benoit et al., 1994; Goupy, 2001):

- La variance de reproductibilité qui est estimée par celle calculée au centre du domaine expérimental :

$$S_{\text{rep}}^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n_0} (y_i - \bar{y}_0)^2}{n_0 - 1}$$

$y_i$  : Valeur de l'activité antifongique de l'essai  $i$  au centre

$\bar{y}_0$  : Moyenne des 3 essais au centre ;  $\bar{y}_0 = 14.33$  mm

$n_0$  : Nombre d'essais répété au centre;  $n_0 = 3$

On aura alors :  $S_{\text{rep}}^2 = 0.0833$

- Pour identifier les coefficients non significatifs par le test de Student, on détermine les

valeurs de  $t_j$  pour chaque coefficient ;  $t_j = \frac{|b_j|}{S_{b_j}}$ .

Avec :  $S_{b_j}$  : écart quadratique moyen défini par :  $S_{b_j} = \frac{S_{\text{rep}}}{\sqrt{N}} = 0,102$

Les résultats des calculs effectués, sont rassemblés dans le tableau XV ci-dessous :

Tableau XV : Valeurs de  $t_j$ 

Terme constant	Effets linéaires		
$t_0$	$t_1$	$t_2$	$t_3$
89.202	0.530	5.021	14.492

Effets d'interactions			
$t_{12}$	$t_{13}$	$t_{23}$	$t_{123}$
0.612	0.122	1.102	0.204

En utilisant la table de Student relative à un test bilatéral (Annexe VI), on détermine la valeur de  $t_{\alpha}(f)$  pour le niveau de signification  $\alpha = 0.05$  et le nombre de degrés de liberté  $f = n_0 - 1$  qui est égale à 2, soit  $t_{0.05}(2) = 4.3$ , d'après les résultats du tableau précédent, on remarque que les valeurs de  $t_1, t_{12}, t_{13}, t_{23}, t_{123}$  sont inférieures à la valeur tabulée du test de Student (4.3) déduisant ainsi que les coefficients correspondants ( $b_1, b_{12}, b_{13}, b_{23}, b_{123}$ ) ne sont pas significatifs donc ils seront éliminés de l'équation de régression.

L'équation de régression du modèle de premier degré s'écrit alors:  $\hat{y} = 9.10 + 0.51 * x_2 - 1.48 * x_3$

➤ **Test de validation de l'équation de régression**

**a) Recherche de biais**

Avant de valider le modèle postulé, nous devons vérifier l'absence du biais, Pour cela, on calcule la variance résiduelle qu'on va comparer à la variance de reproductibilité par le test de Fisher Snedecor :

$$S_{\text{rés}}^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N - \ell}$$

$\hat{y}_i$  : Valeur du diamètre de la zone d'inhibition pour chaque milieu donné par le modèle.

La variance résiduelle est  $S_{\text{rés}}^2 = 0.0321$

➤ Le rapport F est donné par cette relation: 
$$F = \frac{S_{\text{rés}}^2}{S_{\text{rep}}^2}$$

Pour  $N = 8$  et  $\ell = 3$  ( $\ell$  est le nombre de coefficients significatifs), ce qui donne  $F = 0.385$

La valeur tabulée du test de Fisher pour  $F_{0.95}(N - \ell, n_0 - 1) = F_{0.95}(5, 2)$  est égale à 19.3 (voir Annexe VII). Comme la valeur calculée est inférieure à celle tabulée, le modèle est sans biais, ce qui explique que tous les facteurs influençant sur la réponse sont pris en



considération par le modèle, autrement dit, le modèle décrit correctement les variations de la réponse en fonction des paramètres opératoires.

### b) Test de signification de la régression

Une fois que le modèle est sans biais, nous pouvons donc effectuer le test de Fisher pour la signification de la régression le rapport F s'écrit comme suit:

$$F = \frac{\sum_{i=1}^N (\hat{y}_i - \bar{y})^2 / \ell - 1}{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2 / N - \ell} = 305.37$$

Avec: 
$$\bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^N y_i}{N} = 9.10 \text{ mm}$$

D'après la table de Fisher,  $F_{0,95}(\ell - 1, N - \ell) = F_{0,95}(2, 5)$  est égale à 5,79. Cette dernière étant inférieure à celle calculée, l'équation de régression peut être considérée comme adéquate et le modèle est valide à 95%.

#### ➤ Validation du modèle par le point au centre

Dans cette étape, on compare la valeur de l'activité déterminée par le modèle au centre du domaine d'étude  $\hat{y}(0, 0, 0) = 9.104 \text{ mm}$  à la moyenne des 3 expériences au centre, soit  $\bar{y}_0 = 14.33 \text{ mm}$ .

L'erreur relative absolue entre ces deux valeurs (57%) étant supérieur à 5%, le modèle linéaire de premier degré choisi n'est pas valide. Nous allons donc tester un modèle de second degré.

### IV.2.2 Elaboration du modèle du second degré

Pour élaborer le modèle de second degré, on conserve les résultats des essais du plan factoriel complet avec interactions y compris les résultats des essais effectués au centre du domaine d'étude et on réalise les expériences complémentaires qui nécessitent le plan en étoile. Les valeurs des paramètres de ces essais complémentaires sont regroupées dans le tableau XVI.

**Tableau XVI:** Valeurs des paramètres du plan en étoile

Paramètres opératoires	Niveau (- $\alpha$ )= -1.68	Niveau (+ $\alpha$ )=1.68
x <sub>1</sub>	0.1	0.9
x <sub>2</sub>	0.1	0.9
x <sub>3</sub>	1	13

Note: x<sub>1</sub>: KCl (g/L); x<sub>2</sub>: MgSO<sub>4</sub> (g/L); x<sub>3</sub>: Temps d'incubation

#### IV.2.2.1 Calcul des coefficients du modèle

Le calcul des coefficients de l'équation de régression s'obtient à partir du produit suivant:

$$B = [X^T \cdot X]^{-1} \cdot [X]^T \cdot y$$

Avec:  $[X^T \cdot X]^{-1}$  : La matrice de dispersion

$[X]^T$  : La matrice transposée de  $[X]$ .

Les résultats de ce calcul sont rassemblés dans le tableau XVII ci-dessous.

**Tableau XVII:** Valeurs des coefficients du modèle de second degré avec interaction

Terme constant	Effets linéaires		
b <sub>0</sub>	b <sub>1</sub>	b <sub>2</sub>	b <sub>3</sub>
14.412	0.029	0.074	-1.269

Effets d'interactions et quadratiques					
b <sub>12</sub>	b <sub>13</sub>	b <sub>23</sub>	b <sub>11</sub>	b <sub>22</sub>	b <sub>33</sub>
-0.062	0.0125	0.112	-1.771	-1.535	-1.529

#### IV.2.2.2 Analyse statistique de l'équation de régression

- Vérification de la signification des coefficients

La valeur de la variance de reproductibilité  $S_{rep}^2$  est la même que celle calculée pour le modèle de premier degré,  $S_{rep}^2 = 0.0833$ . pour déterminer la variance des coefficients du modèle de second degré, il suffit de multiplier les éléments  $C_{jj}$  de la diagonale de la matrice de dispersion avec la variance de reproductibilité.

La relation est donné comme suit:  $S_{bj}^2 = C_{jj} \cdot S_{rep}^2$

Les valeurs de  $t_j$  du test de Student sont rassemblées dans le tableau XVIII suivant:

Tableau XVIII: Valeurs de  $t_j$ 

Terme constant	Effets linéaires				
$t_0$	$t_1$	$t_2$	$t_3$		
86.657	0.381	0.956	16.243		
Effets d'interactions et quadratiques					
$t_{12}$	$t_{13}$	$t_{23}$	$t_{11}$	$t_{22}$	$t_{33}$
0.612	0.122	1.102	20.574	17.830	17.761

Pour le niveau de signification  $\alpha = 0.05$  et le nombre de degrés de liberté:  $f = n_0 - 1 = 2$ ; la valeur tabulée du test de Student  $t_{0.05}(2) = 4.3$ . Les valeurs de  $t_1$ ,  $t_2$ ,  $t_{12}$ ,  $t_{13}$ ,  $t_{23}$ , étant inférieure à celle tabulée, les coefficients  $b_1$ ,  $b_2$ ,  $b_{12}$ ,  $b_{13}$  et  $b_{23}$  sont non significatifs et seront éliminés de l'équation de régression.

