

**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 : Sciences Biologique**  
**Spécialité : Biotechnologie Microbienne**

**Réf:.....**

## **MEMOIRE**

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

## **MASTER**

### ***Thème***

**Optimisation et modélisation de la production des  
molécules bioactives par une souche d'actinobactérie  
*Streptomyces sp. D2***

**Présenté par :**

**Melle ZIDANE Hanane & Melle MADDI Amina**

**Soutenu le : 21 Juin 2017**

**Devant le jury composé de :**

**Mme. BOUCHERBA Nawel**

**MCA**

**Présidente**

**Mr. KECHA Mouloud**

**Professeur**

**Examineur**

**Melle. DJINNI Ibtissem**

**MCB**

**Encadreur**

**Mme. ARKOUB-DJOUDI Warda**

**MCB**

**Co-encadreur**

**Année universitaire : 2016 / 2017**

# Dédicaces

*Ce modeste travail, achevé avec l'aide du BON DIEU le tout puissant, est dédié à tous ceux que j'aime ;*

*A la mémoire de mon défunt père, que dieu l'accueille en son vaste paradis.*

*A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ;  
maman que j'adore. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et  
ma formation, que Dieu te protège et te prête tout une longue et heureuse vie.*

*A mes chers frères, A ma belle SCEUR Qui m'ont soutenu avec leurs encouragements et leurs aides,  
auxquels je souhaite beaucoup de réussite et tout le bonheur du monde.*

*A mes adorables neveux Mohamed et Abderrahmane que j'aime énormément.*

*A mes très chères grands-parents, que dieu les protèges.*

*A ma chère collègue Hanane, qui a partagé les moments de joie ainsi que les moments de peine tout au  
long de nos études.*

*A toute ma famille et toutes mes amies*

*Tous ce qui ont contribués de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

*Amina*

# Dédicaces

*Tout d'abord je remercie ALLAH le tout puissant qui m'a permit de suivre mes études et m'a muni de volonté, force et patience afin de réaliser ce modeste travail. J'ai le plaisir de dédier ce mémoire:*

*A mon très cher père, mon exemple dans cette vie, qui m'a toujours encouragé, et qui a été toujours présent pour moi et qui m'a soutenu en toutes circonstances, à qui je dois toutes mes réussites et tous mes succès.*

*A ma mère, la femme la plus chère au monde, honorable, aimable, généreuse, la plus belle à mes yeux, celle qui a su me donner l'amour et joie de vivre, à celle qui m'as toujours montré affection, et qui m'a toujours encouragé durant mes études. Que dieu vous bénisse, vous protège et vous donne une longue vie.*

*A mes très chers sœurs et frères surtout ma petite sœur Fatty, qu'ils m'ont soutenu sur tout les plans à qui je souhaite beaucoup de réussite et tout le bonheur du monde.*

*A mes oncles et tantes, mes cousines et cousins paternels et maternels. A toute ma famille et à toutes mes chères amies.*

*A la mémoire de mes grands-parents maternels et paternels que j'aimerai à tous jamais pour leur amour, que dieu les accueille en son vaste paradis.*

*A ma chère amie et collègue Amina qui a partagé les moments de joie ainsi que les moments de peine tout au long de nos études et tout au long de ce travail.*

*A l'ensemble des professeurs qui m'ont suivi durant mes années d'études, du primaire jusqu'à l'université témoignage de ma reconnaissance aux efforts qu'ils ont consentis en ma faveur.*

*Hanane*

## **Remerciements**

*Au terme de la réalisation de ce mémoire nous tenons en premier lieu à exprimer nos profonds et sincères remerciements :*

*Au bon Dieu de nous avoir donné la force et le courage de mener à terme ce travail et d'aller au bout de nos objectifs.*

*Nous tenons à présenter toute notre gratitude :*

*A notre enseignante et présidente M<sup>me</sup> Boucherba Nawel de nous avoir fait l'honneur et un immense plaisir de présider le jury de notre soutenance.*

*A notre enseignant et examinateur M<sup>r</sup> Kecha Mouloud pour avoir accepté d'évaluer notre mémoire.*

*Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et nos vifs remerciement à :*

*Notre promotrice M<sup>elle</sup> DJINNI Ibtissem qui a accepter la responsabilité de superviser ce travail, pour son aide, ses conseils, sa disponibilité, ces précieux encouragements, sa patience et sa confiance. Sans elle notre travail et nos efforts n'aurai jamais pu se concrétiser et surtout n'aurai jamais eu la place qu'il lui revenait de droit et n'aurait pas vu le jour.*

*On tiens à exprimer notre grande considération et notre vive reconnaissance à notre Co-promotrice Mme ARKOUB Warda qui nous a permis de réaliser une partie de ce travail, pour son soutien, son aide, ces conseils et sa sympathie et surtout pour sa présence en ce jour important pour nous deux.*

*On tien aussi à remercier les techniciens et techniciennes des laboratoires que nous avons sollicités et qui ont répondu présents.*

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

Introduction .....	1
--------------------	---

<b>Chapitre I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b>
--

I. Généralités sur les actinobactéries.....	2
I.1. Ecologie et distribution des actinobactéries .....	3
I.2. Les actinobactéries halophiles et halotolérants.....	4
II. Antibiotiques et actinobactéries producteurs .....	5
II.1. Aperçu sur l’historique des antibiotiques.....	5
II.2. Les antibiotiques produits par les actinobactéries .....	5
III. <i>Streptomyces</i> et les genres apparentés .....	6
IV. Effet des paramètres culturels sur la production d’antibiotiques .....	7
IV.1. Influence des sources de carbone et d’azote.....	7
IV.2. Influence des sels minéraux .....	8
IV.3. Le pH .....	8
IV.4. La température .....	8
IV.5. Agitation et aération.....	8
V. Modélisation statistique .....	9
V.1. Plan de Plackett et Burman .....	9
V.2. Plan Composite centré.....	9

<b>Chapitre II : MATERIEL ET METHODES</b>
---

I. Matériel .....	11
I.1. Matériel analytique .....	11
I.2. Matériel biologique.....	11
I.2.1. Souche d’actinobactérie étudiée.....	11
I.2.2. Germe cible utilisés .....	11

II. Méthodes .....	12
II.1. Etude morphologique de la souche D2.....	12
II.1.1. Caractères macromorphologiques.....	12
II.1.2. Caractères micro morphologiques .....	12
II.2. Mise en évidence de l'activité antagoniste.....	12
II.2.1. Ensemencement et préparation de l'extrait brut .....	12
II. 2.2. Standardisation de l'inoculum des germes cibles .....	13
II.2.3. Evaluation de l'activité antagoniste .....	13
II.3. Etude de la cinétique de croissance de la souche D2 .....	14
II.3.1. Préparation de l'inoculum.....	14
II.3.2. Mesure du poids sec .....	14
II.3.3. Mesure du pH.....	14
II.4. Etude de la cinétique de production de la souche D2.....	14
II.5. Sélection des paramètres influençant la production de molécules antibiotiques par le plan de Plackett et Burman .....	15
II.6. Modélisation et optimisation par la méthodologie de surface de réponses (RSM) .....	16

### **Chapitre III : RESULTATS ET DISCUSSIONS**

I. Etude morphologique de la souche D2.....	19
I. 1. Caractères macromorphologiques .....	19
I.2. Caractères micromorphologiques .....	20
II. Mise en évidence de l'activité antagoniste .....	21
III. Etude de la cinétique de croissance de la souche D2.....	22
III.1. Mesure du poids sec .....	22
III.2. Mesure du pH.....	23
IV. Etude de la cinétique de production de la souche D2.....	24

V. Sélection des paramètres influençant la production d'antibiotiques par le plan de Plackett et Burman .....	25
VI. Modélisation de l'activité antibactérienne de la souche D2 à l'égard de <i>L.innocua</i> .....	27
VI.1. Elaboration du modèle du premier degré.....	27
VI.1.1. Calcul des coefficients du modèle du premier degré.....	28
VI.1.2. Analyse statistique de l'équation de régression.....	28
VI.2. Elaboration du modèle du second degré.....	30
VI.2.1 Calcul des coefficients du modèle.....	31
VI.2.2. Analyse statistique de l'équation de régression .....	32
VII. Optimisation.....	34
VII.1. Recherche de l'optimum.....	34
VII.2. Tracé des courbes iso réponses et des surfaces de réponses .....	35
Conclusion.....	40
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Annexes</b>	
<b>Résumé</b>	
<b>Abstract</b>	

<b>Tableau N°</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>I</b>	Classification des microorganismes en fonction de leur comportement en présence de NaCl	<b>4</b>
<b>II</b>	Quelques exemples de molécules antibiotiques et microorganismes producteurs	<b>6</b>
<b>III</b>	Valeurs extrêmes des paramètres opératoires étudiés	<b>15</b>
<b>IV</b>	Matrice des expériences du plan de Plackett et Burman	<b>16</b>
<b>V</b>	Valeurs extrêmes des paramètres opératoires étudiés à l'égard de <i>L. innocua</i>	<b>17</b>
<b>VI</b>	Matrice d'expériences du plan composite centré pour k=3 (trois facteurs)	<b>17</b>
<b>VII</b>	Moyenne des zones d'inhibition obtenues par le plan de Plackett et Burman sur les 12 milieux de cultures à l'égard de <i>Listeria innocua</i>	<b>26</b>
<b>VIII</b>	Matrice des expériences pour k=3 et N=8 ( $2^k$ )	<b>27</b>
<b>IX</b>	Valeurs des diamètres des zones d'inhibition au centre du domaine d'étude	<b>28</b>
<b>X</b>	Valeurs des coefficients de l'équation de régression	<b>28</b>
<b>XI</b>	Valeurs de $t_j$	<b>29</b>
<b>XII</b>	Résultats du plan en étoile ( $N_a = 2.k = 6$ )	<b>31</b>
<b>XIII</b>	Valeurs des coefficients du modèle de second degré	<b>32</b>
<b>XIV</b>	Valeurs de $t_j$	<b>32</b>

N° De Figure	Titre	Page
1	Photographies au microscope électronique à balayage illustrant les chaînes de spores des genres <i>Micromonospora</i> (A) et <i>Streptomyces</i> (B)	2
2	Cycle de développement du genre <i>Streptomyces</i>	7
3	Plan composite pour l'étude de deux facteurs (k=2)	10
4	Site de collecte de l'échantillon de sol salin saharien dans région de Bechar	11
5	Mise en évidence de l'activité antagoniste de l'extrait de l'isolat D2 sur milieu Mueller Hinton par la méthode des puits	13
6	Mise en évidence de l'activité antagoniste de la souche D2 sur milieu Mueller Hinton par la méthode des cylindres d'agar	15
7	Aspect macromorphologique de la souche D2 cultivée sur milieu Gause après 21 jours d'incubation à 28°C. A : Aspect et couleur du mycélium aérien des colonies. B : Aspect et couleur du mycélium du substrat	19
8	Observation au microscope optique des mycéliums aériens et du substrat de la souche au objectif x10 (A) et au objectif x40 (B)	20
9	Activité antagoniste de l'isolat D2 ensemencée sur milieu Gause à l'égard des germes cibles	21
10	Photographies illustrant l'activité antagoniste de l'isolat D2 à l'égard de (A) <i>P.aeruginosa</i> (B) <i>V.cholerae</i>	22
11	Variation du poids sec de la souche D2 cultivée sur milieu Gause en fonction de la période d'incubation	23
12	Variation de la valeur du pH initial du milieu de culture en fonction de la période d'incubation	23
13	Cinétique de production de la souche D2 vis-à-vis de <i>L. innocua</i> sur le milieu Gause	24
14	Charte de Pareto montrant l'effet des six facteurs étudiés sur la production de métabolites antibactériens	26
15	Courbes iso réponses (a) et (b) et surface de réponse (c) pour : $x_3=0$	36
16	Courbes iso réponses (a) et (b), pour : $x_3=-1$	37

<b>17</b>	Courbes iso réponses (a) et (b), pour : $x_3=+1$	<b>37</b>
-----------	--	-----------

**ATTC** : American Type Culture Collection

**CLIP** : Centre Listeria, Institut Pasteur

**G+C%** : Pourcentage Guanine + Cytosine

**K** : Nombre de facteur opératoire

**MA** : Mycélium aérien

**MS** : Mycélium du substrat

**N** : Nombre des essais

**N<sub>0</sub>** : Points au centre

**N<sub>f</sub>** : Essais d'un plan factoriel

**N<sub>α</sub>** : Points en étoile

**P<sub>0</sub>** : Poids du mycélium humide

**P<sub>1</sub>** : Poids du mycélium après séchage

**PB** : Plackett et Burman

**Rox** : Résistante à l'oxacilline

**UFC/mL** : Unité Formant Colonie par Millilitre

**X<sub>i</sub>** : Niveau du facteur i

**Y** : La réponse

# ***Introduction***

En médecine moderne, les antibiotiques sont le support de la défense et de la prévention contre les infections bactériennes (Mathur et Singh, 2005). Cependant, le monde bactérien s'est adapté à ces molécules et cela s'est traduit par l'émergence de souches résistantes ou multiresistantes chez l'homme, les animaux et dans l'environnement (Guillot, 1989).

L'existence de ces agents pathogènes résistants aux antibiotiques n'est pas un phénomène récent puisqu'il a été évoqué par Alexander Fleming en 1945 lors de son obtention du prix Nobel pour sa découverte de la pénicilline, et a mis en garde de l'utilisation abusive de ces molécules (Rosenblatt - Farrell, 2009). En effet, la résistance aux antibiotiques a atteint des niveaux dangereusement élevés dans toutes les régions du monde (OMS, 2016).

Ces dernières années, le taux de découverte de nouvelles molécules a considérablement diminué, par conséquent de nombreuses approches visant à mettre en évidence de nouvelles substances actives efficaces ont vu leur apparition notamment, le criblage de nouvelles souches d'actinobactéries isolées à partir d'environnements particuliers peu étudiés tels que les sols sahariens, les sédiments et invertébrés marins...etc.

L'ordre des *Actinomycetales* est largement connu pour renfermer des genres producteurs de molécules actives entre autres les antibiotiques. Toutefois, ces derniers sont produits à des taux relativement faibles rendant leur étude et leur manipulation difficiles, d'où la nécessité d'optimiser les conditions de cultures afin d'améliorer et augmenter le rendement de production.

Différentes approches sont utilisées à cet effet telles que la méthode du "One Factor At Time" (OFAT) qui est considérée comme étant une approche longue et laborieuse, et la méthode statistique avec ces différentes variantes et modèles, Taguchi, Box Behnken, Plackett-Burman, plan composite centré...etc. Par ailleurs, l'optimisation des conditions de croissance de l'organisme et de production est une étape très importante amenant à une production maximale des molécules d'intérêt.

L'objectif principal de cette étude s'inscrit dans cette optique et qui s'organise autour de trois parties : la première fait état des connaissances générales sur les actinobactéries et un aperçu de leur capacité à produire des molécules bioactives ainsi que des notions fondamentales relatives à la modélisation statistique par les plans d'expériences.

La deuxième partie de ce mémoire expose l'ensemble des méthodes expérimentales mises en œuvre dans l'étude des caractères morphologiques et antagonistes, des cinétiques

de production et de croissance de la souche d'actinobactérie étudiée, ainsi que mise en évidence des paramètres influençant la production d'antibiotiques par le plan de Plackett et Burman et enfin la modélisation et l'optimisation de l'activité antibactérienne par la méthodologie de surface de réponse.

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

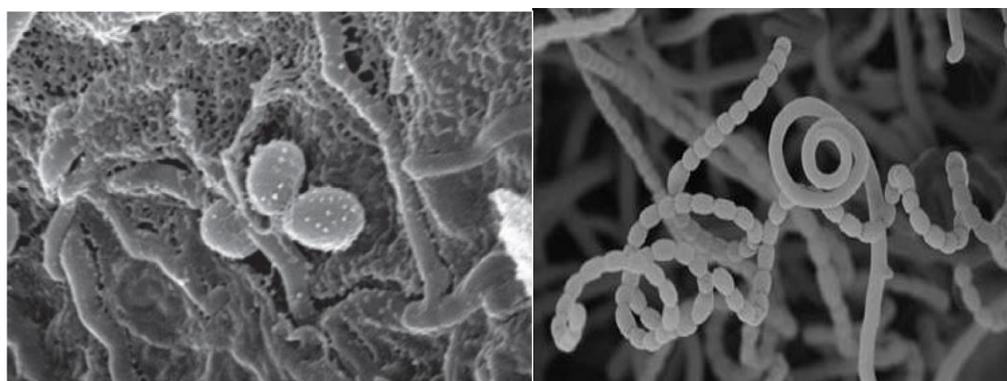
On termine par une conclusion qui résume l'ensemble des résultats obtenues de cette étude.

