

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

Faculté des Sciences et de la Nature et de la Vie.

Département de Microbiologie.

Filière: Biologie.

Spécialité: Biotechnologie Microbienne.



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

MASTER

Thème

**Optimisation du rendement de réduction
du cuivre par une souche d'actinomycète
par le biais d'un plan composite centré**

Présenté par:

M^{elle} NAIT IDIR NESRINE & M^{elle} MAHROUCHE NABILA

Soutenu le: 18 Juin 2016

Devant le jury composé de:

Melle DJINNI Ibtissem	MCB	Présidente
Mme ARKOUB_DJOUDI Warda	MCB	Encadreur
Melle BOUKTIT Nadia	MAA	Examineur

Année universitaire : 2015/2016

Remerciements

Avant tous, nous tenons à remercier ALLAH

qui nous a apporté toute puissance, de nous avoir accordé la force et le courage pour accomplir ce modeste travail.

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer nos remerciements et notre profonde gratitude à notre promotrice M^{me} Arkoub Warda pour son aide et ses conseils. et aux membres de jury, M^{lle} Djinni Ibtissem présidente et M^{lle} Bouktit examinatrice.

Nos sincères remerciements vont également à toute l'équipe du laboratoire de microbiologie en particulier M^{lle} Badria—aux membres de la bibliothèque et de l'administration pour leur patience et leurs disponibilités.

Nos remerciements vont à tous nos amis, et en particulier ceux de notre promotion (2015 -2016).

Enfin, nous remercions pour tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Nesrine et Nabila.

Dédicaces

Tout d'abord je remercie ALLAH tous puissant qui m'a permit de suivre

Mes études et m'a muni de volonté, force et patience afin de réaliser ce travail

A mes chers parents source de tendresse, de volonté, et de patience.

Mes yeux à travers lesquels j'ai vu et je vois ce monde.

Je vous remercie d'être toujours à mes cotés de me soutenir, aimer,

protéger et pour tous ce que vous avez fait pour moi.

A mes frères

A mes sœurs

A mes neveux

A tout mes amies : Amina, Hanane, Islam, Katia, Nabila, Omar, Sabah, Sabrina, Rafiq, Walid

Et Pour tous qui me connaît de près ou de loin.

Nesrine.

DEDICACES

Quand il y a le souci de réaliser un dessein

Tout devient facile pour arriver à nos fins

Malgré les obstacles qui s'opposent

En dépit des difficultés qui s'interposent

Les études sont avant tout

Notre unique et seul atout

Je dédie ce mémoire à ...

Mes très chers parents à qui je dois ce que suis devenue aujourd'hui, vous représenter pour moi la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et me soutenir de tous les instants.

A mes très chères sœurs et toute ma famille

A Mme Arkoub, notre promotrice et Mlle Djinni comme co-promotrice, un remerciement particulier et sincère pour tous vos efforts fournis, que ce travail soit un témoignage de notre gratitude et notre profond respect.

A tous mes amis (es) de la promotion 2015-2016

A tous mes amis (es) à la résidence, en particulier ma chère et mon binôme Nesrine en témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments qu'on a partagé

Je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

Nabila



Sommaire

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

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

CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralités sur les actinomycètes.....	2
---	---