➤ **Test de validation de l'équation de régression**

a) **Recherche du biais:**

La valeur calculée de la variance résiduelle pour  $N = 17$  et  $\ell = 5$  est donné par:  $S_{\text{rés}}^2 = 0.798$ , ce qui donne  $F = 9.589$

La valeur tabulée du test de Fisher pour le niveau de signification  $\alpha = 0.05$  et les nombres de degrés de liberté  $(N - \ell) = 12$  et  $(n_0 - 1) = 2$  est de 19.4, comme cette valeur est supérieur à celle calculée, le modèle est alors considéré sans biais.

b) **Test de signification de la régression:** La valeur calculée du test de Fisher

$F = 24.334$ , alors que la valeur tabulée pour le niveau de signification  $\alpha = 0.05$  et les nombres de degrés de liberté  $(N - \ell) = 12$  et  $(\ell - 1) = 4$  est de 3,26 comme  $F$  calculé est supérieur à celui tabulé alors le modèle est significatif et valide à 95%. le model de second degré s'écrit alors comme suit:  $\hat{y} = 14.41 - 1.27 \cdot x_3 - 1.77 \cdot x_1^2 - 1.53 \cdot x_2^2 - 1.53 \cdot x_3^2$

c) **Recherche de l'optimum**

Dans les parties précédentes nous avons procéder à une modélisation de nos résultats par le biais d'un plan composite centré qui a permis d'aboutir à un modèle du second degré traduisant de manière significative la variation de l'activité antifongique en fonction des différents paramètres opératoires à savoir: la concentration en KCl ( $x_1$ ), la concentration en  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $x_2$ ) et le temps d'incubation ( $x_3$ ). l'étape de l'optimisation consiste à déterminer les optima de ces facteurs, a cet effet, les courbes isoréponses est de surface de réponses sont

tracées par le logiciel MATLAB 7.0 afin de localiser la région du domaine d'étude où cet optimum apparaît.

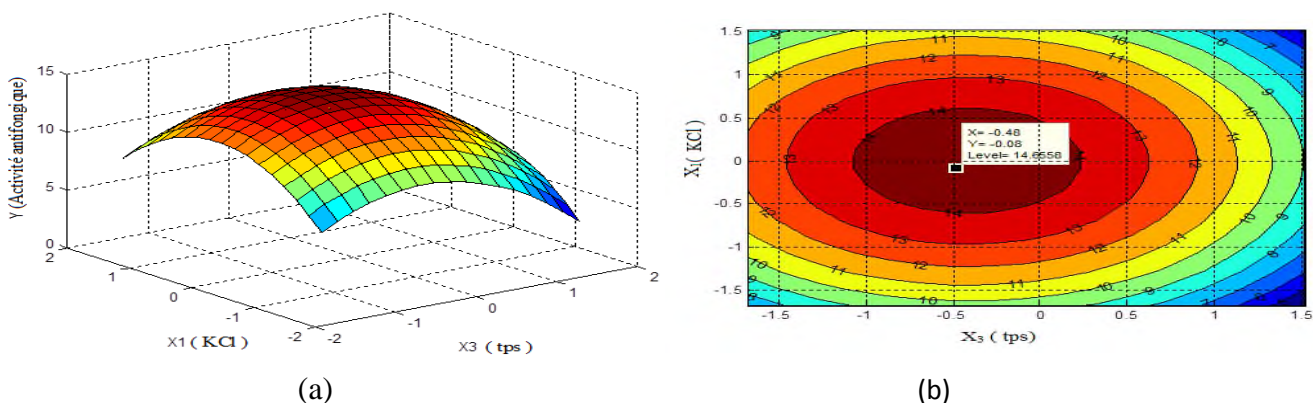
Rappelons l'équation de régression de modèle du second degré:  $\hat{y} = 14.41 - 1.27x_3 - 1.77x_1^2 - 1.53x_2^2 - 1.53x_3^2$

Les optimums sont obtenues en dérivant le modèle prédictif par rapport à chacune des variables  $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$ . La procédure de calcul est comme suit:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial \hat{y}}{\partial x_1} = -3.54x_1 = 0 \Rightarrow x_1 = 0 \\ \frac{\partial \hat{y}}{\partial x_2} = -3.06x_2 = 0 \Rightarrow x_2 = 0 \\ \frac{\partial \hat{y}}{\partial x_3} = -1.27 - 3.06x_3 = 0 \Rightarrow x_3 = -0.41 \end{array} \right.$$

L'activité antifongique théorique pour les valeurs optimales de  $x_1$ ,  $x_2$  et  $x_3$  en remplaçant dans le modèle du second degré est de 14.67 mm.

Les figures 15 a et b suivantes montrent une surface de réponse obtenue en traçant à l'aide du logiciel MATLAB 7.0 l'activité antifongique dans le plan  $x_3$  et  $x_1$  (le temps d'incubation- KCl) et en fixant la variable  $x_2 = 0$  (la concentration en  $MgSO_4$ ). La forme parabolicoïde de cette surface suggère qu'il existe un rendement maximal unique donné par les coordonnées du sommet de cette surface (figure 15 a).



**Figure 15:** surface de réponse (a) et courbe isoreponse (b) pour  $x_2 = 0$

D'après les courbes tracées au dessus, on remarque que la meilleure activité antifongique théorique qui peut être obtenue est de 14.67 mm correspondant aux différentes valeurs des trois paramètres opératoires à savoir:

$x_1 = -0.08$ , correspondant à une concentration en KCl de 0.51 g/L.

$x_2 = 0$ , correspondant à une concentration en  $MgSO_4$  de 0.50 g/L.

$x_3 = -0.48$ , correspondant à le temps d'incubation de 5.56 jours.

### IV.3. Modélisation de l'activité antibactérienne de la souche SRC3 à l'égard de SARM et *V. cholerae*

#### VI.3.1. Elaboration du modèle de premier degré

Les paramètres opératoires ( $Z_1, Z_2$ ) considérés pour la modélisation de l'activité antibactérienne de la souche SRC3 à l'égard de SARM et *V. cholerae* sont codées  $x_j$  ainsi que les moyennes de diamètre des zones d'inhibition ( $Y$ ) et donné dans les tableaux XVIII ci-dessous.

**Tableau XIX a:** Matrice des expériences pour  $k = 1$  et  $N = 2$  ( $2^k$ ) vis-à-vis de *V. cholerae*

Nombre d'essais	$z_1$	$x_0$	$x_1$	$Y$ (mm)
C <sub>1</sub>	0.3	1	-1	18.33
C <sub>2</sub>	0.7	1	+1	16.83

**Note:**  $z_1$ : KCl (g/L), C: milieu Czapeck

La moyenne des zones d'inhibitions des 2 milieux de culture est  $\bar{y} = 17.58$  mm.

**Tableau XIX b:** Matrice des expériences pour  $k = 1$  et  $N = 2$  ( $2^k$ ) vis-à-vis de SARM

Nombre d'essais	$z_2$	$x_0$	$x_1$	$Y$ (mm)
C <sub>1</sub>	5.2	1	-1	10.06
C <sub>2</sub>	9.2	1	+1	10.83

**Note:**  $z_2$ : pH, C: milieu Czapeck

La moyenne des zones d'inhibitions des 2 milieux de culture est  $\bar{y} = 10.45$  mm.

Le nombre ( $n_0$ ) d'expériences au centre du domaine expérimental sont au nombre de 3, les diamètres des zones d'inhibition ainsi obtenues sont rassemblés dans le tableau XX.

**Tableau XX:** Valeurs des zones d'inhibition au centre du domaine d'étude

Nombre d'essais / Germes cibles	1	2	3	$\bar{y}_0$
<i>V. cholerae</i> ( $Y_0$ )	18	18	18.5	18.17
SARM ( $Y_0$ )	9.5	10.25	10	9.92

**Note:**  $\bar{y}_0$  : Moyenne des 3 essais au centre du domaine (mm),  $Y_0$ : valeur de chaque essais au centre du domaine (mm)

#### IV.3.2. Calcul des coefficients du modèle

Les tableaux XXI suivants illustre les valeurs des coefficients de régression pour les 2 germes testés.