# ***Chapitre I Synthèse bibliographique***

## I. Généralités sur les actinobactéries

Les actinobactéries, parmi les microorganismes présentant un intérêt biotechnologique en particulier pour la production de molécules bioactives (Sabaou et al., 1998), sont un groupe diversifié de bactéries filamenteuses, septées, ramifiées, Gram positif, organotrophes, hétérotrophe, aérobies stricts et micro-aérophiles. Leur coefficient de Chargaff (G+C%) est supérieur à 55%, généralement compris entre 60 et 75% (Larpent et sanglier, 1989).

Appelées autrefois actinomycètes, terme utilisé pour la première fois par Bollinger en 1877, emprunté du grec « aktis » et « mykes » pour « champignons à rayons », explique que ces microorganismes ont d'abord été considérés comme des champignons en raison de leur capacité à former un véritable mycélium ramifié (Gottlieb et al., 1973). On rencontre des espèces dont le mycélium est rudimentaire au point d'être inexistant (la plupart des *Mycobacterium*), d'autres forment un mycélium du substrat bien développé et ramifié mais n'ont pas de mycélium aérien (*Micromonospora*) (Figure 1A) (Supong et al., 2013), et enfin des espèces organisées en mycélium végétatif et/ou en mycélium aérien comme ci-dessous pour le genre, *Streptomyces* (Figure 1B) (Belyagoubi, 2014).



*Micromonospora* (A)

*Streptomyces* (B)

**Figure 1 :** Photographies au microscope électronique à balayage illustrant les chaînes de spores des genres *Micromonospora* (A) (Supong et al., 2013) et *Streptomyces* (B) (Belyagoubi, 2014).

En culture solides, les actinobactéries forment en une semaine environ des colonies souvent pigmentées (gris, vert, rouge...) provenant de l'accumulation d'hyphes ramifiés à contours lisses ou échancrés à aspect compact, poudreux ou en chou-fleur (Kitouni, 2007).

Les actinobactéries sont capables de métaboliser plusieurs et différentes sources de carbone et d'énergie et à croître dans des conditions très variées. Elles peuvent se développer dans des habitats très différents, et jouent un rôle important dans la fertilisation des sols.

La taxonomie des actinobactéries est basée sur plusieurs critères : morphologiques, chimiques, physiologiques et moléculaires. Avec les récentes éditions du manuel de taxonomie bactérienne, plusieurs formes bactériennes non mycéliennes sont affiliées aux actinobactéries sur la base de leurs parentés phylogénétiques. Avec la version 2012 du manuel de la systématique bactérienne, les actinobactéries sont rattachées au phylum *Actinobacteria* qui comprend 6 classes, 15 ordres, 43 familles et 203 genres (Goodfellow et al., 2014).

### **I.1. Ecologie et distribution des actinobactéries**

Les actinobactéries sont des microorganismes ubiquitaires, la grande majorité est d'origine tellurique (Larpen et Sanglier, 1989). Ces dernières occupent une place prépondérante, ils constituent un groupe que l'on trouve dans divers niches écologiques, y compris les plus extrêmes : sols (cultivés, glaciers, des déserts chauds, des régions polluées par du pétrole et des métaux lourds...), eau (rivières, lacs alcalins, mers et océans...) air, fumiers et composts, débris de végétaux et litières...etc (Goodfellow et Williams, 1983 ; Lechevalier, 1988).

La majorité des actinobactéries est saprophytes mais quelques-unes peuvent être pathogènes ou symbiotes de plantes ou d'animaux, elles sont plus nombreuses que les champignons et moins abondantes que les bactéries, préfèrent un pH neutre ou peu alcalin. Elles sont généralement mésophiles d'autre sont thermophiles tolérants des températures avoisinant 50°C et peuvent aller jusqu'à 60°C (Goodfellow et Williams, 1983). Elles sont retrouvées en surface jusqu'à deux mètres de profondeur, la zone optimale étant comprise entre 2 et 15 centimètres (Breton et al., 1989). Préférant un taux d'humidité peu élevé de l'ordre de 5 à 25 % (Hagedorn, 1976).

Par ailleurs, ces microorganismes produisent de la geosmine et du MIB (2-méthyl - isobornéol) contribuant ainsi à l'odeur caractéristique du sol. Beaucoup sont capables de sporuler ce qui leur permet de survivre aux conditions défavorables telles que la salinité (Zaitlin et Watson, 2006), qui joue un rôle important dans leur distribution.

L'exploration des sols sahariens d'Algérie a montré leur richesse et leur biodiversité en actinobactéries, des plus fréquents comme *Streptomyces*, aux plus rares tels

que *Actinomadura*, *Catellatospora*, *Herbidospora*, *Nocardiopsis*, *Nonomuraea*, etc... (Boudjella, 1994 ; Sabaou et al., 1998).

## I.2. Les actinobactéries halophiles et halotolérants

Les microorganismes halophiles et halotolérants sont capables de prospérer et de croître dans des environnements salins et hyper-salins (Das et al., 2011). En effet, les microorganismes nécessitant du sel pour la croissance sont appelés halophiles tandis que les halotolérants sont capables de se développer en absence aussi bien qu'en présence de sel (Margesin et Schinner, 2001).

La première souche d'actinobactérie halophile extrême a été isolée par Gochner en 1975 à partir d'une contamination d'un milieu de culture contenant 25% de NaCl. L'espèce a été identifiée comme *Actinopolyspora halophila* (Zhi et al., 2007).

En 1978, Kushner a défini 5 catégories de bactéries halophiles selon la concentration en sels qui amène à une croissance optimale des microorganismes (Tableau I).

**Tableau I :** Classification des microorganismes en fonction de leur comportement en présence de NaCl (Kushner, 1978).

Groupe	Concentration de NaCl	Exemples*
Non halophiles	<0,2 M	La plupart des Eubactéries
Faiblement halophiles	0,2 à 0,5 M	Les actinomycètes d'origine marine : <i>Nocardiopsis</i> ; <i>Saccharomonospora marina</i> .
Halophiles modérés	0,5 à 2,5 M	<i>Nocardiopsis kunsanensis</i> <i>Streptomyces rochei</i> MTCCC10109. <i>Actinopolyspora alba</i> , <i>Actinopolyspora erythraea</i>
Halophiles extrêmes	2,5 à 5,2M	<i>Halobacterium salinarium</i> ; <i>Halococcus morrhuae</i> .
Halotolérants	0 à 2,5 M	<i>Nocardiopsis halotolerans</i> ; <i>N. nikkonnensis</i> ; etc. <i>Streptomyces albus</i> .

## II. Antibiotiques et actinobactéries productrices

Les actinobactéries sont connues pour leur grande capacité à produire des antibiotiques qui sont des métabolites secondaires généralement synthétisés à la fin de la phase exponentielle (trophophase) et au début de la phase stationnaire (idiophase) (Valan arasu et al., 2008 ; Bu'lock, 1965).

### II.1. Aperçu sur l'histoire des antibiotiques

Ce fut en 1889 que Vuillemin introduit le terme antibiose, du grec anti : « contre » et bios : « la vie », pour désigner les phénomènes d'antagonisme entre les microorganismes vivants (L'arpen et Sanglier, 1989 ; Klein, 2012). En 1897, Ernest Duchesne fut le premier à observer l'effet antagoniste des moisissures sur les microorganismes et envisagea des possibilités thérapeutiques, mais il faudra attendre 30 ans après, suite à la découverte de la pénicilline par Alexander Fleming en 1928, élaborée par une moisissure (*Penicillium notatum*), substance capable d'inhiber la croissance de *Staphylococcus aureus* (Notter, 1990 ; Meunier, 2015). Dans les années 1940, de nombreux antibiotiques secrétés par des actinobactéries ont été isolés par Selman Waksman tels que l'actinomycine (1940), la streptomycine (1943), la néomycine (1948) ...etc (De Lima Procopio et al., 2012). Grâce à ces molécules, Il a été possible de traiter la plupart des maladies infectieuses qui avaient ravagé le XIX<sup>e</sup> siècle (Klein, 2012).

### II.2. Les antibiotiques produits par les actinobactéries

Les actinobactéries représentent actuellement le groupe le plus producteurs de composés bioactifs tels que les antibactériens, les antifongiques, les antiviraux mais aussi les antiparasitaires, les antis tumoraux et les enzymes (Solecka et al., 2012). En effet, plus de 90% des antibiotiques utilisés proviennent de ces bactéries qui produisent environ deux tiers de tous les composés bioactifs isolés (Brédy, 2005).

Par ailleurs, 75% des antibiotiques commercialisés sont produits par le genre *Streptomyces* (Sujatha et al., 2005), comme la vancomycine qui fut isolée à partir de l'espèce *Streptomyces orientalis*, la streptomycine à partir de *S. griseus*, la kanamycine à partir de *S. kanamyceticus* et la thioestreptone à partir de *S. azureus*. Les espèces du genre *Nocardia* comme *N. lurida* et *N. mediterranei* produisent respectivement la ristocetine et la rifamycine et la teicoplanine produite par *Actinoplanes teichomyceticus* (Tableau II) (Aboul-Enein et Ali, 2000). La recherche de nouvelles molécules antibiotiques plus efficaces reste toujours un enjeu d'une importance capitale (Belyagoubi, 2014).

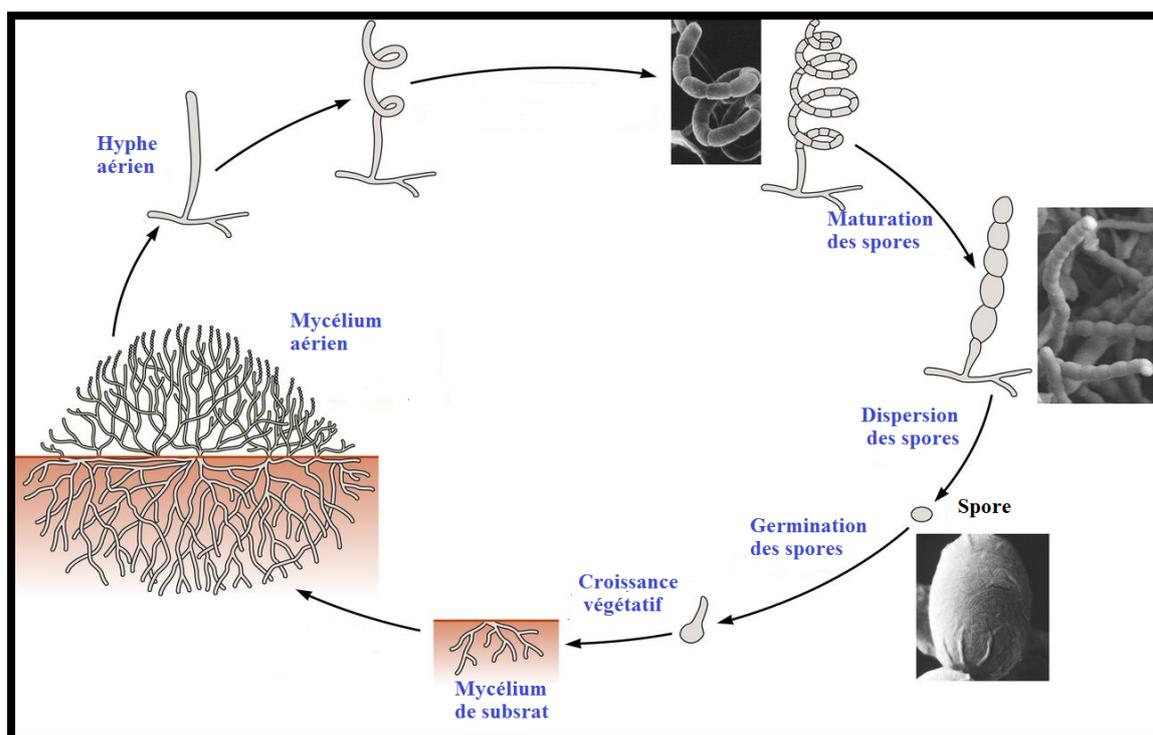
**Tableau II** : Quelques exemples de molécules antibiotiques et microorganismes producteurs (Aboul-Enein et Ali, 2000)

Microorganismes producteurs	Antibiotiques
<i>Streptomyces orientalis</i>	Vancomycine
<i>Streptomyces azureus</i>	Thiostreptone
<i>Actinoplanes teichomyceticus</i>	Teicoplanine
<i>Nocardia lurida</i>	Ristocetine
<i>Nocardia mediterranei</i>	Rifamycine
<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Kanamycine
<i>Streptomyces griseus</i>	Streptomycine

### III. *Streptomyces* et les genres apparentés

Le genre *Streptomyces* appartient à l'ordre des *Actinomycetales*, groupe des Streptomycètes. Ce sont des bactéries avec un taux de G+C élevé (69 à 78%) qui prédomine très largement au sein des souches isolées avec 533 espèces (Goodfellow et al., 2012) même si le genre *Nocardia* et *Micromonospora* sont relativement abondants (Lechevalier et Lechevalier, 1967 ; Sabaou et al., 1998).

C'est le genre le mieux étudié en terme de cycle de vie. En effet Sur un milieu solide, débute la germination des spores formant des hyphes non septés et plurinuclés, ramifiés et ancrés dans le milieu appelé mycélium primaire ou de substrat. Sur ce mycélium primaire se développera ensuite un mycélium aérien ou secondaire. Les extrémités des hyphes aériens se cloisonnent et se différencient pour former les chaînes de spores qui sont des agents de dissémination (Hodgson, 1992), comme le montre la figure 2 ci-dessous. Le mycélium de substrat et les spores peuvent être pigmentés mais peuvent produire également des pigments diffusibles (Williams et al., 1989). En milieu liquide, les cellules se développent uniquement sous forme de mycélium primaire même si certains *Streptomycètes* peuvent sporuler dans cet environnement (Hodgson, 1992).



**Figure 2** : Cycle de développement du genre *Streptomyces* (Hopwood et al., 1985)

#### IV. Effet des paramètres cultureux sur la production d'antibiotiques

L'influence des besoins nutritionnels, tel que les sources de carbone et d'azote, les sels minéraux et les conditions de culture (pH, température, aération et agitation) sur la biosynthèse des métabolites secondaires, diffère en fonction des souches, par conséquent ils affecteraient la production et le rendement en molécules bioactives (Wang et al., 2008).

##### IV.1. Influence des sources de carbone et d'azote

Les sources de carbone telles que l'amidon, les dextrans, le glucose, le saccharose, et le maltose sont utilisées comme substrat de croissance, influençant la production d'antibiotiques (Sanchez et Demain, 2002). En effet, la production de métabolites secondaires s'avère souvent meilleure sur une source de carbone complexe, plus difficilement métabolisable comme les polysaccharides (amidon, dextrans) que sur une source de carbone rapidement assimilable telle que le glucose ou le glycérol (Spizic et Tichy, 1995).

En effet, chez de nombreux microorganismes, le glucose provoque une répression de la formation de plusieurs antibiotiques amino-glycosidiques produits par les actinobactéries

(streptomycine, kanamycine, istamycine et néomycine) par une répression des enzymes de biosynthèse (Demain, 1989 ; Piepersberg et Distler, 1997).

Dans les milieux de culture, la source d'azote utilisée est généralement l'ammonium ou des composés organiques comme les acides aminés ; de même que pour la source de carbone, la biosynthèse de la plupart des métabolites secondaires peut être réprimée par les sources d'azote rapidement assimilables comme l'ammonium (Aharonowitz, 1980 ; Piret et Demain, 1988). D'autres auteurs ont montré que l'addition d'ammonium au milieu de culture a un effet positif sur la production d'antibiotiques (Narayana et Vijayalakshmi., 2008), mais les acides aminés et les sources complexes d'azote restent les sources les plus favorables à la production de ces métabolites.

#### **IV.2. Influence des sels minéraux**

La synthèse de métabolites secondaires nécessite de faibles concentrations en oligoéléments (Zn, Fe, Co, Ni, Cu, Mo). En effet, le fer et le manganèse comptent parmi les oligoéléments qui jouent un rôle important dans la production d'antibiotiques. De plus, l'addition du  $K_2HPO_4$  au milieu de culture permet d'augmenter la production de ces biomolécules par les souches de *Streptomyces* alors que le  $KH_2PO_4$  a un effet négatif sur le rendement, tandis que le sulfate de magnésium stimule plutôt leur fonction (Hassan et al., 2001).

#### **IV.3. Le pH**

Le changement de la valeur du pH du milieu de culture induit la production de molécules qui peuvent nuire à la production d'antibiotiques. En effet il est bien connu que chaque espèce microbienne possède un pH optimal, minimal et maximal à partir duquel elle croit. L'étude de Vijayakumar et al. (2012) a révélé que le pH optimal pour la production de composés antimicrobiens est compris entre 7 et 8.

#### **IV.4. La température**

La température a un effet certain sur la physiologie, la morphologie, la biochimie et la production des métabolites par les microorganismes. De plus, il a été montré que les actinobactéries possèdent une gamme assez large de température de croissance mais la température optimale de production de métabolites bioactifs est de 30°C (Bundale, 2015).

#### **IV.5. Agitation et aération**

L'agitation affecte l'aération ainsi le mélange des éléments nutritifs dans le milieu de fermentation et par conséquent la production de métabolites secondaires. Pfefferle et al. (2000) ont étudié l'influence de la vitesse et du mode d'agitation et de l'aération sur la

production de métabolites secondaires et les meilleurs résultats ont été obtenus avec une agitation de type « turbine-hélice ».

## V. Modélisation statistique

### V.1. Plan de Plackett et Burman

Les plans de Plackett et Burman sont une application particulière des matrices d'Hadamard, matrices carrées orthogonales composées uniquement des valeurs +1 ou -1 (valeur maximal et minimal). Ce sont des plans à deux niveaux, employés pour le criblage afin de démarrer l'optimisation d'une étude donnée par la recherche d'un grand nombre de facteurs  $X_i$  qui influencent sur la réponse  $Y$ . En d'autre terme, c'est l'identification des facteurs les plus influents parmi plusieurs avec peu d'essais (Lewis et al., 1999 ; Goupy, 2005 ; Fadil et al., 2014). Les plans de Plackett et Burman ne permettent pas d'étudier les interactions entre les facteurs (Levin et al., 2005).

### V.2. Plan Composite centré

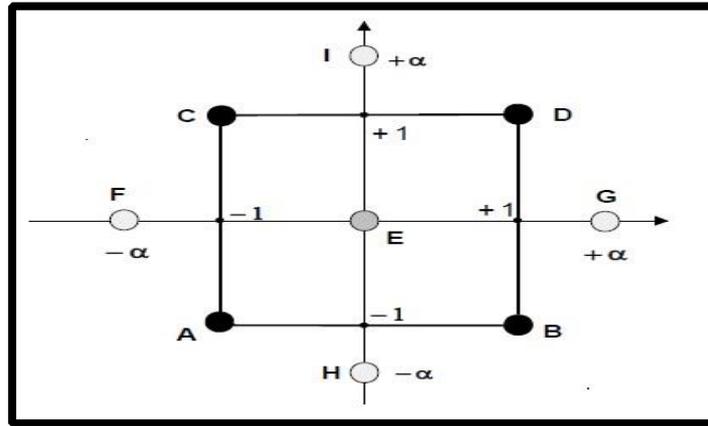
Les plans composites centrés, proposés par Box et Wilson en 1951, s'avèrent particulièrement utiles dans les expériences séquentielles (Goupy et Creighton, 2006). Le plan se compose généralement d'une conception factorielle complète  $2^k$  (Kuehl, 2000) qui consiste à réaliser les essais d'un plan factoriel, complété par des expériences au centre du domaine d'étude et des essais en étoile. La figure 3 présente un plan composite pour deux facteurs. Les points A, B, C et D sont les points expérimentaux du plan factoriel à deux facteurs ( $k=2$ ) Le point E est le point central. Ce point peut être répété une ou plusieurs fois. Les points axiaux F, G, H et I forment ce que l'on appelle le plan en étoile (Goupy, 2006)

Le nombre  $N$ , des essais d'un plan composite est donné par la relation suivante (keharom et al., 2016).

$$N = N_f + N_0 + N_\alpha$$

Avec :

- $N_f$  essais d'un plan factoriel ;
- $N_0$  points au centre ;
- $N_\alpha$  points en étoile.



**Figure 3** : Plan composite pour l'étude de deux facteurs (k=2) (Goupy, 2006)

Le modèle mathématique postulé utilisé avec les plans composites est un modèle du second degré avec interactions (Shivakumar et al., 2008). Ainsi pour deux facteurs (k=2), l'équation de régression s'écrit :

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + \varepsilon$$

# ***Chapitre II***

## ***Matériel et Méthodes***

## I. Matériel

### I.1. Matériel analytique

Le matériel utilisé dans cette étude est résumé en annexe I.

### I.2. Matériel biologique

#### I.2.1. Souche d'actinobactérie étudiée

L'isolat d'actinobactérie noté D2 utilisé dans cette étude appartient à la collection du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA) de l'Université A. Mira de Bejaia.

La souche a été isolée par Dr Djinni Ibtissem à partir d'un échantillon de sol salin prélevé dans la région de Béchar (Figure 4). Suite à un criblage préliminaire basé sur la détermination de l'effet antagoniste vis-à-vis de microorganismes cibles, bactérien et fongique, cet isolat a été sélectionné et retenu pour la présente étude.



**Figure 4 :** Site de collecte de l'échantillon de sol salin saharien dans la région de Bechar.

#### I.2.2. Germes cibles utilisés

Les germes cibles utilisés dans cette étude sont présentés ci-dessous

Bactérie à Gram positif :

- ✓ *Listeria innocua* : CLIP 74925

Bactéries à Gram négatif :

- ✓ *Pseudomonas aeruginosa* : ATCC27853
- ✓ *Acinetobacter baumannii* Rox (résistante à l'oxacilline).
- ✓ *Vibrio cholerae* : ATCC10231

Levure :

✓ *Candida albicans* : ATCC10231

## II. Méthodes

### II.1. Etude morphologique de la souche D2

#### II.1.1. Caractères macromorphologiques

Cette étude vise à apprécier la croissance, le développement et la couleur des mycéliums aérien (MA) et du substrat (MS) sur le milieu de culture utilisé. La présence ainsi que la couleur des pigments diffusibles sont également notés (Shirling et Gottlieb, 1966).

L'aspect phénotypique des colonies et les caractères cultureux sont étudiés sur le milieu synthétique Gausse après 14 jours d'incubation à 28°C.

La composition du milieu Gausse est donnée en annexe II.

#### II.1.2. Caractères micromorphologiques

La souche D<sub>2</sub> cultivée sur milieu Gausse a été observée à l'aide d'un microscope optique aux objectifs (x10 et x40). Ces observations sont réalisées directement sur les boîtes de Pétri et ce pour :

- Etudier les mycéliums aériens et du substrat en place sans en altérer les structures.
- Etudier la fragmentation ou non du mycélium du substrat.
- Observation de la formation des spores sur le MA et/ ou du substrat, leur forme et leur agencement (isolées, en chaînes) ainsi que la surface des spores (lisse, rugueuse, épineuse ou chevelure).
- L'étude de la présence et / ou de l'absence ainsi que l'abondance et la disposition des hyphes du (MS) ou du (MA) (Williams et al., 1989).

## II.2. Mise en évidence de l'activité antagoniste

### II.2.1. Ensemencement et préparation de l'extrait brut

La souche D2 est ensemencée en stries sérés à la surface du milieu Gausse agar afin de former un tapis. La boîte est mise à incuber à 28°C pendant 10 jours.

Après incubation, l'extraction de molécule active est réalisée par macération et cela en découpant le mycélium et la gélose en petits morceaux de 1 cm<sup>2</sup> puis additionnés de 100 mL d'acétate d'éthyle. Le mélange est mis à macérer sous agitation permanente durant toute une nuit à température ambiante. Le mélange est par la suite filtré, en utilisant du papier Whatman N°1, afin de séparer le solvant des blocs de gélose et du mycélium. L'extrait brut d'acétate d'éthyle ainsi obtenu est par la suite évaporé à sec grâce à un

Rotavapor. L'extrait sec obtenu est repris dans 4 mL de méthanol puis conservé à 4°C pour une utilisation ultérieure.

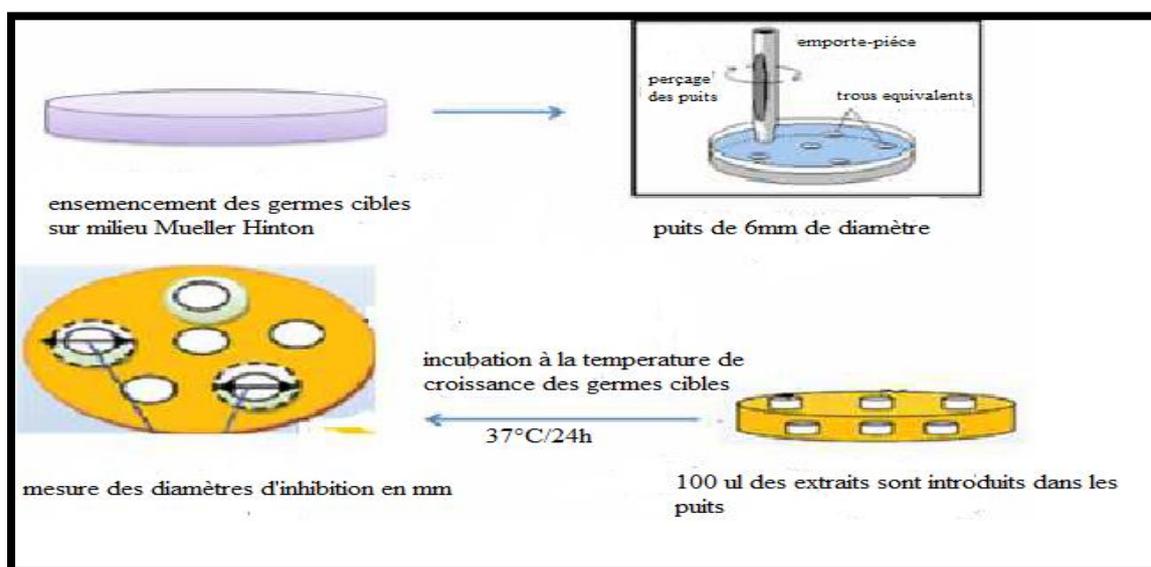
### II. 2.2. Standardisation de l'inoculum des germes cibles

La standardisation des germes cibles utilisés suit la méthode des suspensions diluées corrélées 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 qui correspond à une DO de 0.5 de la solution mère, la charge de l'inoculum utilisé est de 107 UFC/ mL (Billerbeck et al., 2002).

### II.2.3. Evaluation de l'activité antagoniste

Plusieurs germes cibles représentant différents types de microorganismes (bactéries à Gram positif, négatif et une levure) ont été utilisés lors de l'évaluation de l'activité antagoniste de la souche D2. Cette dernière a été mise en évidence par la technique des puits réalisée comme suit (Figure 5) :

A l'aide d'un emporte-pièce, des puits de 6mm de diamètre sont formés dans le milieu Mueller Hinton préalablement ensemencé par les germes cibles cités précédemment. Un volume de 100 µL d'extrait brut et de méthanol (témoin) sont déposés dans chaque puits. Les boîtes de Pétri sont maintenues à 4°C pendant 2 heures afin de permettre une bonne diffusion de (s) la substance(s) antibiotique(s) produite(s) puis incubées à 37°C/24h. Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés et exprimés en millimètre à l'aide d'un pied à coulisse.



**Figure 5** : Mise en évidence de l'activité antagoniste de l'extrait de l'isolat D2 sur milieu Mueller Hinton par la méthode des puits.

### II.3. Etude de la cinétique de croissance de la souche D2

L'appréciation de la croissance de la souche D2 en culture liquide est réalisée à travers l'estimation du poids sec et la valeur du pH pendant 12 jours.

#### II.3.1. Préparation de l'inoculum

La souche étudiée D2 est ensemencée en stries serrées sur milieu solide Gausse agar puis mise à incuber à 28°C pendant 10 jours. Après incubation, 5 cylindres d'agar sont découpés à l'aide d'un emporte-pièce et placés stérilement dans chacun des 5 flacons de 250 ml contenant 100 ml de milieu Gausse liquide. Les cultures ainsi préparées sont mises à incuber à 28°C sous agitation permanente de 120 tr/min.

#### II.3.2. Mesure du poids sec

Cette étude consiste à estimer la biomasse mycélienne après chaque 48h d'incubation pendant 12 jours. Ainsi le mycélium est séparé du milieu de culture par centrifugation à 5000 tr/min pendant 10 min. Le culot (biomasse humide) récupéré après chaque opération de centrifugation est pesé à l'état (mycélium humide  $P_0$ ), la pesée est refaite après séchage à 37°C/4 jours ( $P_1$ ). Ainsi, le poids sec de la biomasse mycélienne exprimé en mg de matière sèche est calculé comme suit :

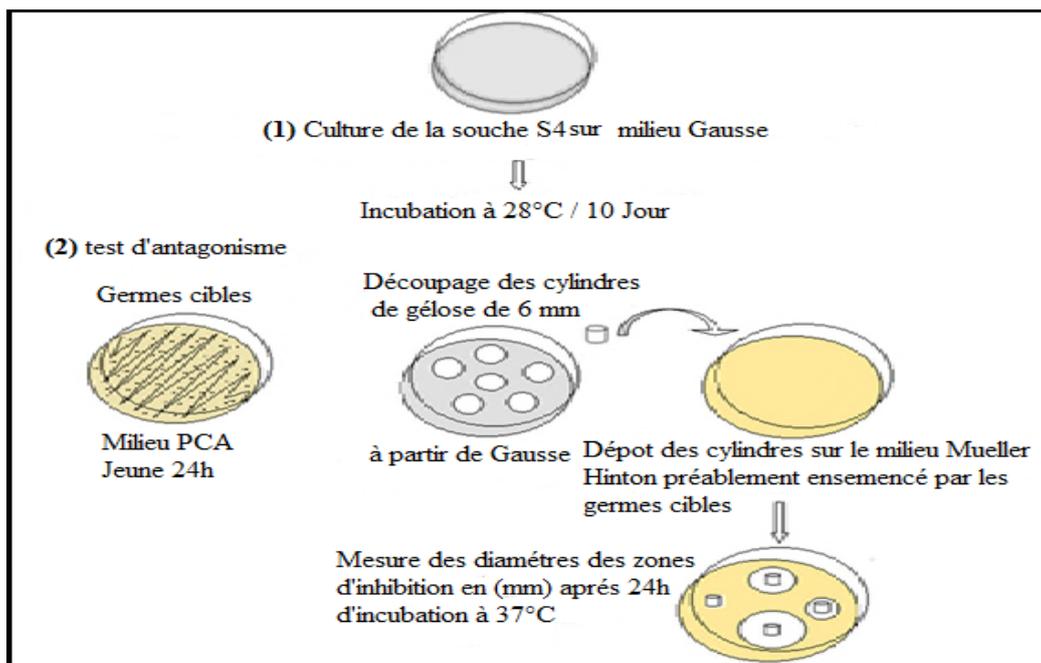
$$P \text{ (mg)} = P_0 - P_1$$

#### II.3.3. Mesure du pH

Après chaque centrifugation, le pH du surnageant obtenu est mesuré tout au long de la période de croissance afin d'enregistrer l'évolution et la variation du pH des cultures.

### II.4. Etude de la cinétique de production de la souche D2

L'étude de la cinétique de production de molécules bioactives par la souche D2 a été suivie pendant 12 jours afin de déterminer la période optimale de production. L'activité antibactérienne est déterminée par la méthode des cylindres d'agar sur milieu Mueller Hinton (Bastide et al., 1986) (Figure 6) à l'encontre de *Listeria innocua* qui a été choisie pour des raisons de sécurité, qui consiste à ensemencer l'isolat D2 en stries serrées sur le milieu Gausse solide et incuber pendant 12 jours à 28°C. Après chaque 48h des cylindres d'agar de 6mm de diamètres sont découpés stérilement à l'aide d'un emporte-pièce et déposés à la surface du milieu Mueller Hinton préalablement ensemencé par le germe cible à raison de  $10^7$  UFC/mL. Les boîtes sont maintenues à 4°C pendant 2 heures afin de permettre une bonne diffusion de la substance antibiotique produite puis incubées à 37°C/24h. Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse et exprimés en millimètre.



**Figure 6** : Mise en évidence de l'activité antagoniste de la souche D2 sur milieu Mueller Hinton par la méthode des cylindres d'agar (Bastide et al., 1986).