**Tableau XXI a:** Valeurs des coefficients de régression pour le germe SARM

Terme constant	Effet linéaire
$b_0$	$b$
11.53	1.46

**Tableau XXI b:** Valeurs des coefficients de régression pour le germe *Vibrio cholerae*

Terme constant	Effet linéaire
$b_0$	$b$
16	1

#### IV.3.3 Analyse statistique de l'équation de régression

##### a) Vérification de la signification des coefficients par le test de Student

- Les variances de reproductibilité pour les germes cibles *Vibrio cholerae* et SARM sont respectivement:  $S_{rep}^2 = 0.0833$  et  $S_{rep}^2 = 0.145$
- Les valeurs de  $t_j$  sont représentées dans les tableaux XXI suivants:

**Tableau XXII a :** Valeurs de  $t_j$  pour *Vibrio cholerae*

Terme constant	Effet linéaire
$t_0$	$t$
78.383	4.898

**Tableau XXII b :** Valeurs de  $t_j$  pour SARM

Terme constant	Effet linéaire
$t_0$	$t$
42.711	5.431

- L'écart quadratique moyen de *Vibrio cholerae* et SARM sont respectivement:

$$S_{bj} = 0.204 \quad \text{et} \quad S_{bj} = 0.270$$

En utilisant la table de Student relative à un test bilatéral, on détermine la valeur de  $t_{\alpha}(f)$  pour le niveau de signification  $\alpha = 0.05$  et le nombre de degrés de liberté  $f = n_0 - 1$  qu'est égale à 2, soit  $t_{0.05}(2) = 4.3$ , comme toutes les valeurs de  $t_j$  calculées sont supérieures à  $t_j$  tabulée alors tous les coefficients sont significatifs pour les 2 germes testés.

Les équations de régressions d'un modèle du premier degré relatives aux germes *Vibrio cholerae* ( $\hat{y}_1$ ) et SARM ( $\hat{y}_2$ ) sont respectivement comme suit:

$$\hat{y}_1 = 16 + x \quad ; \quad \hat{y}_2 = 11.53 + 1.46 * x$$

#### b) Validation du modèle par le point au centre

La valeur moyenne des 3 essais au centre est égale  $\bar{y}_0 = 18.17$  mm, tandis que la valeur de réponse au centre donnée par le modèle pour  $x=0$ , égale à 16 mm obtenue pour le germe testé *Vibrio cholerae*, Cependant ce qui concerne le SARM, La valeur moyenne des 3 essais au centre est égale  $\bar{y}_0 = 9.92$  mm est la valeur de réponse au centre donnée par le modèle pour  $x=0$ , égale à 11.53 mm, comme l'erreur relative calculée pour *Vibrio cholerae* est de 13.56% et égale à 14.01% pour SARM dépasse 5% alors les modèles linéaires de premier degré ne sont pas valides. donc nous allons tester un modèle de second degré.

#### IV.3.4. Elaboration du modèle du second degré

##### a) Calcul des coefficients du modèle

Les valeurs des coefficients du modèle de second degré correspondants aux germes *Vibrio cholerae* et SARM sont résumées dans les tableaux XXIII ci-dessous.

**Tableau XXIII a:** Valeurs des coefficients de régression de "*Vibrio cholerae*"

Terme constant	Effet linéaire
$b_0$	$b$
18.224	0.848
Effet quadratique	
$b_{11}$	-2.518

**Tableau XXIII b:** Valeurs des coefficients de régression de SARM

Terme constant	Effet linéaire
$b_0$	$b$
10.438	3.726
Effet quadratique	
$b_{11}$	-1.570

##### b) Vérification de la signification des coefficients

Les valeurs de  $t_j$  des deux germes sont rassemblées dans les tableaux XXIV suivants:

**Tableau XXIV a** : Valeurs de  $t_j$  pour *Vibrio cholerae*

Terme constant	Effet linéaire
$t_0$	$t$
111.425	6.464
Effet quadratique	
$t_{11}$	14.269

**Tableau XXIV b** : Valeurs de  $t_j$  pour SARM

Terme constant	Effet linéaire
$t_0$	$t$
48.246	21.450
Effet quadratique	
$t_{11}$	6.724

Pour le niveau de signification  $\alpha = 0.05$  et le nombre de degrés de liberté:  $f = n_0 - 1 = 2$ ; la valeur tabulée du test de Student  $t_{0,05} (2) = 4.3$ , comme toutes les valeurs de  $t_j$  calculées sont supérieures à  $t_j$  tabulée alors tous les coefficients sont significatifs.

Les équations de régressions d'un modèle du second degré relative aux germes *Vibrio cholerae* ( $\hat{y}_1$ ) et SARM ( $\hat{y}_2$ ) sont respectivement comme suit:

$$\hat{y}_1 = 18.224 + 0.85 * x_1 - 2.52 * x_1^2 \quad ; \quad \hat{y}_2 = 10.44 + 3.73 * x_1 - 1.57 * x_1^2$$

#### ➤ Recherche de l'optimum

Rappelons l'équation de régression de modèle du second degré pour le germe testé *Vibrio cholerae* :  $\hat{y} = 18.224 + 0.85 * x_1 - 2.52 * x_1^2$

L'optimum de facteur opératoire  $x_1$  qui correspond à la concentration de KCl est donné comme suit:

$$\frac{\partial \hat{y}}{\partial x_1} = 0.85 - 5.04 x_1 = 0 \Rightarrow x_1 = 0.168$$

$x_1 = 0.168$ , correspondant à une concentration en KCl de 0.53 g/L.

Rappelons l'équation de régression de modèle du second degré pour le germe testé SARM:  $\hat{y} = 10.44 + 3.73 * x_1 - 1.57 * x_1^2$

L'optimum de facteur opératoire  $x_1$  qui correspond à la variable naturelle le pH est donné comme suit:

$$\frac{\partial \hat{y}}{\partial x_1} = 3.73 - 3.14 x_1 = 0 \Rightarrow x_1 = 1.19$$

$x_1 = 1.19$ , correspondant à la valeur du pH = 9.58.

#### IV.3.5. Discussion

D'après le modèle du premier degré obtenu traduisant l'activité antifongique vis à vis du *C. albicans*, on remarque que le facteur opératoire qui a une influence positive sur cette dernière est la concentration en  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  ( $x_2$ ) avec un effet de (+0.51), le signe positif de



ce dernier indique que sont augmentation favorise l'accroissement de l'activité antifongique. Les résultats de l'étude réalisée par **Sharma et al., (2012)**, montrent que la concentration en  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  exerce un effet négatif sur la production de molécules bioactives par la souche *Streptomyces flavotricini*, contrairement à ce qui a été déterminé dans notre cas. Cependant le temps d'incubation ( $x_3$ ) exerce un effet négatif sur l'activité antifongique avec une valeur de (-1.47), ce qui explique que l'augmentation du temps de sa valeur minimale (4 jours) à sa valeur maximale (10 jours) fait diminuer la production de molécules bioactives. l'équation de régression montre également qu'il n'existe aucune interaction entre les facteurs opératoires étudiés.

Concernant l'activité antibactérienne vis-à-vis du SARM, le model de premier degré développé montre que le pH exerce un effet positif (+1.46) sur cette dernière en passant d'un niveau minimale 5.2 à sa valeur maximale 9.2. Ce résultat concorde avec celui de **Singh et al., (2009)** qui ont concluent que la production maximale d'antibiotiques par la souche *Streptomyces tanashiensis* A2D est obtenue à pH=8 et qui peut même atteindre un pH=9, ceci a déjà été démontré que les souches de *Streptomyces* produisaient des antibiotiques à des pH alcalins (**Basilio et al., 2009**). La courbe isoréponses tracée confirme ce résultat et montre que le pH optimal est de 9.58.

L'activité antibactérienne de la souche SRC3 vis-à-vis de *Vibrio cholerae* est influencée négativement par la concentration en KCl avec une valeur de son effet de (-1.065) ce qui explique que à des concentrations élevées de ce dernier paramètre diminue la production de molécules anti- *Vibrio cholerae*. L'optimum déterminé par la courbe isoréponse est de 0.53 g/L.