## II.5. Sélection des paramètres influençant la production de molécules antibiotiques par le plan de Plackett et Burman

Afin d'améliorer la production de molécules antibiotiques par la souche étudiée D2 sur milieu Gausse, des essais d'optimisation ont été réalisés, par l'étude de l'influence de six paramètres opératoires à savoir la concentration en amidon, en  $K_2HPO_4$ , en  $KNO_3$ , en  $MgSO_4 (7H_2O)$  le pH et le temps d'incubation. Les valeurs de ces facteurs sont regroupées dans le tableau III. A cet effet, un plan d'expériences de "Plackett et Burman (PB)" a été élaboré en utilisant un logiciel de modélisation "Minitab 16.0".

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

Paramètres opératoires	Niveau bas (-1)	Niveau au centre (0)	Niveau haut (+1)
Amidon (g/L)	13	20	27
$K_2HPO_4$ (g/L)	0.25	0.5	0.75
$KNO_3$ (g/L)	0.75	1	1.25
$MgSO_4 (7H_2O)$ (g/L)	0.25	0.5	0.75
pH	5.4	7.4	9.4
Temps d'incubation (jour)	5	7	9

Douze milieux de culture Gausse agar à des compositions variables ont été préparés selon la matrice des expériences élaborée par le logiciel " Minitab 16.0" et représentée dans le tableau IV.

L'isolat D2 est ensemencé sur chaque milieu et incubé à 28°C pendant 5 et 9 jours en fonction de l'expérience en question.

**Tableau IV** : Matrice des expériences du plan de Plackett et Burman

Nombre d'expériences	Z <sub>1</sub> (g/L)	Z <sub>2</sub> (g/L)	Z <sub>3</sub> (g/L)	Z <sub>4</sub> (g/L)	Z <sub>5</sub>	Z <sub>6</sub> (Jour)	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>
G <sub>01</sub>	27	0.25	1.25	0.25	5.4	5	+1	-1	+1	-1	-1	-1
G <sub>02</sub>	27	0.75	0.75	0.75	5.4	5	+1	+1	-1	+1	-1	-1
G <sub>03</sub>	13	0.75	1.25	0.25	9.4	5	-1	+1	+1	-1	+1	-1
G <sub>04</sub>	27	0.25	1.25	0.75	5.4	9	+1	-1	+1	+1	-1	+1
G <sub>05</sub>	27	0.75	0.75	0.75	9.4	5	+1	+1	-1	+1	+1	-1
G <sub>06</sub>	27	0.75	1.25	0.25	9.4	9	+1	+1	+1	-1	+1	+1
G <sub>07</sub>	13	0.75	1.25	0.75	5.4	9	-1	+1	+1	+1	-1	+1
G <sub>08</sub>	13	0.25	1.25	0.75	9.4	5	-1	-1	+1	+1	+1	-1
G <sub>09</sub>	13	0.25	0.75	0.75	9.4	9	-1	-1	-1	+1	+1	+1
G <sub>10</sub>	27	0.25	0.75	0.25	9.4	9	+1	-1	-1	-1	+1	+1
G <sub>11</sub>	13	0.75	0.75	0.25	5.4	9	-1	+1	-1	-1	-1	+1
G <sub>12</sub>	13	0.25	0.75	0.25	5.4	5	-1	-1	-1	-1	-1	-1

Note : Z<sub>1</sub> : Amidon (g/L), Z<sub>2</sub> : K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (g/L), Z<sub>3</sub> : KNO<sub>3</sub> (g/L), Z<sub>4</sub> : MgSO<sub>4</sub> (7H<sub>2</sub>O) (g/L), Z<sub>5</sub> : pH, Z<sub>6</sub> : Temps d'incubation (J), G : milieu Gausse

## II.6. Modélisation et optimisation par la méthodologie de surface de réponses (RSM)

Après avoir identifié et fixé les facteurs les plus significatifs à différents niveaux (Tableau V) influençant la production de molécules actives par la souche D2, une modélisation de l'activité antibactérienne à l'égard de *L. innocua* est réalisée par le biais

d'un plan composite centré afin d'évaluer les effets d'interaction de ces facteurs et déterminer leurs optimums. Vingt milieux de culture ont été préparés avec variation des facteurs opératoires à savoir le pH, l'amidon et le temps d'incubation. La matrice d'expériences pour  $k=3$  et  $N= 20$  ( $N= 2^3 + 2(3) +6$ ) est représentée dans le tableau VI.

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

Paramètres opératoires	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
pH	3.4	5.4	7.4	9.4	11.4
Amidon (g/L)	6	13	20	27	34
Temps d'incubation (jour)	3	5	7	9	11

**Tableau VI** : Matrice d'expériences du plan composite centré pour  $k=3$  (trois facteurs)

Numéro d'essai	pH	Amidon (g/L)	Temps d'incubation (jour)	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
1	5.4	13	5	-1	-1	-1
2	9.4	13	5	+1	-1	-1
3	5.4	27	5	-1	+1	-1
4	9.4	27	5	+1	+1	-1
5	5.4	13	9	-1	-1	+1
6	9.4	13	9	+1	-1	+1
7	5.4	27	9	-1	+1	+1
8	9.4	27	9	+1	+1	+1
9	7.4	20	7	0	0	0
10	7.4	20	7	0	0	0
11	7.4	20	7	0	0	0
12	7.4	20	7	0	0	0
13	7.4	20	7	0	0	0
14	7.4	20	7	0	0	0

15	<b>3.4</b>	20	7	<b><math>-\alpha</math> (-1.68)</b>	0	0
16	<b>11.4</b>	20	7	<b><math>+\alpha</math> (+1.68)</b>	0	0
17	7.4	<b>6</b>	7	0	<b><math>-\alpha</math> (-1.68)</b>	0
18	7.4	<b>34</b>	7	0	<b><math>-\alpha</math> (+1.68)</b>	0
19	7.4	20	<b>3</b>	0	0	<b><math>-\alpha</math> (-1.68)</b>
20	7.4	20	<b>11</b>	0	0	<b><math>+\alpha</math> (+1.68)</b>

***Chapitre III***  
***Résultats et discussions***

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Mycologie de l'université A. Mira de Bejaia durant la période allant du 06 février 2017 au 18 mai 2017.

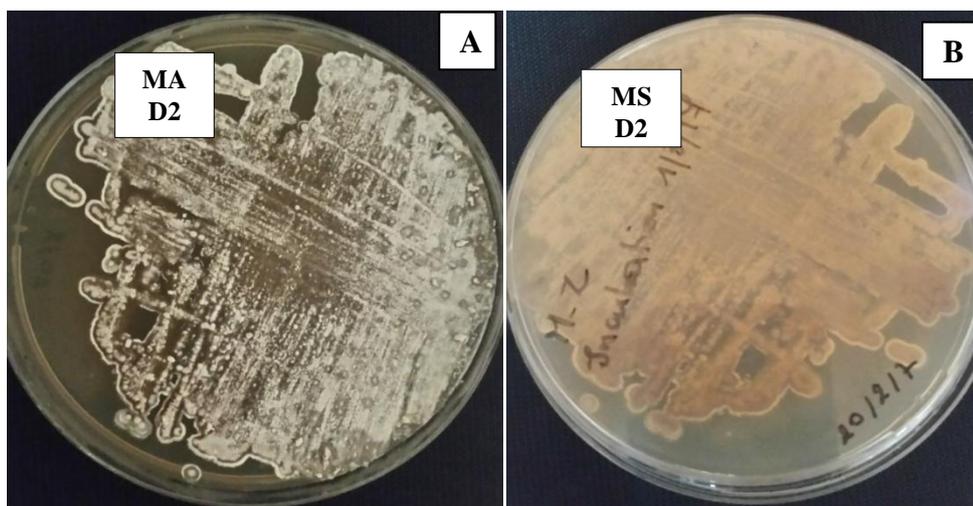
Dans ce chapitre seront présentés les résultats et discussions des cinq parties de ce travail, à savoir : l'étude des caractères morphologiques de la souche d'actinobactérie, la mise en évidence de son activité antagoniste vis-à-vis des germes pathogènes suivie de l'étude des cinétiques de croissance et de production. La sélection des paramètres de culture les plus significatifs influençant la production de molécules bioactives sera également abordé ainsi que la description de l'élaboration du modèle mathématique pour leur optimisation à travers l'utilisation de la méthodologie de surface de réponse.

## I. Etude morphologique de la souche D2

### I. 1. Caractères macromorphologiques

Après ensemencement de la souche D2 sur le milieu Gause, les premiers signes de croissance apparaissent au bout de 3 jours d'incubation à 28°C, et consistent en l'apparition de colonies d'aspect poudreux. Après 7 à 14 jours d'incubation la souche donne des colonies rondes de tailles moyennes, bombées et cotonneuses, à aspect duveteux. Cet aspect est particulier des actinobactéries développant un mycélium aérien (MA) fragmenté, de couleur blanche à gris. Au 21<sup>ème</sup> jours d'incubation, les colonies apparaissent pigmentées d'une teinte violacée (Figure 7A).

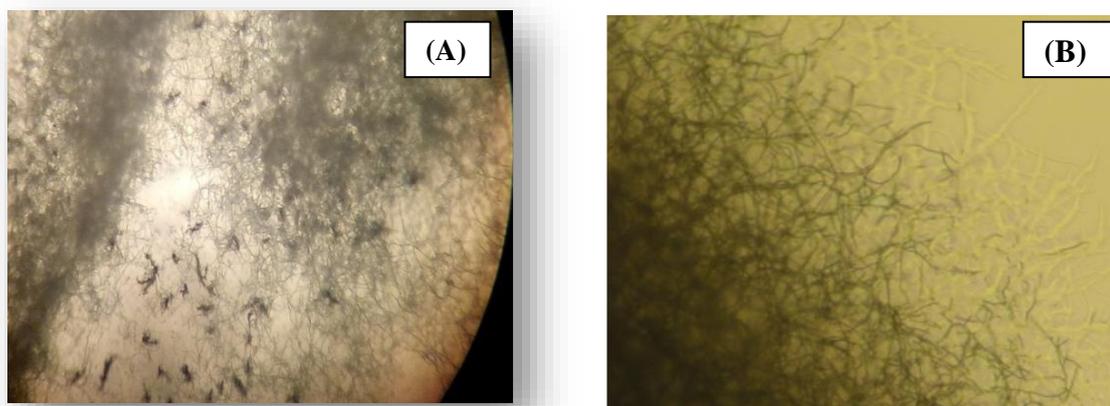
L'observation du revers de la colonie permet de relever la couleur du mycélium de substrat (MS) qui est pigmenté en marron clair avec une teinte violacée (Figure 7B).



**Figure 7 :** Aspect macromorphologique de la souche D2 cultivée sur milieu Gause après 21 jours d'incubation à 28°C. A : aspect et couleur du mycélium aérien des colonies. B : aspect et couleur du mycélium du substrat.

## I.2. Caractères micromorphologiques

L'observation des colonies sous microscope optique aux objectifs x10 (Figure 8A) et x40 (Figure 8B) effectuée directement sur boîte de Pétri après 14 jours d'incubation à 28°C sur milieu Gausse a permis de mettre en évidence des colonies entourées de filaments longs, fins et enchevêtrés avec un mycélium du substrat non sporulé et fragmenté. Le mycélium aérien est constitué d'hyphes fins, ramifiés qui se terminent par des chaînes de spores immobiles de forme spiralées qui se fragmentent en spores sphériques. Sur ce même milieu est produit un pigment diffusible de couleur violet.



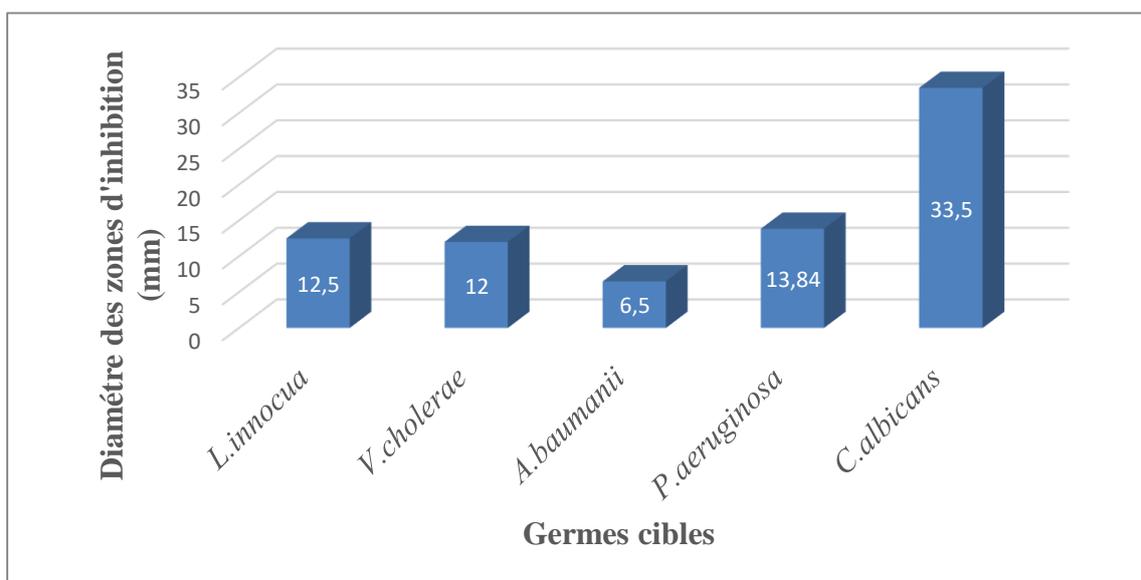
**Figure 8 :** Observation au microscope optique des mycéliums aériens et du substrat de la souche au objectif x10 (A) et au objectif x40 (B).

Il est important de signaler l'importance de l'utilisation de plusieurs milieux de culture dans l'étude de la morphologie car l'observation des chaînes de spores ne s'effectue que sur les milieux donnant une bonne croissance (maturation des spores) (Shirling et Gottlieb, 1966).

D'après les caractéristiques macro et micro morphologiques ainsi que toutes les spécificités culturelles observées pour la souche D2, il nous a été possible de la rattacher au genre *Streptomyces*, tels qu'il est rapporté par Goodfellow et al. (2012). En effet, les actinobactéries appartenant à ce genre présentent des caractéristiques typiques à celle citées plus haut. Lechevalier et Lechevalier en (1967) ont montré que la fréquence de *Streptomyces* dans le sol d'après l'étude de 5000 échantillons issus de 16 sols différents est de 95,34%. Par ailleurs, Selon Shirling et Gottlieb en (1976), l'identification des actinomycètes repose en grande partie sur les caractéristiques morphologiques qui sont considérées comme des caractères stables.

## II. Mise en évidence de l'activité antagoniste

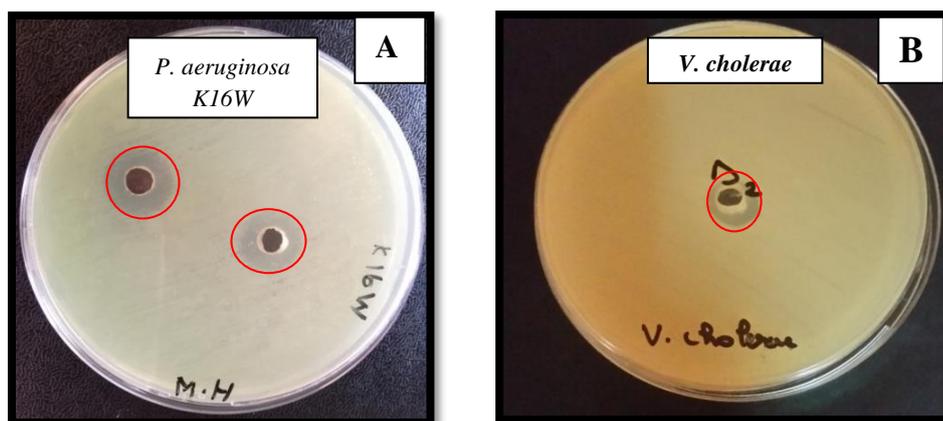
Le pouvoir antimicrobien de la souche D2, est déterminé par la méthode des puits à l'encontre de 5 microorganismes pathogènes : une bactérie à Gram positif, trois bactéries à Gram négatif et une levure. L'activité est exprimée en terme de diamètres des zones d'inhibition rapportés en millimètre. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 9 ci-après



**Figure 9 :** Activité antagoniste de l'isolat D2 ensemencée sur milieu Gausse à l'égard des germes cibles.

Il en ressort des résultats obtenus que l'isolat D2 présente une activité inhibitrice à large spectre et variables vis-à-vis de toutes les bactéries et levure tests. En effet, les zones d'inhibition varient entre 6.5 mm et 33.5 mm, l'activité inhibitrice la plus importante est obtenue à l'encontre de la levure pathogène *C. albicans* enregistrant un diamètre de 33.5 mm, suivi de *P. aeruginosa* présentant un antagonisme de 13.84 mm de diamètre. La plus faible activité inhibitrice est observée vis-à-vis de l'espèce résistante *A. baumannii* avec une zone d'inhibition de 6.5 mm de diamètre.

La figure 10 suivante illustre quelques activités antibactériennes de l'isolat D2 vis-à-vis de quelques germes cibles.



**Figure 10** : Photographies illustrant l'activité antagoniste de l'isolat D2 à l'égard de *P. aeruginosa* (A), *V. cholerae* (B).

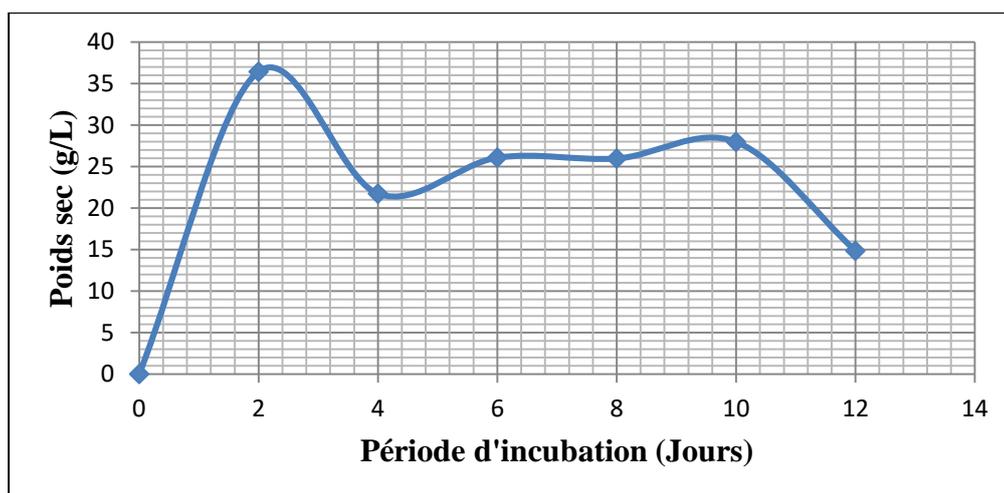
La présence d'activité chez la souche étudiée confirme que les actinobactéries isolés à partir des milieux extrêmes ont un pouvoir antimicrobien remarquable par rapport à leurs homologues isolés à partir des autres écosystèmes tel que rhizosphère, eau douce, sol floristique...etc (Gayathri et al., 2011).

### III. Etude de la cinétique de croissance de la souche D2

La cinétique de croissance de l'isolat D2 sur milieu Gausse a été suivie en culture liquide à 28°C pendant 12 jours d'incubation sous agitation permanente. Des prélèvements quotidiens à intervalle de 48 heures ont été effectués afin d'évaluer le poids sec d'une part et de mesurer la valeur du pH d'autre part. Leur évolution au cours du temps est présentée dans les figures 11 et 12.

#### III.1. Mesure du poids sec

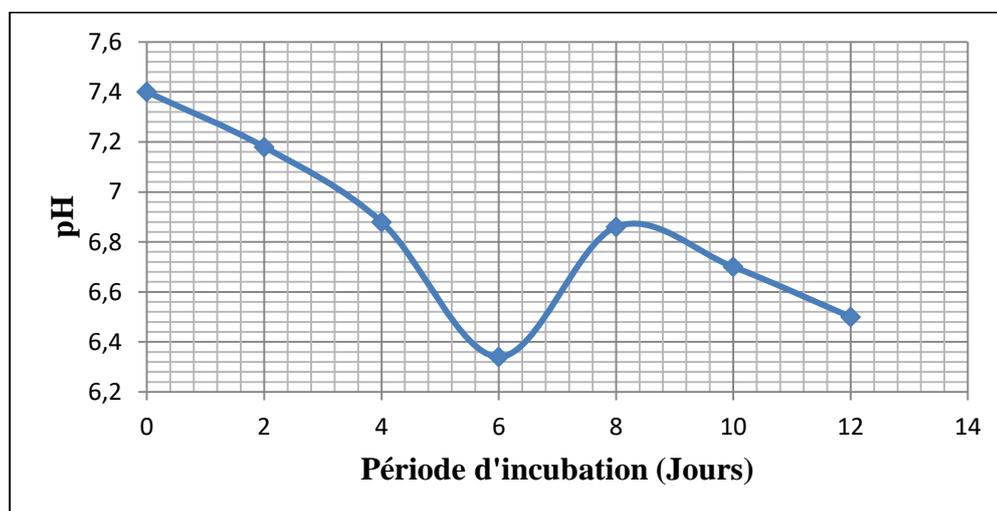
Les résultats obtenus après 48 heures d'incubation montrent que la croissance de la souche D2 est rapide, la biomasse augmente jusqu'à atteindre une valeur maximale de 36.44 g/L. A partir du deuxième jour, une diminution progressive est remarquée et atteint une valeur de 21.74 g/L, suivie d'une légère augmentation qui demeure pratiquement stable jusqu'au dixième jour, à partir duquel une baisse est observée atteignant une concentration minimale de 14.58 g/L au douzième jour (Figure 11).



**Figure 11 :** Variation du poids sec de la souche D2 cultivée sur milieu Gause en fonction de la période d'incubation.

### III.2. Mesure du pH

Les valeurs du pH du milieu de culture enregistrées et présentées en figure 12 démontrent que durant les six premiers jours de croissance, le pH diminue progressivement pour atteindre la valeur la plus basse qui est de 6.34 (acidification du milieu). Au bout du sixième jour, une augmentation du paramètre est constatée atteignant une valeur de 6.86 huitième jours puis une diminution allant jusqu'à 6.5 au douzième jour.



**Figure 12 :** Variation de la valeur du pH initial du milieu de culture en fonction de la période d'incubation.

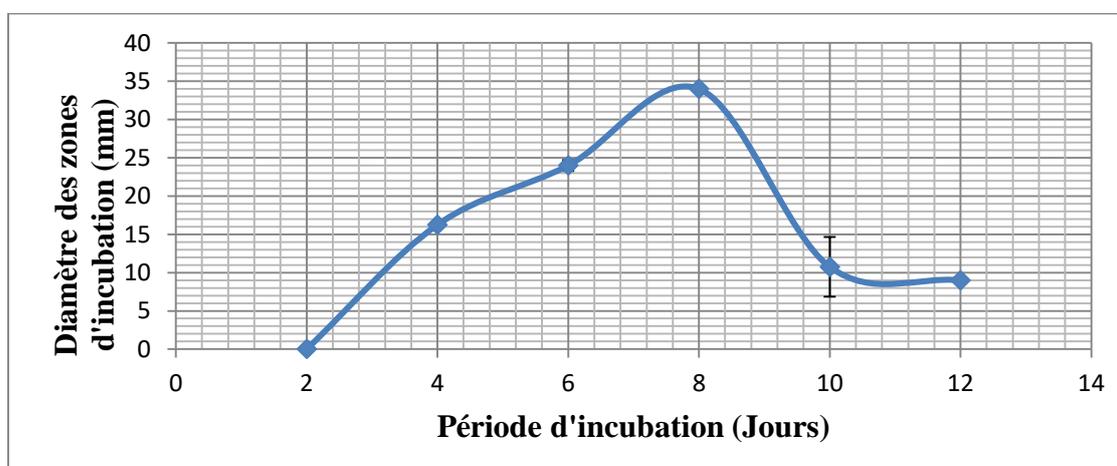
Les courbes de croissance sont caractérisées par l'absence de la phase de latence. En effet la biomasse mycélienne augmente rapidement pendant le deuxième jour d'incubation qui peut être expliqué par l'adaptation de la souche au milieu de culture (pré-

culture) et la synthèse des enzymes nécessaires à la dégradation de ces substrats, accompagné d'un abaissement du pH due à la libération d'acides organiques. L'accumulation de ces derniers induit l'acidification du milieu qui entraîne un ralentissement de la croissance jusqu'au quatrième jour. Des résultats similaires ont été rapportés par Boughachiche et collaborateur (2005). Du quatrième au dixième jour d'incubation, une succession d'abaissement et d'augmentation du pH et du poids sec ont été observées qui pourraient être à l'origine de la production de métabolites secondaires qui acidifient et alcalinisent le milieu et qui provoquent une perturbation de la croissance cellulaire (Ross et Schugerl, 1988).

Du dixième aux douzième jour une diminution parallèle du poids sec et du pH pourrait s'expliquer par l'épuisement des substrats du milieu de culture (Boughachiche et al., 2005).

#### IV. Etude de la cinétique de production de la souche D2

La cinétique de production des métabolites bioactifs de la souche D2 a été suivie en culture solide sur milieu synthétique Gause pendant 12 jours d'incubation à 28°C et l'activité est déterminée par la technique des cylindres d'agar. Des cylindres sont prélevés à intervalle régulier (48 heures) et testés vis-à-vis du germe cible *Listeria innocua*. Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés autour du disque après 24 heures d'incubation à 37°C. Le test de production a révélé une activité positive à l'encontre du germe tel illustré en figure 13. En effet, l'apparition des zones d'inhibition a commencé dès le quatrième jour d'incubation et augmente progressivement pour atteindre une inhibition maximale au huitième jour, une diminution est par la suite enregistrée pour rester plus ou moins stable du dixième au douzième jour.



**Figure 13** : Cinétique de production de la souche D2 vis-à-vis de *L. innocua* sur le milieu Gause.

D'après les résultats obtenus et illustrés en figure 13 il est clairement remarqué que l'activité antibactérienne est maximale après 8 jours d'incubation, ce qui correspond au jour optimum de production de molécules actives. En effet l'étude menée par Singh et al. (2014) rapporte que la production des métabolites par les actinobactéries débute après le quatrième jour et atteint un optimum au septième jour d'incubation. Par ailleurs, ces auteurs ont rapporté que le maximum de l'activité antimicrobienne est observé après l'atteinte du rendement maximale en biomasse.

## V. Sélection des paramètres influençant la production d'antibiotiques par le plan de Plackett et Burman

La conception du plan de Plackett et Burman à l'aide du logiciel Minitab 16.0 a été réalisée pour le criblage des paramètres influençant la production de molécules bioactives par la souche D2. Six facteurs (amidon,  $K_2HPO_4$ ,  $KNO_3$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , pH et le temps d'incubation) ont été choisis dans ce processus de sélection.

L'influence de ces paramètres est déterminée à travers l'estimation de la réponse Y qui est l'activité antibactérienne mesurée en millimètre à l'encontre de *Listeria innocua*.

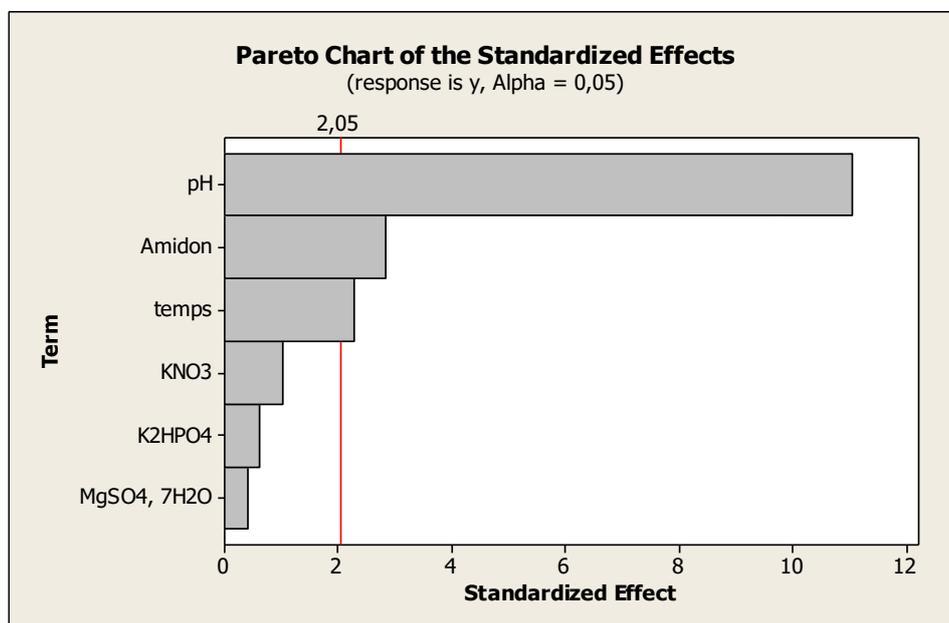
L'ensemble des résultats est résumé dans le tableau VII ci-dessous présentant la moyenne des trois répétitions du test d'activité. La charte de Pareto est illustrée dans la figure 14. Il ressort de ces résultats que trois facteurs s'avèrent significatifs sur la production de métabolites. En effet, le paramètre le plus significatif agissant sur la production des molécules actives est le pH suivi de l'amidon et du temps d'incubation. Les facteurs restant sont considérés comme non significatifs et par conséquent non influençant la production.

Les paramètres de culture significatifs ont été pris en considération dans la prochaine étape.

**Tableau VII :** Moyenne des zones d'inhibition obtenues par le plan de Plackett et Burman sur les 12 milieux de cultures à l'égard de *Listeria innocua*.

Germe Cible	Nombre d'expériences	<i>L. innocua</i> (Y) (mm)
G1		24.5±0
G2		16.5±0
G3		29±0
G4		0
G5		29±0
G6		37±0
G7		0
G8		32±0
G9		35.5±0.70
G10		27.83±0.76
G11		0
G12		0

**G :** Milieu Gausse



**Figure 14 :** Charte de Pareto montrant l'effet de six facteurs étudiés sur la production de métabolites antibactériens.

## VI. Modélisation de l'activité antibactérienne de la souche D2 à l'égard de *L. innocua*

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.

### VI.1. Elaboration du modèle du premier degré

Les paramètres opératoires ( $Z_1$ ,  $Z_2$ ,  $Z_3$ ) considérés pour la modélisation de l'activité antibactérienne de la souche D2 à l'égard de *L. innocua* sont respectivement : Le pH, la concentration en amidon et le temps d'incubation.

Les valeurs des variables naturelles  $Z_j$  et codées  $X_j$  des différents paramètres opératoires ainsi que la moyenne des zones d'inhibition ( $Y$ ) obtenu pour chaque test sont regroupées dans le tableau VIII qui représente la matrice des expériences.

Dans notre cas le nombre  $N$  de combinaisons possibles des trois facteurs ( $k=3$ ) sur deux niveaux est égal à  $2^3=8$ .

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

Nombre d'essai	$Z_1$	$Z_2$ (g/L)	$Z_3$ (J)	$X_0$	$X_1$	$X_2$	$X_3$	Y (mm)
G1	5,4	13	5	1	-1	-1	-1	17± 1.41
G2	9,4	13	5	1	+1	-1	-1	12.5 ±0.5
G3	5,4	27	5	1	-1	+1	-1	0
G4	9,4	27	5	1	+1	+1	-1	25.5
G5	5,4	13	9	1	-1	-1	+1	25.5±0.71
G6	9,4	13	9	1	+1	-1	+1	23.5
G7	5,4	27	9	1	-1	+1	+1	31
G8	9,4	27	9	1	+1	+1	+1	28.75±3.89

**Note** :  $X_0$  : variable fictive,  $Z_1$  : pH,  $Z_2$  : Amidon (g/L),  $Z_3$  : Temps d'incubation (J),  $G$  : milieu Gausse.

La moyenne des zones d'inhibitions des 8 milieux de culture est  $\bar{y} = 20.47$  mm. Le nombre ( $n_0$ ) d'expériences au centre du domaine expérimental est de 6, les diamètres des zones d'inhibition ainsi obtenues sont rassemblés dans le tableau IX.

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

$n_0$	$y_0$ (mm)
1	11.5
2	13
3	13.5
4	12
5	11.5
6	13.5

La moyenne des valeurs des zones d'inhibition au centre du domaine est:  $\bar{y}_0 = 12.5$  mm.

#### VI.1.1. Calcul des coefficients du modèle du premier degré

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 X.