*Références  
Bibliographiques*

### A

- Amanullah A., Justen P., Davies A., Paul G.C., Nienow A.W. and Thomas C.R. (2000). Agitation induced mycelial fragmentation of *Aspergillus oryzae* and *Penicillium chrysogenum*. *Biochem. Eng. J.* **5**(2), 109–114.
- Andriambololona T. (2010). Etudes biologiques et chimiques des métabolites secondaires des actinomycètes telluriques cas de la forêt d'Ankafobe. Thèse Maître ès-Sciences. Université d'Antananarivo-Madagascar, Faculté des sciences, 6p.
- Athalye M., Goodfellow M., Lacey J. and White R.P. (1985). Numerical classification of *actinomadura* and *nocardiosis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **35**(1), 86-98.
- Antony J. (2003). Design of Experiments for Engineers and scientists. Edition: Butterworth-Heinemann. Grande brun. 149p.

### B

- Belyagoubi L. (2014). Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. Thèse de Doctorat. Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, 7p.
- Becker B., Lechevalier M.P. et Lechevalier H.A. (1965). Chemical composition of cell-wall preparations from strain of various form genera of aerobic actinomycetes. *Appl. Microbiol.* **13**(2), 236-243.
- Becker B., Lechevalier M.P., Gordon R.E. and Lechevalier H.A. (1964). Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. *Appl. Microbiol.* **12**, 421-243.
- Box G.E.P., Hunter W.G. et Hunter J.S. (1978). "Statistics for experimenters". Editions Wiley Interscience. Paris.
- Breton A., Theilleux J., Sanglier J.J., Viobis G. (1989). Organismes producteurs: biologie, taxonomie et écologie. In "Biotechnologie des Antibiotiques". Larpent J.P. et Sanglier J.J., Masson : Paris. P33-70.
- Bastide A., De Méo M., Andriantsoa M., Laget M. and Duménil G. (1986). Isolement et sélection de souches d'actinomycète productrices de substances antifongiques de structure non-polyéniques. *Mircen. J.* **2**, 453-466.
- Billerbeck V.G., Roques C., Vanière P. and Marquier P. (2002). Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. Laboratoire de Bactériologie, virologie et microbiologie industrielle. *Hyg. Rev*, N°3.

- Benoit D., Tourbier Y. et Germain S. (1994). "Plans d'expériences, construction et analyse". Technique et documentation. Edition LAVOISIER. Paris. 206p.
- Boughachiche F., Reghioua S., Oulmi I., Zerizer H., Kitouni M., Boudemagh A., Boulahrouf A. (2005). Isolement d'actinomycetales productrices de substances antimicrobiennes a partir de la sebkha de Ain Mlila. Sci. Technol. N °23. p5-10.
- Boudemagh A., Kitouni M., Boughachiche F., Hamdiken H., Oulmi L., Reghioua S., Zerizer H., Couble A., Mouniee D., Boulahrouf A., Boiron P. (2005). Isolation and molecular identification of actinomycete microflora, of some saharian soils of south east Algeria (Biskra, EL-Oued and Ourgla) study of antifungal activity of isolated strains. J. Mycol. Méd. **15**, 39-44
- Basilio A., Gonzalez I., Vicente MF., Gorrochategui J., Cabello A., et Gonzalez A. (2003). Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. J. Appl. Microbiol. **95**,814-823.

### C

- Cross, T. (1982). Actinomycetes: A continuing source of new metabolites. Dev. Ind. Microbiol. **23**, 1–18.

### D

- Djaballah C. (2010). Biodiversité des Actinomycetes Halophiles et Haltolérantes isoles de la Sebkhha de Ain M'lila. Thèse de Magister en Microbiologie. Université de Mentouri- Constantine. Faculté des sciences de la vie et de la nature, p7,8.
- Demain A.L. and Martin J.F. (1980). Control of antibiotic biosynthesis. Rev. Microbiol. **44**, 230-251.
- Demain, A.L. (2000). Small bugs, big business: the economic power of the microbe. Biotech. Adv. **18**, 499-514.
- Doull J.C. et Vining L.C. (1990). Physiology of antibiotic production in actinomycetes and some control mechanisms. Biotech. Adv. **8**, 141-158.
- Daboor S.M., Amany M.H., Neven Abd Elfatah E., and Hanouna S.I. (2014). Heavy metal adsorption of *Streptomyces chromofuscus*. J. C. L. Med. **2**(6),431-437.
- Données de OMS. (2014). Premier rapport de OMS sur la résistance aux antibiotiques: une menace grave d'ampleur mondiale.

### *E*

- Enghusen H. (1956). Electron microscopy of spores and their shell in *Streptomyces*. Rev. Microbiol. **21**(3),329-34.
- Elibol M. (2002). Product shifting by controlling medium pH in immobilized *Streptomyces coelicolor* A3 culture. Pro. Biochem. **37**(12), 1381-1386.

### *F*

- Fleming A (1929). The antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to heir use in the isolation of B. influenzae. IN: Brit. J. Exp. Pathol. **10**,226-236.

### *G*

- Gordon. R.E., Barnett D.A., Handarhan J.E. and Hor-Nay-Pang C. (1974). *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica* and the nocardin strains. Int. J. Syst. Bacteriol. **24**, 54-63.
- Goodfellow M. and Williams S.T. (1983). Ecology of Actinomycetes. Ann. R. Microbiol. **37**,139-216.
- Ghanem N.B., Sabry S.A., El-Sherif Z.M. and Abu El-Elal G.A. (2000). Isolation and enumeration of marine actinomycetes from seawater and sediments in Alexandria. J. Gen. Appl. Microbiol. **46**,105-111.
- Goupy J.(1999). Plans d'expériences pour surfaces de réponses. Edition: DUNOD. Paris. 409p.
- Goupy J. (2005). Pratiquer les plans d'expériences. Edition : DUNOD. Paris.p501-295.
- Goupy J. (2006). Les plans d'expériences. MODULAD. N°34. p80.
- Goupy J. (2001). Introduction aux plans d'expériences. 2<sup>ème</sup> Edition: DUNOD. Paris. 109p.
- Gayathri A., Madhanraj P., and Panneerselvam A. (2011). Diversity, Antibacterial Activity And Molecular Characterization of Actinomycetes Isolated From Salt Pan Region of Kodiakarai, Nagapattinam DT. Asian J. Pharm. Tech. **(1)**3, 79-81.
- Goodfellow M., Williams S.T. and Mordarski M. (1984). Introduction to and importance of the actinomycetes. In: « The biology of the actinomycetes », Goodfellow M., Williams S. and Mordarski M.(Eds.). London: Academic Press, p.1-6.

- Goodfellow M. (2012). Phylum XXVI. Actinobacteria. In: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" Whitman W.B., Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H.J., Trujillo M.E., Ludwig W., Suzuki K., Parte A. Volume 5,34-2028.
- Gottlieb D. (1973). General consideration and implication of the *Actinomycetales*. In: *Actinomycetales* characteristics and practical importance. Edited by Sykes G. and Skinner F. A., Academic Press. London, New York.

### *H*

- Hodgson D. A. (2000). Primary metabolism and its control in streptomycetes: A most unusual group of bacteria. *Adv. Microbial Physiol.* **42**,47–238.

### *I*

- Ivantiskay L.P., Singal S.M., Bibikova M.V., Vostrov S.N. (1978). Direct isolation of *Micromonospora* on selective media with gentamicin. *Antibiotiki.* **23**, 690-692.

### *J*

- Jensen P.R., Dwight R. and Fenical W. (1991). Distribution of actinomycetes in near shore tropical marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**(4),1102-1108.
- James P.D., Edwards C., Dawson M. (1991). The effect of temperature, pH and growth rate on secondary metabolites in *Streptomyces thermoviolaceus* grown in Chemostat. *J. Gen. Microbiol.* **137**,715-20.
- Jakimowicz D. (2007). Chromosome segregation and cell division during the growth and differentiation of *Streptomyces*. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **61**,565-575.