**Tableau X :** Valeurs des coefficients de l'équation de régression

Terme constant	Effets linéaires		
$b_0$	$b_1$	$b_2$	$b_3$
20.47	2.09	0.84	6.72

Effets d'interactions			
$b_{12}$	$b_{13}$	$b_{23}$	$b_{123}$
3.72	-3.16	-1.84	-3.78

#### VI.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 antibactérienne 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** : elle est estimée par celle calculée au centre du domaine expérimental qui est donnée par la relation suivante :

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

$y_i$ : Valeur des diamètres des zones d'inhibition des essais au centre

$\bar{y}_0$ : Moyenne des essais au centre;  $\bar{y}_0=12.5$  mm

$n_0$  : Nombre d'essais au centre ;  $n_0= 6$

Ainsi on aura :  $S_{\text{rep}}^2 = 0.9$

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 :

$S_{b_j}$  : Ecart type défini par :

$$S_{b_j} = \frac{S_{\text{rep}}}{\sqrt{N}}$$

On aura alors  $S_{b_j}= 0.335$

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

**Tableau XI** : Valeurs de  $t_j$

Terme constant	Effets linéaires		
$t_0$	$t_1$	$t_2$	$t_3$
61.03	6.24	2.51	20.03

Effets d'interactions			
$t_{12}$	$t_{13}$	$t_{23}$	$t_{123}$
11.09	9.41	5.50	11.27

En utilisant la table de Student relative à un test bilatéral (Annexe III), 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 5, soit  $t_{0.05}(5) = 2,57$ , d'après les résultats du tableau précédent, on remarque que la valeur de  $t_2$  inférieure à la valeur tabulée du test de Student (2,57) déduisant ainsi que le coefficient correspondants ( $b_2$ ) n'est pas significatif donc il sera éliminé de l'équation de régression.

L'équation de régression du modèle de premier degré s'écrit alors :

$$\hat{y} = 20.47 + 2.09x_1 + 6.72x_3 + 3.72x_1x_2 + 3.16x_1x_3 + 1.84x_2x_3 - 3.78x_1x_2x_3$$

#### ✓ Test de signification de la régression

On réalise un test de Fisher pour vérifier la signification de la régression dont le rapport  $F$  est donné par la relation :

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

Avec :  $F=5.53$

Sachant que:  $\bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^N y_i}{N}$  ;  $\bar{y}=20.47\text{mm}$

D'après la valeur tabulée du test de Fisher (annexe IV),  $F_{0.95}(\ell - 1, N - \ell) = F_{0.95}(6, 1)$  est égal à 234. Étant donné que la valeur tabulée est supérieure à celle calculée, l'équation de régression est adéquate et le modèle n'est pas valide.

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

Dans cette étape, on compare la valeur de la réponse déterminée par le modèle au centre du domaine d'étude  $\hat{y} = 20.47$  mm à la moyenne des 6 expériences réalisées au centre, soit  $\bar{y}_0 = 12.5$  mm.

L'erreur relative absolue entre ces deux valeurs (41.48%) étant supérieure à 5%, on conclue alors que le modèle linéaire de premier degré choisi n'est pas valide. Nous allons donc tester un modèle de second degré.

### VI.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 activités obtenues du plan en étoile sont regroupées dans le tableau XII.

**Tableau XII** : Résultats du plan en étoile ( $N_a = 2.k = 6$ )

Nombre d'essai	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>0</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	y (mm)
G1	3,4	20	7	1	-1.68	0	0	0
G2	11,4	20	7	1	+1.68	0	0	26
G3	7,4	6	7	1	0	-1.68	0	32
G4	7,4	34	7	1	0	+1.68	0	28
G5	7,4	20	3	1	0	0	-1.68	26.75±0.53
G6	7,4	20	11	1	0	0	+1.68	31

**Note** : X<sub>0</sub> : variable fictive, X<sub>1</sub> : pH, X<sub>2</sub> : Amidon (g/L), X<sub>3</sub> : Temps d'incubation (J), G : milieu Gausse

La moyenne des diamètres des zones d'inhibition obtenue par le modèle du deuxième degré est:  $\bar{y} = 19.13$  mm.

### VI.2.1. Calcul des coefficients du modèle

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

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

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

$[\mathbf{X}]^T$  : La matrice transposée de  $[\mathbf{X}]$

Les résultats de ce calcul sont regroupés dans le tableau (XIII).

Tableau XIII : Valeurs des coefficients du modèle de second degré

Terme constant	Effets linéaires		
$b_0$	$b_1$	$b_2$	$b_3$
12.64	4.43	0.002	4.47

Effets d'interactions quadratiques					
$b_{12}$	$b_{13}$	$b_{23}$	$b_{11}$	$b_{22}$	$b_{33}$
3.72	-3.16	1.84	-0.71	5.31	4.91

VI.2.2. Analyse statistique de l'équation de régression

✓ Vérification de la signification des coefficients par le test de Student

La signification des coefficients du modèle est vérifiée par les mêmes calculs réalisés pour le plan factoriel de premier degré, on a la valeur de la variance de reproductibilité  $S_{rep}^2=0.9$

En ce qui concerne la variance des coefficients du modèle de second degré, on multiplie les éléments  $C_{jj}$  de la diagonale de la matrice de dispersion avec la variance de reproductibilité. La relation est donnée 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 XIV suivant :

Tableau XIV : Valeurs de  $t_j$

Terme constant	Effets linéaires		
$t_0$	$t_1$	$t_2$	$t_3$
32.68	17.24	0.008	17.38

Effets d'interactions quadratiques					
$t_{12}$	$t_{13}$	$t_{23}$	$t_{11}$	$t_{22}$	$t_{33}$
11.09	9.41	5.50	2.85	21.21	19.62

En utilisant la table de Student relative à un test bilatéral (Annexe IV), on détermine la valeur de  $t(f)$  pour le niveau de signification  $=0.05$  et le nombre de degré de liberté  $f=n_0-1$  qui est égale à 5, soit  $t_{0.05}(5) = 2.57$ , d'après les résultats du tableau précédent, on remarque que la valeur de  $t_2$  est inférieure à la valeur tabulée du test de Student (2.57) déduisant ainsi que le coefficient correspondant  $b_2$  n'est pas significatif donc il sera éliminé de l'équation de régression.

✓ **Test de signification de la régression**

La valeur  $F$  calculée par le test de Fisher est de 6.62 cependant la valeur tabulée pour un niveau de signification de  $\alpha = 0.05$  et un nombre de degrés de liberté  $(N - \ell) = 11$  et  $(\ell - 1) = 8$  est de 2.95, comme la valeur calculée est supérieure à celle tabulée, le modèle ainsi obtenu est considéré significatif et valide à 95%.

✓ **Calcul du coefficient de détermination**

Appelé aussi coefficient de corrélation il est défini par :

$$R^2 = \frac{\text{Variation due à la régression}}{\text{Variation total}}$$

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

La valeur du coefficient de détermination  $R^2$  est égal à 0.93. Ce résultat implique que le modèle explique 93% des variations de la réponse.

Le modèle de second degré s'écrit alors comme suit :

$$\hat{y} = 12.64 + 4.43x_1 + 4.47x_3 + 3.72x_1x_2 - 3.16x_1x_3 + 1.84x_2x_3 - 0.71x_1^2 + 5.31x_2^2 + 4.91x_3^2$$

D'après le modèle de second degré développé traduisant l'activité antibactérienne vis-à-vis de *Listeria innocua*, on remarque que le pH ( $x_1$ ) et le temps d'incubation ( $x_3$ ) sont les seuls facteurs qui ont une influence sur la réponse avec des effets (+4.43) et (+4.47) respectivement. Le signe positif de ces derniers signifie que l'augmentation de leurs valeurs minimales (5.4 pour le pH et 5 jours pour le temps d'incubation) à leurs valeurs maximales (9.4 pour le pH et 9 jours pour le temps d'incubation) accroît l'activité antibactérienne. Pour l'influence du pH, les résultats de la présente étude sont comparables

à ceux de certains travaux rapportant l'activité antibactérienne de certaines espèces de *Streptomyces* à l'encontre des bactéries, de champignons et levures à pH alcalin (Sathiyarayanan et al., 2014). Le même résultat est obtenu dans l'étude réalisée par Mander et al (2013) ou ils ont démontré que la production d'agents antimicrobiens par une souche *Streptomyces* sp. est maximale à un pH égal à 8.36.

Concernant l'influence du temps d'incubation, le même résultat sur l'effet significatif de ce paramètre été rapporté par Velayudham et Murugan, (2015) sur *Streptomyces rochei*.

Par ailleurs, Nous avons trouvé que l'effet linéaire de la concentration en amidon ( $x_2$ ) été non significatif et a été éliminé de l'équation. Cela veut dire que son influence seule n'est pas significative sur les variations de la réponse (activité antibactérienne) et dépendante des autres facteurs (pH, temps d'incubation) ce qui traduit l'existence des interactions ( $x_1, x_2$ ) et ( $x_2, x_3$ ). De plus Arul Jose et Jebakumar. (2014) ont rapportés que l'amidon est un élément qui a un effet significatif sur la production d'agents antimicrobien par *Streptomyces* sp.

L'équation de régression montre également l'existence des interactions ( $x_1, x_3$ ), ( $x_2, x_3$ ) et ( $x_1, x_2$ ).

Cependant, une étude de l'activité antibactérienne par la souche *Streptomyces* sp. a signalé que le  $K_2HPO_4$ ,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  exercent un effet significatif en interaction (Rajeswari et al., 2015). Parmi d'autres effets d'interaction entre les différents paramètres Sharma et Manhas. (2013) ont montrés un effet significatif entre le  $KNO_3$  et le  $K_2HPO_4$  sur la production de métabolite antimicrobien par *Streptomyces*.

## VII. Optimisation

### VII.1. 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 antibactérienne en fonction des différents paramètres opératoires à savoir : le pH ( $x_1$ ) la concentration en amidon ( $x_2$ ) et le temps d'incubation ( $x_3$ ). L'étape de l'optimisation consiste à déterminer les optima de ces facteurs qui entraînent une meilleure production de métabolites antimicrobiens. A cet effet, les courbes iso-réponses 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 apparait.

Rappelons l'équation de régression de modèle du second degré :

$$\hat{y} = 12.64 + 4.43x_1 + 4.47x_3 + 3.72x_1x_2 - 3.16x_1x_3 + 1.84x_2x_3 - 0.71x_1^2 + 5.31x_2^2 + 4.91x_3^2$$

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

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{d\hat{y}}{dx_1} = 4.428 + 3.718x_2 - 3.156x_3 - 1.428x_1 = 0 \\ \frac{d\hat{y}}{dx_2} = 3.718x_1 + 10.616x_2 + 1.843x_3 = 0 \\ \frac{d\hat{y}}{dx_3} = 4.462 - 3.156x_1 + 1.843x_2 + 9.82x_3 = 0 \end{array} \right.$$

Après la résolution de ce système d'équation on a obtenu les valeurs suivantes :

$$\left\{ \begin{array}{l} x_1 = 1.46 \\ x_2 = -0.53 \\ x_3 = 0.12 \end{array} \right.$$

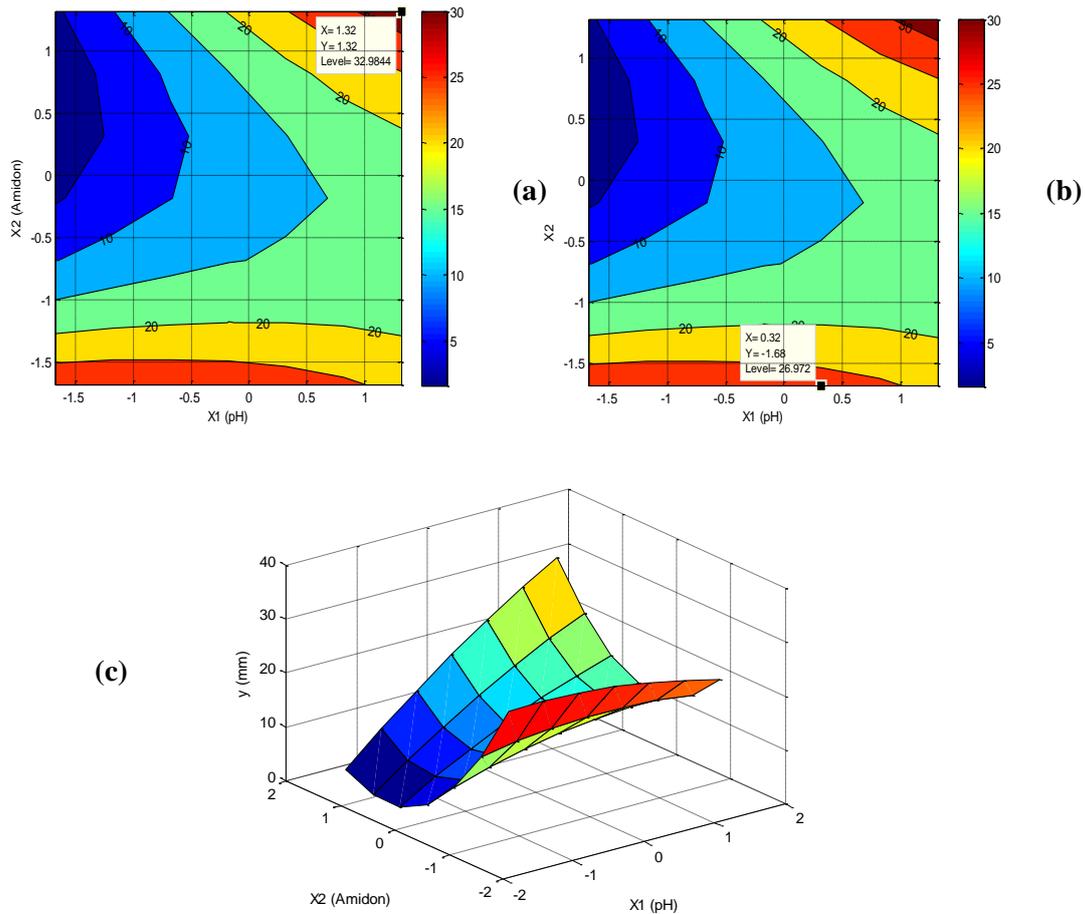
L'activité antibactérienne théorique pour les valeurs optimales de  $x_1$ ,  $x_2$  et  $x_3$  en remplaçant dans le modèle du second degré est de 16.14 mm.

## VII.2. Tracé des courbes iso réponses et des surfaces de réponses

Les figures 15, 16 et 17 suivantes sont les courbes iso-réponses de l'activité antibactérienne, tracées dans le plan de l'interaction la plus importante  $x_1$  et  $x_2$  (le pH, amidon) en faisant varier  $x_3$  à différents niveaux (-1. 0. +1).

✓ Pour  $x_3=0$ , l'équation de régression s'écrit comme suit :

$$\hat{y} = 12.64 + 4.43x_1 + 3.72x_1x_2 - 0.71x_1^2 + 5.31x_2^2$$



**Figure 15 :** Courbes iso réponses (a) et (b) et surface de réponse (c) pour :  $x_3=0$ .

L'analyse de la courbe iso-réponse présentée en figure 15 (a) montre qu'une activité de 33 mm peut être atteinte pour un pH = 10.04 ( $x_1=1.32$ ) et la concentration en amidon ( $x_2=0.32$ ) = 29.24 g/L. Cependant, la même courbe iso-réponse (b) indique qu'une activité de 27 mm peut être obtenue pour une valeur de pH plus favorable pour la croissance de la souche d'actinobactérie D2 de 8.04 ( $x_1=0.32$ ) au lieu de 10 et une quantité plus économique pour l'amidon de 6 g/L ( $x_2=-1.68$ ) au lieu de 29.24 g/L.

✓ **Pour  $x_3=-1$**  l'équation de régression s'écrit comme suit :

$$\hat{y} = 13.09 + 7.59x_1 - 1.84x_2 + 3.72x_1x_2 - 0.71x_1^2 + 5.31x_2^2$$

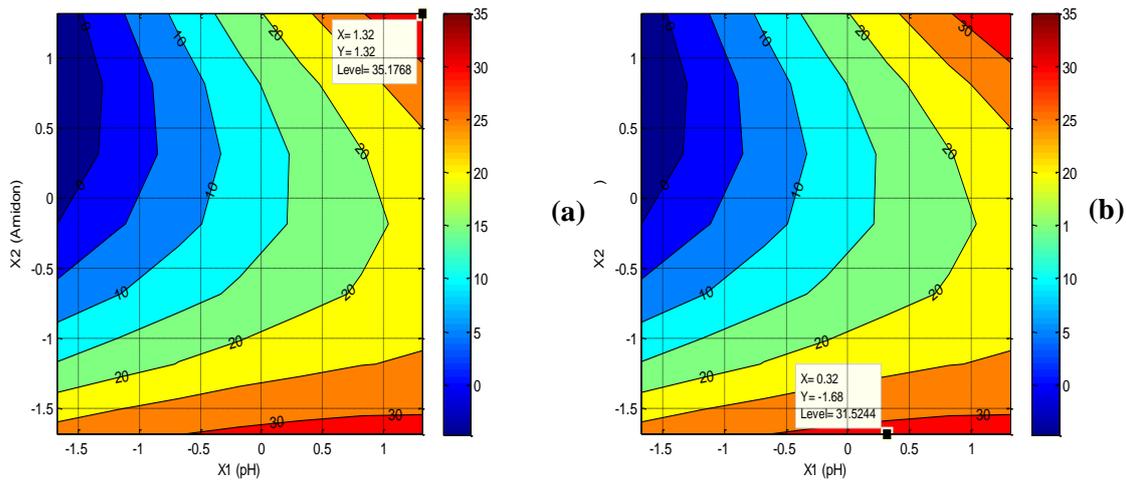


Figure 16 : Courbes iso réponses (a) et (b) pour  $x_3 = -1$ .

La figure 16 (a) est tracée pour un temps d’incubation de 5 jours ( $x_3 = -1$ ). On remarque que l’optimum en activité antibactérienne est de 35 mm pour un pH de 10.04 ( $x_1 = 1.32$ ) et pour une concentration en amidon de 29.24 g/L ( $x_2 = 1.32$ ). Toutefois, dans l’objectif de travailler dans des conditions plus favorable et plus économique une activité de 32 mm est obtenue pour un pH de 8.04 et une concentration en amidon de 6 g/L (16 b).

✓ Pour  $x_3 = +1$  l’équation de régression s’écrit comme suit :

$$\hat{y} = 22.01 + 1.27x_1 + 1.84x_2 + 3.72x_1x_2 - 0.71x_1^2 + 5.31x_2^2$$

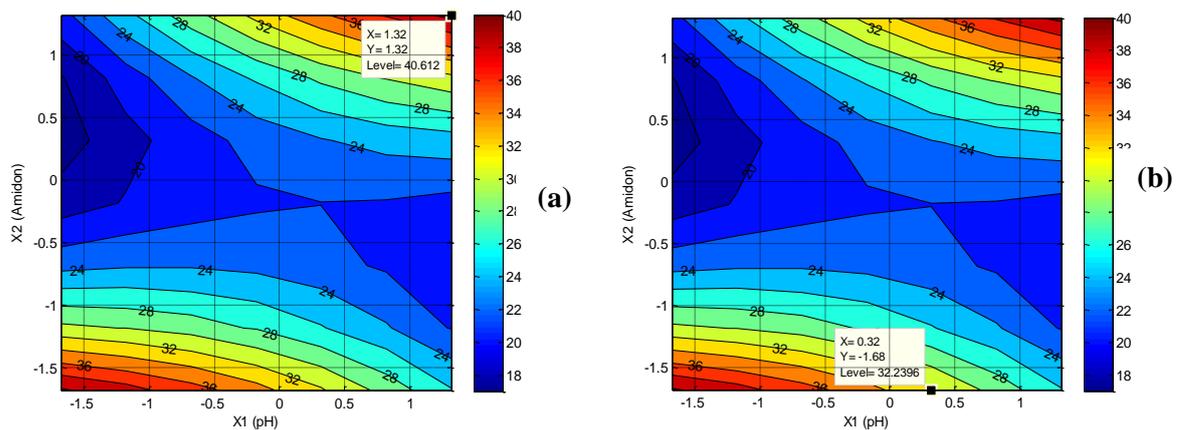


Figure 17 : Courbes iso réponses (a) et (b) pour :  $x_3 = +1$ .

La courbe iso-réponse de la figure 17 (a) tracée pour un temps d’incubation de 9 jours, ( $x_3 = +1$ ), montre une activité optimale de 41 mm peut être atteinte pour les mêmes conditions obtenus en figure (15 et 16 a) pour un pH=10.04 et une concentration en amidon 29.24 g/L. la même courbe (b) nous indique qu’une région du domaine

expérimentale nous donne une activité de 32 mm pour les mêmes conditions favorables et économique cités auparavant (figure 15 b) (un pH de 8.04) ( $x_1=0.32$ ) et pour une concentration en amidon de 6 g/L ( $x_2=-1.68$ ).

En résumé, on peut dire l'optimum en activité antimicrobienne qui peut être atteinte pour des conditions plus économique et plus favorable pour la souche est de 32 mm ( $x_3=-1$ ) correspondant à :

- Une concentration en amidon de 6g/L ( $x_2=-1.68$ )
- Un pH de 8.04 ( $x_1=0.32$ )

Pour transformer les variables centrées réduites ( $x_j$ ) aux variables naturelles nous avons appliqué la formule de passage ou de codage suivante :

$$X_j = \frac{Z_j - Z_j^0}{\Delta Z_j}, \quad j=1,2,\dots,k$$

Tels que :

$$Z_j^0 = \frac{Z_{j\max} + Z_{j\min}}{2} \quad \text{Et} \quad \Delta Z_j = \frac{Z_{j\max} - Z_{j\min}}{2}$$

$X_j$  est la variable centrée réduite correspondant à  $Z_j$ .

Le point de coordonnées ( $Z_1^0, Z_2^0, \dots, Z_k^0$ ) est dénommé centre du plan ;  $\Delta Z_j$  est l'unité ou intervalle de variation suivant l'axe des  $Z_j$ .  $Z_{j\min}$  et  $Z_{j\max}$  sont les niveaux inférieur et supérieur des facteurs qui constituent les frontières du domaine d'étude (Goupy et Creighton, 2006).

**Exemple :** Transformation de variable centrée réduite ( $x_j$ ) aux variables naturelles pour le pH avec :  $x_1=0.32$

$$Z_j = \frac{9.4 + 5.4}{2} = 7.4$$

$$\Delta z_j = \frac{9.4 - 5.4}{2} = 2$$

$$X_1 = \frac{pH - Z_j}{\Delta z_j} = \frac{pH - 7.4}{2} = 0.32 \iff pH = 8.04$$

A la lumière des résultats obtenus, il nous a été possible d'améliorer et d'optimiser la production de molécules actives par la souche d'actinobactérie *Streptomyces* sp. D2 via la méthode des plans d'expérience à travers l'utilisation des plans de Plackett et Burman et composite centré. Cette approche nous a permis de concevoir un milieu de culture avec des paramètres opératoires différents du milieu de base et ainsi optimiser la production des substances actives de 60,94%, avec un temps d'incubation de cinq jour, un pH de 8.04 et une concentration en amidon de 6 g/L.

Ainsi, la diminution de la durée d'incubation (x3) de sa valeur maximale (9 jours) à sa valeur minimale (5 jours) fait augmenter la production des molécules bioactives ce qui corrobore les études menées par Martin et Demain (1980), Lohr et al. (1989) et Seo et al. (2010), qui ont constaté que plusieurs antibiotiques synthétisés par des souches de *Streptomyces* apparaissent au premier jour de culture et atteignent leur maximum au quatrième jour. D'autre part, Lebrihi et al. (1988) et Lounès et al. (1995) ont démontré que la production spécifique de métabolites secondaires s'avère souvent meilleure sur une source de carbone complexe, plus difficilement métabolisable, comme les polysaccharides (amidon, dextrines) comme c'est le cas pour notre souche. Par ailleurs, Hamza et al. (2013) ont établi que l'utilisation de l'amidon comme source de carbone permettait d'avoir un rendement plus élevé de la molécule active étudiée produite par la souche *Streptomyces* sp. De plus, selon Jacob et al. (2017), pour la plupart des microorganismes, une source de carbone rapidement assimilable exerce un effet négatif sur la biosynthèse (répression catabolique ou effet de glucose) qui peut être surmonté par l'utilisation de source complexe de carbone comme l'amidon.

Par ailleurs, le pH, qui est un facteur important qui influe sur la physiologie d'un microorganisme en affectant la solubilité et l'absorption des nutriments, l'activité enzymatique, morphologie de la membrane cellulaire et la formation de sous-produits (Vijayabharathi et al., 2012), exerce un effet (positif) sur l'activité antibactérienne en passant d'un niveau minimal à un niveau maximal. Ce résultat concorde avec celui de Singh et al. (2009) qui ont concluent que la production maximale d'antibiotiques par la souche *Streptomyces tanashiensis* est obtenue à pH 8 et qui peut même atteindre un pH 9. Ce résultat a également été rapporté par Basilio et al. (2003) démontrant que les souches de *Streptomyces* produisaient des antibiotiques à des pH alcalins.

# ***Conclusion***

L'émergence et l'accroissement au cours de ces dernières années, de la résistance des bactéries aux antibiotiques, a imposé aux chercheurs de trouver de nouvelles molécules issues de microorganismes provenant de milieux particuliers, peu explorés voir même extrêmes tels que les milieux hypersalins. L'accent est encore une fois mis sur les actinobactéries comme producteurs et source de nouvelles molécules actives.

Cette étude a été entreprise dans le but d'optimiser et d'augmenter la production de molécules bioactives par une souche d'actinobactérie isolée à partir d'un sol salin saharien (Sebkha) de la région de Bechar, à travers l'utilisation des plans d'expérience.

Pour atteindre cet objectif, les points suivant ont été réalisés :

- ✓ La caractérisation macro et micro morphologique de l'isolat D2 sur milieu Gausse qui nous a amené à assigner la souche au genre *Streptomyces*, ou le nom *Streptomyces* sp. D2 lui a été attribué.
- ✓ L'évaluation du potentiel antagoniste de l'isolat D2 vis-à-vis des microorganismes cibles à Gram positif et négatif ainsi qu'à l'encontre de la levure pathogène *C. albicans* en utilisant la technique des puits. Ce qui a permis de mettre en évidence une activité antimicrobienne importante envers tous les germes tests utilisés. L'étude des cinétiques de croissance et de production de la souche D2 des molécules bioactives à l'égard de *Listeria innocua*, ce qui permet de déterminer les jours optimums de croissance et de production d'agents antimicrobiens à travers l'évaluation des variations du poids sec d'une part et du pH du milieu utilisé d'autre part, les résultats sont clairement démontrés que la croissance de la souche ainsi que la production de métabolites bioactifs sont à leurs optima au deuxième et au huitième jour d'incubation, respectivement.
- ✓ L'évaluation de l'effet des différents constituants du milieu de culture Gausse sur la production d'agents antibactériens par l'isolat D2 à l'encontre de *Listeria innocua* en utilisant le modèle statistique Plackett et Burman. Les résultats de l'analyse ont démontré l'influence de trois facteurs opératoires sur l'activité antimicrobienne qui sont le pH, la concentration en amidon et le temps d'incubation.
- ✓ La modélisation statistique par le Plan Composite Centré et le tracé des courbes iso-réponses sont consacrés à l'optimisation des facteurs influençant la production d'agents antibactériens issus du modèle de Plackett et Burman à des fins de détermination des niveaux optimums des paramètres étudiés et leur interaction.
- Les résultats ont montré que les facteurs influençant positivement l'activité antagoniste de la souche D2 à l'égard de *Listeria innocua* sont le temps d'incubation

et le pH. La concentration en amidon n'exerce aucun effet en état linéaire, toutefois il présente un effet significatif en interaction avec d'autres paramètres.

• D'après le tracé des courbes iso-réponses les valeurs optimales des paramètres opératoires pour une activité maximale de 41 mm sont les suivantes : Temps d'incubation (9 jours), le pH (10.04) et enfin la concentration en amidon (29.24 g/L). Pour des raisons économiques d'une part et le gain du temps d'autre part un modèle qui minimise le temps d'incubation ainsi que la consommation en amidon avec un pH favorable au développement de la l'isolat D2 a été choisi. L'activité inhibitrice obtenue en ce modèle est de 32 mm de diamètre pour un temps d'incubation de 5 jours, un pH de 8,04 et une concentration en amidon de 6 g/L.

L'objectif de ce travail est atteint. Néanmoins, le sujet est loin d'être épuisé. En effet, à la suite de ce travail, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées. Les principales perspectives sont les suivantes :

- Identification moléculaire de l'isolat D2, et confirmation de sa parenté phylogénique par les techniques suivantes : ADN<sub>r</sub> 16S, Hybridation ADN/ADN.
- Etude des cinétiques de croissance et de production de la souche D2 sur d'autres milieux de culture.
- Etude du spectre d'action des substances produites sur d'autres bactéries en particulier sur les bactéries multiresistantes.
- Purification et caractérisation structurale de chacune des molécules bioactives produite par le biais des techniques chromatographique et spectrométriques.

***Références  
Bibliographiques***

### A

- Aboul-enein HY., Ali I. (2000). Marcocyclic Antibiotics As Effective chiral Selector Resolution by liquid chromatography and capillary Electrophoresis. *Chromatographia*. **52**, 679-691.
- Aharonowitz Y. (1980). Nitrogen metabolite regulation of antibiotic biosynthesis. *Annu. Rev. Microbiol.* **34**, 209-233.
- Arul Jose P., Jebakumar SRD. (2014). Successive Nonstatistical and Statistical Approaches for the Improved Antibiotic Activity of Rare Actinomycete *Nonomuraea* sp. JAJ18. *Bio Med Research International*. 1-11.

### B

- Basilio A., Gonzalez I., Vicente MF., Gorrochategui J., Cabello A., González A., Genilloud O. (2003). Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. *Journal of Applied Microbiology*. **95**, 814–823
- Bastide A., de Méo M., Andriantsoa M., Laget M., Duménil G. (1986). Isolement et sélection de souches d'actinomycète tes productrices de substances antifongiques de structure non-polyéniques. *Mircen Journal*. **2**, 453-466.
- Belyagoubi L. (2014). Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. Thèse de Doctorat de Biologie. Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, tlemcen, 90p.
- Benoit D., Tourbier Y., Germain S. (1994). Plans d'expériences, construction et analyse. Technique et documentation. Edition : Lavoisier. Paris : 206p.
- Bérdy J. (2005). Bioactive Microbial Metabolites. *The Journal of Antibiotics*. **58**(1), 1-26.
- Berton A., Theilleux J., Sanglier J.J., Vobis G. (1989). Biology, taxonomy and ecology of the producing microorganisms. In : Larpent JP., Sanglier JJ *Biotechnologie des antibiotiques*. (Eds), Masson. Paris, pp. 33-70.
- Billerbeck VG., Roques C., Vanière P., 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. *Bio engineering*. 106 Suppl 2 : 148-153.

## Références bibliographiques

---

- **Boudjella H.** (1994). Influence des milieux de culture, des antibiotiques et du prétraitement des échantillons à la chaleur sur la sélection des genres et des espèces d'actinomycètes rares de quelques sols sahariens. Magister de Microbiologie, E.N.S. de Kouba. Alger. 177 p.
- **Boughachiche F., Reghioua S., Zerizer H., Oulmi L., Boudemagh L., Kitouni M., Boulahrouf A.** (2005). Production et caractérisation préliminaire des antibiotiques isolés d'une Actinomycetale isolée de Sebka de Ain Mlila (Algérie). *Antibiotiques*. **7**, 234-238.
- **Bu'lock J.D.** (1965). The biosynthesis of natural products. An introduction to secondary metabolism. Edition : McGraw-Hill. London : p.77-93.
- **Bundale S., Begde D., Nashikkar N., Kadam T., Upadhyay A.** (2015). Optimization of Culture Conditions for Production of Bioactive Metabolites by *Streptomyces* spp. Isolated from Soil. *Advances in Microbiology*. **5**, 441-451.

### **D**

- **Das S., De M., Ray R., Ganguly D., Jana TK., De TK.** (2011). Salt tolerant culturable microbes accessible in the soil of the Sundarban Mangrove forest, India. *Open Journal of Ecology*. **1**(2), 35-40.
- **De Lima Procópio RE., Da Silva IR., Martins MK., De Azevedo JL., De Araújo JM.** (2012). Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. **16**, 466-471.
- **Demain AL.** (1989). Carbon source regulation of idiolite biosynthesis in actinomycetes. In : Shapiro S. (Eds), Regulation of secondary metabolism in actinomycetes. FL : CRC Press, Boca Raton, pp. 127-34.

### **F**

- **Fadil M., Farah A., Ihssane B., Haloui T., Rachiq S.** (2014). Application de plan de Plackett Et Burman dans le criblage des paramètres agissants sur le processus d'hydrodistillation de Thym du Maroc (*Thymus vulgaris L.*). *International Journal of Innovation and Applied Studies*. **6**(3), 530-540.