### *K*

- Kitouni M. (2007). Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotique à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse de Doctorat. Université Mentouri- Constantine, Faculté des sciences de la nature et de la vie, 6p.
- Kuster E. and Williams. S.T. (1964). Selection of media for isolation of *Streptomyces*. *Nature.* **202**,928-929.
- Kim S.B., Seong C.N., Jeon S.J., Bae K.S., et Goodfellow M. (2004). Taxonomic study of neurotolerant acidophilic actinomycetes isolated from soil and description of *Streptomyces yeochonensis* sp.nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**(1),211-214.

- Kroppenstedt R.M., Stackebrandt E., Goodfellow M. (1990). Taxonomic revision of the actinomycete genera *Actinomadura* and *Microtetraspora*. *J. Syst. Appl. Microbiol.* **13**,148-160.
- Karam S. (2004). Application de la méthodologie des plans d'expériences et de l'analyse de données l'optimisation des processus de dépôt. Thèse de doctorat. Université de LIMOGES. Faculté de des sciences et techniques. France, 8p.
- Katarou V. (1974). Méthodes cybernétiques et technologie chimique. Edition: MIR. Moscou. 98p.

### ℒ

- Lechevalier M.P. (1981). Ecological associations involving actinomycetes. In: Actinomycetes. Shaal and pulverer (Eds.). *Zbl. Bakt. Suppl.* **11**,159-166.
- Lechevalier M.P., De Bievre C. and Lechvaleir H.A. (1977). Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: Phospholipid composition. *Biochem. Syst. Ecol.* **5**, 249-260.
- Lechevalier M.P. and Lechevalier H.A.(1970). Composition of Whole cell hydrolysates as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes in: *The Actinomycetales*.311-316.
- Lechevalier M.P. and Lechevalier H.A.(1970). Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int .J. Syst. Bacteriol.* **20**,435-443.
- Lawrence C.H. (1956). A method for isolating actinomycetes from scabby potato tissue and soil with minimal contamination. *Canad. J. Bot.* **34**, 44-47.
- Lagane C. (2007). Rôle de L'IL-13 et des ligands de PPAR- $\gamma$  dans la réponse anti-infectieuse des Macrophages Murins et des Monocytes Humains vis-à-vis de *Candida albicans*. Implication de PPAR- $\gamma$ . Thèse de doctorat. Université Toulouse III- Paul Sabatier. France. 14p.

### ℳ

- Marchal N., Bourdon J. L. and Richard C. I. (1987). Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Doin Editor. Paris, p67-122.
- Marie-Claude M., Pharm B.,M.SC. (2012). Infection nosocomiale à *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline chez un patient adulte hospitalisé :quel antibiotique choisir ?. vol. 46. N°1.
- Mariat F. et Sebald M. (1990). Actinomycètes *In: Bactériologie Médicale*. Minor L. et Véron M. (Eds), 2<sup>ème</sup> édition, Flammarion. Paris. 935-949.

### O

- Okami Y. and Hotta K. (1988). Search and discovery of new antibiotics. In Actinomycetes in Biotechnology. Goodfellow M., Williams S.T., and Mordarski M. (Eds). New York,USA: Academic Press, pp. 33–67.
- Omura S. (1992). The search for bioactive compounds from microorganisms. Springer, Verlag, New York.
- Ozil P. (1997). Plans d'expériences : Méthode de TAGUCHI. E.N.S d'électrochimie et d'Electrometallurgie INPG.
- Oskay M., Tamer A.U. and Azeri C. (2004). Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. A. J. Biotech. **3** (9), 441-446.
- Omura S., Tanaka Y., Hamada H., and Masuma R. (1984). Effect of ammonium ion inorganic phosphate and amino acids of the biosynthesis of protylonolide, a precursor of tylosin aglycone. J. Antibiot. **37**,494-502.

### P

- Panchanathan M., Jayachandran V., and Se-Kwon Kim. (2013).Marine micriobiology: Bioactive compounds and Biochnological Application., Introduction to Marine Actinobacteria. 2p.

### R

- Rainey F.A., Ward-Rainey N., Kroppenstedt R.M. and Stackebrandt E. (1996). The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage proposal of *Nocardiopsaceae* fam. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **46**, 1088-1092.

### S

- Singh L. S., Baruah I. and Bora T.C. (2006) . Actinomycetes of lakeloktat Habitat: Isolation and screening for antimicrobial Activities. Biotech. Asian N. Sci. Info. **5**(2), 217-221.
- Smaoui S. (2010). Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de doctorat., Institut national polytechnique de Toulouse. France. p26.
- Stackebrandt E. and Woese C.R. (1981b). The evolution of prokaryotes. Synop. Soc. Gen. Microbiol. **32**,1-31.



- Shirling E.B., and Gottlieb D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Sys. Bacteriol.* **16**(3), 313-340.
- Sierra G. (1957). A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *J. Microbiol. Serol.* **23**, 15-22.
- Saha D.S. and Dasgupta A. (2005). Antifungal activity of some plant extracts against fungal pathogens of tea (*camellia sinensis*). *pharmaceutical. Biol.* **43**,87-91.
- Strub C. (2008). Modélisation et Optimisation de la production de thiolutine chez *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de doctorat. Université Toulouse. France, 52p.
- Spizek J. and Tichy P. (1995). Some aspects of overproduction of secondary metabolites. *Floia Microbiol.* **40**, 43-50.
- Siddique S., Quratulain S., Ahmad A., Muhammad N., Muhammad I., Fahim Ashraf Q. (2013). Production of Avermectin B1b From *Streptomyces avermitilis* 41445 by Batch Submerged Fermentation. *J. Microbiol.* **6**(8), e7198.
- Sharon F.B.S., Daniel R. R. et Shenbagarathai R. (2014). Optimization of antibiotic production by marine actinomycetes streptomyces Sp. Kod10. *Int. J. Pharm. Sci.* Vol **6** Suppl (2),506-510.
- Sharma D., Kaur T., Chadha B. S. et Manhas R. K. (2011). Antimicrobial Activity of Actinomycetes Against Multidrug Resistant *Staphylococcus aureus*, *E. coli* and Various Other Pathogens. *T. J. Pharm.* **10**(6), 801-808.
- Singh L.S., Mazumder S., et Bora T. C. (2009). Optimisation de la croissance se de la production de métabolite bioactive par *Streptomyces tanashiensis* souche A2D, une actinomycète alcaliphile et tolérant au sel. *J. Mycol. Méd.* **19**,225-233.
- Sharma D. et Manhas R. K. (2012). Application of Plackett-Burman experimental design and Box and Wilson design to improve broad-spectrum antimicrobial compound. *Indian J. Biotech.* **12**,386-394.
- Sadou G. et Sadou MC. (1991). Les plans l'expériences et l'expérimentation à l'assurance qualité. Edition: AFNOR technique. 90p.

### T

- Theilleux J. (1993). Les actinomycètes in "Microbiologie industrielle": Les microorganismes d'intérêt industriel, Leveau. J.Y. et Mouix M. Lavoisier Tech et Doc, Apria, (612) pp 425.

- Tanaka Y., Taki A., Masuma R., Omura S. (1986). Mechanism of nitrogen regulation of protyylonolide biosynthesis in *Streptomyces fradiae*. J. Antibiot. **39**,813-821.

### V

- Vijayakumar R., Panneerselvam K., Muthukumar C., Thajuddin N., Panneerselvam A., et Saravanamuthu R. (2010). Optimization of antimicrobial production by a marine Actinomycete *Streptomyces afghaniensis* VPTS3-1 isolated from Palk Strait, East Coast of India. Indian J. Microbiol. **52**(2),230-239.
- Vijayakumar R., Muthukumar C., Thajuddin N., Panneerselvam A. and Saravanamuthu R. (2007). Studies on the diversity of actinomycetes in the Palk Strait region of Bay of Bengal, India. Actinomycetologica, **21**(2), 59-65.
- Valois D., Fayad K., Barasubiye T., Garon M., De'Ry C., Brezezinski R. et Beaulieu C. (1996). Glucanolytic Actinomycetes Antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, the Causal Agent of Raspberry Root Rot. Appl. Enviro. Microbiol. **62**(5), 1630-1635.

### W

- Wayne L.G., Brenner D.J., Colwell R.R., Grimont P.A.D., Kandler O., Krichevsky M.I., Moore L.H., Moore W.E.C., Murry R.G.E., Starr M.P. and Trüper H.G. (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematic. Int. J. Syst. Bacterial. **37**,463-464.

### Y

- Yamaguchi T. (1965). Comparison of the cell-wall composition of morphologically distinct actinomycetes. J. Bacteriol. **89**(2), 444-453.
- Jiang Y., Chen X., Cao Y., Ren Z. (2013). Diversity of Cultivable Actinomycetes in Tropical Rainy Forest of Xishuangbanna, China. O. J. Soil. Sci. **3**, 9-14

# *Annexes*

## Annexe I

### Matériel utilisé

- Autoclave (OMRON)
- Balance analytique (RADWAG Model : WLC 0.6/A1/C/2)
- Barreaux magnétiques
- Bec bunsen
- Boite de Petri de 99 mm
- Boite de Petri de 57 mm
- Bain Marie (GFL : Gesellschaft für Labortechnik m.b.H. & Co. D 3006 Burgwedel 1)
- Ecouvillons
- Erlenmeyers
- Etuve à 28 °C, à 37°C, à 44°C et 50°C (memmert)
- Micropipette de 1000 µL avec embouts plastiques
- Microscope optique (WILL wetzlar)
- Pied à coulisse (STINLESSE HARADEND)
- Pipette Pasteur
- Plaque agitatrice (VELP SCIENTIFICA)
- Spatule
- Tube à essais
- Vortex (VELP scientifica référence : ZX<sup>3</sup>)

## Annexe II

### Milieux de culture d'isolement, d'identification et de caractérisation physiologique

#### I. Milieux d'isolement

##### I.1. Milieu SCA (Starch Casein Agar) (Kuster et Williams, 1964)

Amidon : 10g, Caséine : 0.3g, KNO<sub>3</sub> : 2g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 2g, NaCl : 2g, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O : 0.05g, CaCO<sub>3</sub> : 0.02g, FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O : 0.01g, Agar 18g, H<sub>2</sub>O d : 1000 mL, pH 7.2±0

##### I.2 Milieu Czapeck (Lawrence, 1956)

NaNO<sub>3</sub> : 3.0 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 1.0 g, MgSO<sub>4</sub> . 7H<sub>2</sub>O : 0.5 g, KCl : 0.5 g, FeSO<sub>4</sub> . 7H<sub>2</sub>O : 10.0 mg, Amidon : 10.0 g, Agar : 18.0 g, H<sub>2</sub>O d : 1 L, pH 7±0.2.

##### I.3 Milieu Gause (Ivantiskaya et al., 1978)

Amidon : 20 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 0.5g, KNO<sub>3</sub> : 1g, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O : 0.5g, Agar : 20g, H<sub>2</sub>O d : 1000 mL, pH 7.4±0.2

#### II. Milieux d'identification

Les milieux ISP ont été préconisés par l'International *Streptomyces* Project (Shirling et Gottlieb, 1966).

##### II.1 Milieu ISP1

Tryptone : 5g ; extrait de levure : 3g ; agar : 15g ; eau distillée q.s.p : 1000 ml. pH = 7,2

##### II.2 Milieu ISP2

Glucose: 4 g ; extrait de levure: 4 g ; extrait de malt: 10 g ; au distillée q.s.p. 1000 mL; agar: 20 g. pH 7,2.

##### II.3 Milieu ISP3

Farine d'avoine : 20 g; solution saline standard: 1 mL ; agar: 20 g ; eau distillée q.s.p. 1000 mL. pH 7,2.

- **Solution saline standard:** FeSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 0,1 g ; MnCl<sub>2</sub>, 4H<sub>2</sub>O: 0,1 g ; ZnSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 0.1 g ; eau distillée q.s.p. 100 mL.

##### II.4 Milieu ISP4

Amidon: 10 g ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 1 g ; MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 1 g ; NaCl: 1 g ; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 2 g ; CaCO<sub>3</sub>: 2 g ; Solution saline standard (voir ISP3) : 1 mL ; agar : 20 g ; eau distillée q.s.p. 1000 mL. pH 7,2.

## II.5 Milieu ISP6

Peptone : 15 g ; protéose peptone 5 g ; citrate de fer ammoniacal 0.5g ; thiosulfate de sodium 0.08, extrait de levure 1 g, H<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g, agar 20g, eau distillée q.s.p. 1000 mL.

## III. Milieux de caractérisation physiologique

### III.1. Dégradation des glucides

#### Milieu ISP9 (Milieu de base)

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : 2,64g ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 2,38g ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 5,65g; MgSO<sub>4</sub> ; 7H<sub>2</sub>O : 1g; Solution saline\* : 1 ml; eau distillée : 1000 ml ; agar : 20g; pH : 6,8-7.

- Solution saline: CuSO<sub>4</sub> ; 5H<sub>2</sub>O: 0,64g; FeSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 0,11 g; MnCl<sub>2</sub>, 4H<sub>2</sub>O: 0,79 g; ZnSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 0.15 g; eau distillée : 1000 ml.

### III. 2 Dégradation du tween 80 (Sierra, 1957)

Tween 80 : 10 mL ; NaNO<sub>3</sub> : 1 g ; extrait de levure : 5 g ; solution saline: 50 mL ; CaCl<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O: 0,1 g ; eau distillée q.s.p. 1000 mL; agar : 18 g ; pH 7,2.

- Solution saline: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 0,25 g ; MgSO<sub>4</sub> ; 7H<sub>2</sub>O: 0,125 g ; NaCl: 0,125 g ; FeSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 0,00 1 g ; MnSO<sub>4</sub> : 0,00 1 g ; eau distillée q.s.p. 50 mL.

La dégradation du tween 80 se manifeste par une auréole opaque autour des colonies

### III. 3 Dégradation de la tyrosine, (Goodfellow, 1971 ; Gordon et al., 1974)

0,4 g de tyrosine est suspendu dans 10 ml d'eau distillée et stérilisé. La suspension est ajoutée à 100 ml de gélose nutritive stérile pH 7,5 et maintenue en surfusion à 50°C. La dégradation se manifeste par une auréole claire autour des colonies.

### III.4 Dégradation des sels de sodium (Gordon et al., 1974)

Sel de sodium (acétate, citrate, oxalate): 2 g ; NaCl: 2 g ; MgSO<sub>4</sub> ; 7H<sub>2</sub>O: 0,2 g ; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 1 g ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 0,5g ; agar: 15 g ; eau distillée q.s.p. 1000 mL; solution aqueuse de rouge de phénol à 0,04% : 20 mL ; pH 6,8.

La dégradation est notée positivement après virage de l'indicateur coloré du jaune au rouge-rose.

### III.5 Sensibilité à divers agents physiques et chimiques

#### Milieu Glucose-Yeast Extract-Agar (G.Y.E.A) (Athalye et al., 1981)

Extrait de levure : 10g; glucose : 10g; agar : 18g; eau distillée q.s.p : 1000 mL ; pH = 6,8.

Additionnés des différentes concentrations en NaCl : 0, 1, 3,5, 7, 10, 15%

## Annexe III

**Tableau VIII** : Caractéristiques macromorphologiques de la souche SRC3 après 3, 7, 14, 21 jours d'incubation, à 28°C

Milieu Czapeck	Isolat SRC3			
	3 <sup>ème</sup> jour	7 <sup>ème</sup> jour	14 <sup>ème</sup> jour	21 <sup>ème</sup> jour
Couleur du mycélium aérien (MA)	Blanc	Blanc	Gris avec une teinte blanchâtre	Gris avec une teinte blanchâtre
Couleur du mycélium du substrat (MS)	Blanc	Jaune claire	Jaune claire	Jaune claire
Production de pigments diffusibles	–	–	–	–
Aspect des colonies	Petites colonies rugueux	Petites colonies, rugueux	Colonies de taille moyenne, craie et rugueux	Colonies de taille moyenne, craie et rugueux
Croissance	+	+++	++++	++++

**Note:** ++++ Excellente croissance, + + +, Très bonne croissance, + +, croissance Moyenne. +, Faible croissance, –, Absence de croissance.