### G

- Gayathri A., Madhanraj P., 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, Kampfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Ludwig W, Suzuki k, Withman WB. (2012). Phylum XXVI. Actinobacteria In : "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Parte A. vol **5**, p.34-2028.
- Goodfellow M., Williams ST. (1983). Ecology of Actinomycetes. *Ann Rev Microbiol.* **37**, 189-216.
- Gottlieb, D. (1973). General consideration and implication of the *Actinomycetales*. In : *Actinomycetales* characteristics and practical importance. Edited by Sykes. G and F. A. Skinner. Academic Press. London, New York.
- Goupy J, Creighton L. (2006). Introduction aux plans d'expériences. 3<sup>ème</sup> édition : DUNOD. Paris : 324p.
- Goupy J. (1999). Plans d'expériences pour surfaces de réponses. Edition : DUNOD. Paris. 409p.
- Goupy J. (2001). Introduction aux plans d'expériences. 2<sup>ème</sup> Edition : DUNOD. Paris : 109p.
- Goupy J. (2005). Pratiquer les plans d'expériences. Edition : DUNOD. Paris, pp. 501-295.
- Goupy J. (2006). Les plans d'expériences. *Revue Modulad.* (34), 74-116.
- Guillot JF. (1989). Apparition et évolution de la résistance bactérienne aux antibiotiques. *Annales de recherches vétérinaires.* **20** (1), 3-16.

### H

- Hagedorn C. (1976). Influences of Soil Acidity on Streptomyces Populations Inhabiting Forest Soils. *Applied and Environmental Microbiology.* **32** (3), 368-375.
- Hassan MA., El-Naggar MY., Said WY. (2001). Physiological factor saffecting the production of an antimicrobial substance by *Streptomyces violatus* in batch cultures. *Egyptian Journal of Biology.* **3**, 1-10.
- Hamza AA., Ali HA., Clark BR., Murphy CD., Elobied EA. (2013). Optimization of fermentation conditions for actinomycin D production by a newly isolated

*Streptomyces* sp. AH 11.4. E3 Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research. **4** (2), 29-34.

- Hodgson DA. (1992). Differentiation in actinomycete. In : Mohan S., Dow C., Cole JA. Prokaryotic structure and function. Society of General Microbiology Symposium 47. (Eds), Cambridge University Press, pp. 407-440.
- Hopwood DA., Bibb MJ., Chater KF., Kieser T., Bruton CJ., Kieser HM., Lydiate DJ., Smith CP., Ward JM., Schrempf H. (1985). Genetic Manipulation of *Streptomyces* : A Laboratory Manual. Norwich, UK : John Innes Foundation.

### I

- Ivantiskay LP., Singal SM., Bibikova MV., Vostrov SN. (1978). Direct isolation of *Micromonospora* on selective media with gentamicin. Antibiotiki. **23**, 690-692.

### J

- Jacob J., Rajendran RU., Priya SH., Purushothaman J., Saraswathy Amma DKBN. (2017). Enhanced antibacterial metabolite production through the application of statistical methodologies by a *Streptomyces nogalater* NIIST A30 isolated from Western Ghats forest soil. Plos one. **12** (4), 21.

### K

- Katarou V. (1974). Méthodes cybernétiques et technologie chimique. Edition : MIR. Moscou : 98p.
- Keharom S., Mahachai R., Chanthai S. (2016). The optimization study of  $\alpha$ -amylase activity based on central composite design-response surface methodology by dinitrosalicylic acid method. International Food Research Journal. **23** (1), 10-17.
- 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 de Microbiologie Appliquée. Université Mentouri- Constantine, Faculté des sciences de la nature et de la vie, Constantine, 176p.
- Klein A. (2012). Jean-Paul Vuillemin (1861-1932) : l'inventeur nancéien du concept d'antibiotique. Le Pays Lorrain. 55-60.
- Kuehl RO. (2000). Design of experiments : statistical principles of research design and analysis. Edition : Duxbury Press. Pacific Grove : 666p.

- Kushner D.J. (1978). - Life in high salt and solute concentrations : halophilic bacteria, In Kushner D.J. (Eds), Microbial life in extreme environments, United Kingdom, Academic Press, London : pp. 317-368.

### L

- Larpent JP., Sanglier JJ. (1989). Biotechnologie des antibiotiques. Edition : Masson. Paris : 481p.
- Lebrihi A., Lefebvre G., Germain P. (1988). Carbon catabolite regulation of cephamycin C and expandase biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. Appl Microbiol Biotechnol. **28**, 44-51.
- Lechevalier HA., Lechevalier MP. (1967). Biology of actinomycetes. Annu. Rev. Microbiol. **21**, 71-100.
- Lechevalier MP. (1988). Actinomycetes in agriculture and forestry. In : Goodfellow M., Williams ST., Mordarski M. (Eds), Actinomycetes in biotechnologie, Academic press, San diego (californie), pp. 58-327.
- Levin L., Forchiassin F., Viale A. (2005). Ligninolytic enzyme production and dye decolorization by *Trametes trogii* : application of the Plackett–Burman experimental design to evaluate nutritional requirements. Process Biochemistry. **40**, 1381-1387.
- Lewis G., Mathieu D., Phan-Tan-Luu R. (1999). Pharmaceutical Experimental Design. Edition : Marcel Dekker. New York, USA : 498p.
- Lohr D., Buschulte T., Gilles ED. (1989). Continuous cultivation of *Streptomyces tendae* in different media. Appl Microbiol Biotechnol. **32**, 274-279.
- Lounès A, Lebrihi A, Benslimane C, Lefebvre G., Germain P. (1995). Glycerol effect on spiramycin production and valine catabolism in *Streptomyces ambofaciens*. Current Microbiology. **31**, 304-311.

### M

- Mander P., Choi YH., Seong JH., Na BH., Cho SS., Lee HJ., Yoo JC. (2013). Statistical optimization of a multivariate fermentation process for enhancing antibiotic activity of *Streptomyces* sp. CS392. Archives of Pharmacal Research. **36**, 973–980.
- Margesin R., Schinner F. (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. Extremophiles. **5**, 73–83.

## Références bibliographiques

---

- Mathur S., Singh R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria- a review. *International Journal of Food Microbiology*. **105**, 281-295.
- Martin, JF., Demain AL. (1980). Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol Rev.* **44**, 230-251.
- Meunier O. (2015). Mise au point de la découverte des antibiotiques aux bactéries hautement résistantes émergentes. *Soins*. (797), 14-22.

### N

- Narayana KJP., Vijayalakshmi M. (2008). Optimization of Antimicrobial Metabolites Production by *Streptomyces albidoflavus*. *Research Journal of Pharmacology*. **2** (1), 4-7.
- Notter A. Difficultés d'industrialisation de la pénicilline (1928-1942) (Alexander Fleming, Howard Florey, Ernst Boris Chain). Communication présentée à la séance du 23 juin 1990 de la Société française d'Histoire de la Médecine. 31-38.

### O

- OMS. Résistance aux antibiotiques [en ligne]. (2016). Disponible sur : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/fr/> (consulté le 20 /02/2017).
- Ozil P. (1997). Plans d'expériences : Méthode de TAGUCHI. E.N.S d'électrochimie et d'Electrometallurgie INPG.

### P

- Pfefferle C., Theobald U. Gurtler H., Fiedler HP. (2000). Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. *Journal of Biotechnology*. **80**, 135–142.
- Piepersberg W., Distler J. (1997). Aminoglycosides and sugar components in other secondary metabolites. In : Rehn H-J, Reed G. (Eds), *Products of secondary metabolism*, 7 : VCH, Weinheim, pp.397-488.
- Piret JM., Demain AL. (1988). Actinomycetes in biotechnology : an overview In : Goodfellow M., Mordarski M., Williams ST. (Eds), *Actinomycetes in biotechnology*. Academic Press, London, pp. 461-482.

### R

- Rosenblatt-Farrell N. (2009). The Landscape of Antibiotic Resistance. *Environmental Health Perspectives*. **117** (6), 245-250.
- Ross A., Schugerl K. (1988). Tetracycline production by *Streptomyces aureofaciens*: the time of lag production. *Appl Microbiol Biotechnol*. **29**,174-80.

### S

- Sabaou N., Boudjella H., Bennadji A., Moustefaoui A., Zitouni A., Lamari L., Bennadji H., Lefévre G., Germain P. (1998). Les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes, rares producteurs d'antibiotiques. *Sécheresse*. **9** (2), 147-153.
- Sadou G. et Sadou MC. (1991). Les plans l'experiences et l'expérimentation à l'assurance qualité. Edition : Afnor technique. 90p.
- Sanchez S., Demain AL. (2002). Metabolic regulation of fermentation processes. *Enzyme and Microbial Technology*. **31**, 895-906.
- Sathiyarayanan G., Gandhimathi R., Sabarathnam B., Seghal Kiran G., Selvin J. (2014). Optimization and production of pyrrolid one antimicrobial agent from marine sponge-associated *Streptomyces* sp. MAPS15. *Bioprocess Biosyst Eng*. **37**, 561–573.
- Seo G., Kim J., Choi D. (2010). Antibiotic Production from *Streptomyces fradiae* SF-12 using Wasted Crude Vegetable Oil as an Energy Source. *J Adv Engin Technol*. **3**(3), 251- 254.
- Shirling EB., Gottlieb D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal Of Systematic Bacteriology*.**16** (3), 313-340.
- Shirling EB., Gottlieb D. (1976). Retrospective evaluation of International *Streptomyces* Project taxonomy criteria, In : *Actinomycetes the boundary microorganisms*. (Eds), Arai T, Tokyo, pp. 9-42.
- Shivakumar HN., Patel R., Desai BG. (2008). Formulation Optimization of Propranolol Hydrochloride Microcapsules Employing Central Composite Design. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. **70**, (3), 408-413.
- Singh LS., Mazumder S., et Bora T. C. (2009). Optimisation de la croissance se de laproduction de métabolite bioactive par *Streptomyces tanashiensis* souche A2D, une actinomycète alcaliphile et tolérant au sel. *J. Mycol. Méd*. **19**, 225-233.

## Références bibliographiques

---

- Singh LS., Sharma H., Talukdar NC. (2014). Production of potent antimicrobial agent by actinomycete, *Streptomyces sannanensis* strain SU118 isolated from phoomdi in Loktak Lake of Manipur, India. BMC Microbiology. **14**, 278-290.
- Solecka J., Zajko J., Postek M., Rajnisz A. (2012). Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes. Central European Journal of Biology. **7**(3), 373-390.
- Spizec J., Tichy P. (1995). Some aspects of Over production Secondary Metabolites. Folia Microbiol. **40** (1), 43-50.
- Sujatha P., Bapi Raju KVVSN., Ramana T. (2005). Studies on a new marine streptomycete BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Microbiological Research. **160**, 119-126.
- Supong K., Suriyachadkun C., Pittayakhajonwut P., Suwanborirux K., Thawai C. (2013). *Micromonospora spongicolasp.* nov, an actinomycete isolated from a marine sponge in the Gulf of Thailand. The Journal of Antibiotics. 1-5.

### V

- Valan Arasu M., Duraipandiyan M., Agastian P., Ignacimuthu S. (2009). In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India) Activité antimicrobienne in vitro de *Streptomyces* sp. ERI-3 isolé du sol rocheux du Ghats occidental (Inde). Journal de Mycologie Médicale. **19**, 22-28.
- Velayudham S., Murugan k. (2015). Sequential optimization approach for enhanced production of antimicrobial compound from *Streptomyces rochei* BKM-4. South Indian Journal of Biological Sciences. **1**(2), 72-79.
- Vijayabharathi R., Devi PB., Sathyabama S., Bruheim P., Priyadarisini VB. (2012). Optimization of resistomycin production purified from *Streptomyces aurantiacus* AAA5 using response surface methodology. J Biochem Tech. **3**(4), 402-408.

### W

- Wang YH., Feng JT., Zhang Q., Zhang X. (2008). Optimization of fermentation condition for antibiotic production by *Xenorhabdus nematophila* with response surface methodology. Journal of Applied Microbiology. **104**, 735-744.

## **Références bibliographiques**

---

- Williams ST., Goodfellow M., Alderson G. (1989). Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici. In: Williams ST., Sharpe ME., Holt JG. (Eds), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 4. Williams and Wilkins Co, Baltimore, pp. 2452-2492.

### **Z**

- Zaitlin B., Watson SB. (2006). Actinomycetes in relation to taste and odour in drinking water : Myths, tenets and truths. *Water Research*. **40**, 1741-1753.
- Zhi XY., Yang LL., Wu JY., Tang SK., Li WJ. (2007). Multiplex specific PCR for identification of the genera *Actinopolyspora* and *Streptomonospora*, two groups of strictly halophilic filamentous actinomycetes. *Extremophiles*. **11**, 543-548.

***Annexes***

## Annexe I

### ❖ Matériel utilisé

- Autoclave (Biobase)
- Balance analytique (Adventurer OHAUS)
- Barreaux magnétiques
- Bec bunsen
- Boîtes de Pétri 99 mm
- Boîte de Petri 57 mm
- Bain Marie (Julabo TW12)
- Centrifugeuse (Hettich ZENTRIFUGER)
- Ecouvillons
- Erlenmeyers
- Etuve à 28 °C et à 37°C (Mettler)
- Rotavapor (Buchi Rotavapor R-114)
- Micropipette de 100 µL avec embouts plastiques
- Microscope optique (Zeiss West Germany)
- Pied à coulisse (Stinlesse Hardend)
- Pipettes Pasteur
- Plaque chauffante agitatrice (VELP SCientifica)
- Spatule
- Tube à essais et tube à hémolyse
- Plaque agitatrice (Heidolph VIBRAMAX 100)
- Vortex (VELP scientifica référence : ZX3)

## Annexe II

## Composition des milieux de culture

## ❖ Milieu Gause (Ivantiskaya et al. 1978)

- Amidon .....20 g
- $K_2HPO_4$ .....0,5 g
- $KNO_3$ .....1 g
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ .....0,5 g
- $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ .....0,01 g
- Agar.....20 g
- $H_2O$ .....1000 mL
- pH.....7,4±0,2

## ❖ Milieu Muller-Hinton

- Infusion de viande.....300 g
- Hydrolysate de caséine.....17,5 g
- Amidon.....1,5 g
- Agar.....17 g
- Eau distillée.....1 L
- pH.....7,4

## ❖ PCA

- Peptone de caséine.....5,0 g
- Extrait de levure ..... 2,50 g
- Glucose..... 1,0 g
- Agar.....15 g
- pH ..... 7,0

Table de Student (Goupy, 1999 et Ozil 1997)

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

## Table de Fisher (Goupy, 1991 et Ozil, 1997)

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

F0.95 pour la distribution F

$v_1$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	$\infty$
→ $v_1 \downarrow$																
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
$\infty$	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

 $v_1$  degrés de liberté au numérateur $v_2$  degrés de liberté au dénominateur

## Résumé

L'optimisation de la production des métabolites bioactifs d'une souche d'actinobactérie isolée d'un sol saharien (Sebkha) dans la région de Bechar a été étudiée. Sur la base des caractéristiques morphologiques, la souche D2 a été rattachée au genre *Streptomyces*. L'évaluation des propriétés antimicrobiennes de l'isolat D2, cultivé sur milieu Gausse, vis-à-vis de bactéries à Gram positif et négatif et une levure pathogène, par la méthode des puits a montré des activités à large spectre. L'étude des cinétiques de croissance et de production des substances inhibitrices a révélé que la croissance et la production maximale de la souche D2 sont respectivement au deuxième et au huitième jour d'incubation. 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 D2 vis-à-vis de *Listeria innocua*. Les résultats obtenus montrent que les facteurs influençant l'activité antibactérienne sont le pH, la concentration en amidon et le temps d'incubation. L'activité optimale délimitée par ce modèle et retenue pour des raisons économiques, est de 32 mm pour un temps d'incubation de 5 jours, un pH de 8.04 et une concentration en amidon de 6 g/L.

**Mots-clés :** Optimisation, Actinobactérie, *Streptomyces*, Plan Plackett et Burman, Molécules bioactives, Plan composite centré, Méthodologie de la surface de réponse.

## Abstract

The optimization of bioactive metabolites production from actinobacteria strain isolated from Saharan soil (Sebkha) situated in Bechar region, was studied. On the basis of the morphological characteristics, strain D2 was attached to the genus *Streptomyces*. The evaluation of the antimicrobial properties of the D2 isolate against gram-positive and negative bacteria and pathogenic yeast by the well method, showed broad spectrum activities. The study of the growth kinetic and the inhibiting substances production, revealed that the growth and maximum production of the D2 strain occurred on the second and the eighth incubation day, respectively. The Plackett and Burman and the central composite design were used to optimize the production of bioactive molecules produced by D2 strain against *Listeria innocua*. The obtained results showed that the factors influencing antibacterial activity are pH, starch concentration and incubation time. The optimum activity delimited by this model, for economic reasons, is 32 mm for an incubation time of 5 days, a pH of 8.04 and a starch concentration of 6 g / l.

**Keywords :** Optimization, Actinobacteria, *Streptomyces*, Plan Plackett and Burman, Bioactive compound, Central Composite design, Response surface methodology.