## Annexe IV

Tableau IX b : Profile de résistance des germes cibles utilisés

La résistance ou la sensibilité des germes cibles						
Antibiotiques Germe cible	<i>B.subtilis</i>	<i>S. typhi</i>	<i>V.cholerea</i>	SARM	<i>S. aureus</i>	<i>P. aerogenosa</i>
➤ l'Amoxicilline 25 µg	22/22	23/23	18/21	7.2/7.2	24/24	0
➤ Oxacilline 1µg	0	0	17/18.5	17/17.2	0	0
➤ Pénicilline G 10µg	29/29	26/28	16.5/17.5	9/12.5	26/28.5	0
➤ l'Amoxicillave 30µg	32/32	29/29	27/28	11/11	30/30	0
➤ Tobramycine 10µg	/	31.5/31.5	23/23	9/10	30.5/31	39/30
➤ Erythromycine 15µg	10 /13	29/29	27/28	0	29/32	13/13
➤ Piperacilline 100µg	27/29	26/27	18/18	14/17	27/30	27/27
➤ Tétracycline 30µg	29/29	26/26.5	30/31	21.5/24	26/26	0
➤ Gentamycine 10µg	31/32	28/28	27/28	25.5/27	30/30.5	24/24



## Annexe V

**Tableau XI:** Caractéristiques morphologiques de la souche SRC3 après 10 jours d'incubation à 28°C sur les différents milieux de Czapeck

Czapeck Souche SRC3	Couleur du mycélium aérien (MA)	Couleur du mycélium du substrat (MS)	Production de pigments diffusibles	Aspect des colonies	Croissance
C1	Blanc	Blanc à crème	–	Colonies moyennes, rugueuse	+++
C2	Blanc	Jaune claire	–	Petites colonies	+++
C3	Blanc	Jaune claire	–	Petites colonies rugueuse	++
C4	–	Jaune claire	–	Petites colonies rugueuse	++
C5	Blanc avec une teinte grisâtre	Blanc	–	Rugueux, poudreux	++
C6	Blanc	Jaune claire	–	Rugueux, poudreux	++++
C7	–	Jaune claire	–	Petites colonies rugueuse	+++
C8	Blanc	Jaune claire	–	Poudreux	++++
C9	Blanc avec une teinte grisâtre	Beige	–	Poudreux	++++
C10	Blanc	Beige	–	Colonies moyennes, poudreux	+++
C11	Blanc	Blanc	–	Petites colonies, rugueuses	+++
C12	Gris claire avec une teinte blanchâtre	Blanc	–	Colonies moyennes, rugueuses	++++
C13	–	Jaune	–	rugueux	++

**N.B :** C : milieu Czapeck, ++++ Excellente croissance, +++ Très bonne croissance, ++ croissance Moyenne, - Croissance absente

## Annexe VI

Table de Student (Goupy ; 1999 et Ozil ; 1997)

Unilatéral Bilatéral	<b>0.01</b> <b>0.20</b>	<b>0.05</b> <b>0.10</b>	<b>0.025</b> <b>0.05</b>	<b>0.01</b> <b>0.02</b>	<b>0.005</b> <b>0.01</b>
<b>1</b>	3,08	6,31	12,7	31,8	63,7
<b>2</b>	1,89	2,92	4,30	6,97	9,92
<b>3</b>	1,64	2,35	3,18	4,54	5,84
<b>4</b>	1,53	2,13	2,78	3,75	4,60
<b>5</b>	1,48	2,02	2,57	3,37	4,03
<b>6</b>	1,44	1,94	2,45	3,14	3,71
<b>7</b>	1,42	1,90	2,37	3,00	3,50
<b>8</b>	1,40	1,86	2,31	2,90	3,36
<b>9</b>	1,38	1,83	2,26	2,82	3,25
<b>10</b>	1,37	1,81	2,23	2,76	3,17
<b>11</b>	1,36	1,80	2,20	2,72	3,10
<b>12</b>	1,36	1,78	2,18	2,68	3,06
<b>13</b>	1,35	1,77	2,16	2,65	3,01
<b>14</b>	1,35	1,76	2,15	2,62	2,98
<b>15</b>	1,34	1,75	2,13	2,60	2,95
<b>16</b>	1,34	1,75	2,12	2,58	2,92
<b>17</b>	1,33	1,74	2,11	2,57	2,90
<b>18</b>	1,33	1,73	2,10	2,55	2,88
<b>19</b>	1,33	1,73	2,09	2,54	2,86
<b>20</b>	1,33	1,73	2,09	2,53	2,85
<b>21</b>	1,32	1,72	2,08	2,52	2,83
<b>22</b>	1,32	1,72	2,07	2,51	2,82
<b>23</b>	1,32	1,71	2,07	2,50	2,81
<b>24</b>	1,32	1,71	2,06	2,49	2,80
<b>25</b>	1,32	1,71	2,06	2,49	2,79
<b>26</b>	1,32	1,71	2,06	2,48	2,78
<b>27</b>	1,31	1,70	2,05	2,47	2,77
<b>28</b>	1,31	1,70	2,05	2,47	2,76
<b>29</b>	1,31	1,70	2,05	2,46	2,76
<b>30</b>	1,31	1,70	2,04	2,46	2,75
<b>40</b>	1,30	1,68	2,02	2,42	2,70
<b>∞</b>	1,28	1,65	1,96	2,33	2,58

## Annexe VII

## Table de Fisher (Goupy, 1999 et Ozil, 1997)

Valeurs des 95<sup>nièmes</sup> centiles (niveaux 0.05)

F0.95 pour la distribution F

$\nu_1$ → $\nu_2$ ↓	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	∞
1	161	200	216	225	230	234	237	239	241	242	244	246	248	249	250	254
2	18.5	19.0	19.2	19.2	19.3	19.3	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.5	19.4	19.5
3	10.1	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.74	8.7	8.66	8.64	8.62	8.53
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.0	5.96	5.91	5.86	5.80	5.77	5.75	5.63
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.68	4.62	4.56	4.53	4.50	4.37
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.00	3.94	3.87	3.84	3.81	3.67
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.57	3.51	3.44	3.41	3.38	3.23
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.28	3.22	3.15	3.12	3.08	2.93
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.07	3.01	2.94	2.90	2.86	2.71
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.91	2.85	2.77	2.74	2.70	2.54
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.79	2.72	2.65	2.61	2.57	2.40
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.8	2.75	2.69	2.62	2.54	2.51	2.47	2.30
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.60	2.53	2.46	2.42	2.38	2.21
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.7	2.65	2.60	2.53	2.46	2.39	2.35	2.31	2.13
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.48	2.40	2.33	2.29	2.25	2.07
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.42	2.35	2.28	2.24	2.19	2.01
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.38	2.31	2.23	2.19	2.15	1.96
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.34	2.27	2.19	2.15	2.11	1.92
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.31	2.23	2.16	2.11	2.07	1.88
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.28	2.20	2.12	2.08	2.04	1.84
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32	2.25	2.18	2.10	2.05	2.01	1.81
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30	2.23	2.15	2.07	2.03	1.98	1.78
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27	2.20	2.13	2.05	2.01	1.96	1.76
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25	2.18	2.11	2.03	1.98	1.94	1.73
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24	2.16	2.09	2.01	1.96	1.92	1.71
26	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27	2.22	2.15	2.07	1.99	1.95	1.9	1.69
27	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25	2.2	2.13	2.06	1.97	1.93	1.88	1.67
28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24	2.19	2.12	2.04	1.96	1.91	1.87	1.65
29	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22	2.18	2.10	2.03	1.94	1.90	1.85	1.64
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.09	2.01	1.93	1.89	1.84	1.62
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08	2.00	1.92	1.84	1.79	1.74	1.51
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04	1.99	1.92	1.84	1.75	1.70	1.65	1.39
120	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.18	2.09	2.02	1.96	1.91	1.83	1.75	1.66	1.61	1.55	1.25
∞	3.84	3.00	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.88	1.83	1.75	1.67	1.57	1.52	1.46	1.0

 $\nu_1$  degrés de liberté au numérateur $\nu_2$  degrés de liberté au dénominateur

*Conclusion*

L'accroissement incontrôlable de la résistance bactérienne vis-à-vis des antibiotiques ne cesse d'augmenter, et la recherche de nouvelles molécules bioactives, devient une nécessité.

Dans cette présente étude, nous nous sommes proposé d'étudier les aspects morphologiques, physiologiques et la mise en évidence de l'activité antimicrobienne de souches d'actinomycètes nouvellement isolées à partir de sédiments de rivière de l'oued Ziama ainsi que l'optimisation de la production des molécules bioactives par le biais des plans d'expériences.

Pour atteindre ce but, le travail a été divisé en quatre parties :

**1-** Trois milieux de culture ont été utilisés pour l'isolement sélectif des actinomycètes, ces derniers ont permis d'isoler et de purifier 39 souches présentant les caractéristiques macroscopiques des actinomycètes. De ces résultats, le milieu SCA s'est avéré être le milieu le plus efficace pour la récupération des actinomycètes à partir des sédiments de rivière avec un nombre de 17 isolats en comparaison aux milieux Czapeck et Gause qui ont permis d'avoir 14 et 8 isolats respectivement.

**2-** L'évaluation de l'activité antimicrobienne de 36 souches a permis de sélectionner la souche SRC3 pour la suite de notre étude. Cette dernière a présenté un antagonisme intéressant à la fois, à l'égard des bactéries à Gram positif (SARM, *S. aureus*) et à Gram négatif (*E. coli*, *V. cholerae* et *S. typhi*) et de la levure *C. albicans*.

D'autre part, un test d'antagonisme est réalisé dans le but de déterminer le meilleur milieu de production des molécules bioactives en cultivant la souche étudiée sur trois milieux de culture de compositions différentes. Les résultats obtenus ont permis de sélectionner le milieu Czapeck, pour la suite de notre étude, car ce dernier a présenté d'importantes activités antibactériennes d'une part, et un spectre d'activité plus large en comparaison avec les milieux Gause et SCA utilisés.

**3-** Des études d'identification morphologiques, physiologiques et biochimiques ont été réalisés et les résultats montrent que la souche étudiée appartient au genre *Streptomyces*, où le nom *Streptomyces* sp. SRC3 lui a été attribué.

**4-** L'étude de la modélisation et de l'optimisation de la production de molécules bioactives de la souche SRC3 a été entreprise à l'égard de SARM, *V. cholerae* et de *C. albicans*. Cette optimisation effectuée sur le milieu Czapeck préalablement sélectionné est réalisée en utilisant 2 plans d'expériences : le plan de Plackett et Burman, utilisé en premier lieu dans un but de sélection des facteurs significatifs agissant sur l'activité antimicrobienne et par le plan factoriel complet, en second lieu, pour la détermination des optima.

Les résultats du test de PB ont permis la sélection de trois facteurs comme variables à l'égard de *C. albicans* : KCl, MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O et le temps d'incubation et un seul facteur opératoire à l'égard de SARM : pH et de *V. cholerea* : KCl.

Une modélisation statistique a été entreprise en utilisant le plan composite centré en vue de déterminer les paramètres influençant sur cette production ainsi que leur optimisation. L'isolat a été cultivé sur milieu Czapeck à différentes concentrations des variables opératoires présélectionnés.

La modélisation par le biais du plan factoriel complet à montré que le facteur influençant positivement sur l'activité de la souche SRC3 vis-à-vis de *C. albicans* est le MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O tandis que le facteur qui exerce un effet négatif sur cette activité est le temps d'incubation.

D'autre part, le pH influence d'une manière positive sur l'activité antibactérienne à l'égard du SARM, contrairement au germe *V. cholerea* où le KCl exerce un effet négatif sur cette même activité.

Les concentrations optimales de ces paramètres ont pu être délimitées par le tracé de courbes iso- réponses dont les valeurs sont les suivantes : pour *C. albicans* : KCl (0.34 g/L au lieu de 0.5 g/L), MgSO<sub>4</sub> (0.5 g/L), le temps d'incubation (5.5 jours au lieu de 7 jours), ces optimums ont permis de calculer la valeur théorique de l'activité antifongique qui est de 14.67 mm, légèrement supérieur à celle obtenue avant l'optimisation (14.33 mm).

La concentration optimale de KCl est de (0.53g/L au lieu de 0.50g/L) pour *V. cholerea* ce qui donne une activité antibactérienne théorique de 18.29 mm au lieu de 18.17 mm obtenue au centre de domaine.

Tandis que l'optimum de la valeur du pH pour l'activité antibactérienne à l'égard du SARM est de 9.58 au lieu de 7.2. La valeur théorique de l'activité antimicrobienne optimisée est 12.65 mm qui est supérieur à celle obtenue au centre du domaine avant optimisation qui est de 9.92 mm.

Les résultats obtenus à travers cette étude semblent prometteurs et nous incitent à poursuivre nos efforts de recherche dans cette thématique afin de sélectionner des espèces d'actinomycètes dotées d'activités biologiques intéressantes.

Toutefois, il ressort de l'intérêt de poursuivre les investigations au tour des axes suivants:

- Extraction, purification et caractérisation de(s) molécules bioactives produites par la souche SRC3 sélectionnée.
- Elargir la gamme de germes cibles pour l'isolat étudiée.
- Tester l'activité antagoniste de la souche SRC3 sur milieu liquide.

## Résumé

L'analyse de 3 échantillons de sédiments de rivière provenant de la région de Ziama (Jijel), en utilisant 3 milieux de culture différents, a permis l'isolement de 39 souches d'actinomycètes. L'activité antagoniste des 39 isolats a été entreprise à l'égard d'*E. coli*, SARM et de *C.albicans*, permettant la sélection de la souche SRC3 pour son pouvoir antimicrobien intéressant.

L'étude morphologique de la souche a permis de la rattacher au genre *Streptomyces* où le nom *Streptomyces* sp. SRC3 lui a été attribué. D'autre part, son étude physiologique a permis de déterminer sa capacité à réduire différents métaux lourds à 50mg/L tels que le cadmium, le chrome, le fer et le cuivre.

La mise en évidence de l'activité antibactérienne de la souche SRC3 sur trois milieux de culture de compositions différentes, a permis la sélection du milieu Czapeck comme meilleur milieu de production utilisé pour l'étude de l'optimisation de la production de molécules bioactives. Le plan de Plackett et Burman suivi du plan factoriel complet ont été utilisés afin d'optimiser la production de molécules bioactives par la souche SRC3 vis-à-vis de 3 germes cibles : SARM, *V. cholerae* et *C. albicans*. Les résultats obtenus montrent que les facteurs influençant l'activité antimicrobienne sont : le pH pour le SARM, le KCl pour *V. cholerae* et le KCl, MgSO<sub>4</sub> et le temps d'incubation pour *C. albicans*.

Les concentrations optimales des facteurs influençant ont été délimitées par le tracé des courbes isoréponses et leur valeurs sont les suivantes ; SARM : pH 9.58, *V. cholerae* : KCl 0.53 g/L, et *C. albicans* : KCl 0.51 : g/L, MgSO<sub>4</sub> : 0.50 g/L et le temps d'incubation : 5.56 jours.

**Mots-clés :** *Streptomyces*, plan Plackett-Burman, Activité antimicrobienne, Molécules bioactives, Optimisation, Plan d'expérience.

## Abstract

The analysis of 3 river sediments samples, from Ziama region (Jijel), using three different culture media, allowed the isolation of 39 actinomycetes strains. Their antagonistic activity was determined against *E. coli*, MRSA and *C. albicans* pathogenic germs, allowing the selection of the most bioactive strain: SRC3.

Morphological study of the isolate allowed to link the strain to *Streptomyces* genus, and the name *Streptomyces* sp.SRC3 was attributed. Moreover, the physiological study demonstrated its ability to reduce different heavy metals at 50 mg/L such as cadmium, chrome, iron and copper. The antimicrobial activity test of the strain SRC3, using three different culture media, allowed the selection of Czapeck as the best production medium used for the enhancement of the bioactive compounds production.

Plackett-Burman design and factorial design were used in order to improve the antibiotic production against 3 pathogenic germs: MRSA, *V. cholerae* and *C. albicans*. The optimal concentrations of the influencing factors were determined by the layout of isoresponse curves, giving the following values: MRSA: pH 9.58, *V. cholerae*: KCl 0.53 g/L, and *C. albicans*: KCl 0.51: g /L, MgSO<sub>4</sub> 0.50 g /L and the incubation time: 5.56 days.

**Keywords:** *Streptomyces*, Plackett-Burman Design, antimicrobial activity, Bioactive compounds, Optimisation, Design of experiments.