I.1. Critères d'identification des actinomycètes	3
--	---

I.1.1 Critères morphologiques	4
-------------------------------------	---

I.1.2. Critères chimiques.....	4
--------------------------------	---

I.1.3. Critères physiologiques	5
--------------------------------------	---

I.1.4. Critères moléculaires	5
------------------------------------	---

I.2. Taxonomie des actinomycètes	5
--	---

I.3. Cycle de développement du genre <i>Streptomyces</i>	5
--	---

I.4.1. En agronomie	6
---------------------------	---

I.4.2. Dans les domaines biotechnologique, médical et vétérinaire.....	6
--	---

II. Résistance des actinomycètes aux métaux lourds.....	7
---	---

III. Les plans d'expériences	8
------------------------------------	---

III.1. Définition.....	8
------------------------	---

III.2. La modélisation	8
------------------------------	---

III.3. Matrice d'expérience	8
-----------------------------------	---

III.4. Modèle polynomial du premier degré	9
---	---

III.5. Modèle polynomial du second degré	9
--	---

III.5.1. Plan composite centré.....	9
-------------------------------------	---

III.6. Modèle mathématique postulé	10
--	----

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

I. Matériel.....	11
------------------	----

I.1. Matériel analytique.....	11
-------------------------------	----

I.2. Matériel biologique.....	11
-------------------------------	----

I.2.1. Microorganismes étudiés	11
--------------------------------------	----

I.2.2. Revivification et repiquage des souches	11
--	----

II. Méthodes.....	11
-------------------	----

II.1. Mise en évidence de la résistance des isolats d'actinomycètes aux métaux lourds.....	11
--	----

II.2. Mise en évidence de la réduction des métaux lourds sur milieu liquide par les isolats sélectionnés.....	12
II.3. Etude morphologique de la souche sélectionnée	12
II.3.1. Critères macromorphologiques.....	13
II.3.2. Critères micromorphologiques.....	13
II.4. Modélisation de la réduction des métaux lourds par la souche sélectionnée.....	13

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

I. Mise en évidence de la résistance des actinomycètes aux métaux lourds.....	15
II. Mise en évidence de la réduction des métaux lourds par les souches d'actinomycètes sélectionnées.....	17
III. Etude des caractères morphologiques de la souche sélectionnée	18
III.1. Caractères macromorphologiques.....	18
III.2. Caractères micromorphologiques	20
IV. Modélisation de la réduction des métaux lourds par la souche sélectionnée	21
IV. 1. Elaboration du plan factoriel de premier degré.....	21
IV .1.1. Calcul des coefficients du modèle du premier degré	22
IV.2. Analyse statistique de l'équation de régression	23
IV.2.1. Test de validation de l'équation de régression	24
IV.3. Elaboration du modèle de second degré	26
IV.3.1. calcul des coefficients du modèle	26
IV.3.2. Analyse statistique de l'équation de régression	27
IV.4. Optimisation.....	29
Conclusion.....	34

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Figure N°	Titre	Page
1	Morphologie des actinomycètes dans le milieu liquide (Alonso, 2007)	3
2	Cycle de développement du genre <i>Streptomyces</i> (Hopwood et al., 1985).	6
3	Carte thermique du criblage des 19 souches d'actinobactéries à la résistance ou la sensibilité aux métaux lourds.	15
4	Mise en évidence de la résistance des souches sélectionnées d'actinobactéries sur les métaux lourds	17
5	Croissance de la souche SCA12 sur les milieux : BN-Cu et BN-Zn respectivement	17
6	Macromorphologie de la souche SCA12 sur les milieux de culture additionnés de métaux lourds après 7 jours d'incubation à 28°C	20
7	Observation de la souche SCA12 sous la loupe binoculaire sur les milieux NA-Zn (1), NA-Cu (2), NA-Cr (3) et NA-Fe (4)	20
8	Observation au microscope optique de la souche SCA12(GX10) incubée pendant 7 jours à 28°C	21
9	Surface de réponses pour $x_3=0$	30
10	Courbes isoréponses pour différents niveaux de x_3	32

Tableau N°	Titre	Page
I	Matrice d'expériences pour trois facteurs	9
II	Valeurs extrêmes des paramètres opératoires étudiés	13
III	Matrice d'expériences pour trois paramètres $k=3$ et $N_f=2^k=8$	14
IV	Expériences du plan en étoile	14
V	Rendements de réduction des métaux lourds par les souches sélectionnées	18
VI	Caractéristiques macromorphologiques de la souche SCA12 après 7 jours d'incubation sur différents milieux en présence de métaux lourds à 28°C.	19
VII	Matrice des expériences pour trois paramètres $k = 3$ et $N = 8$	22
VIII	Rendements de réduction du cuivre au centre du domaine d'étude.	22
IX	Valeurs des coefficients de l'équation de régression	23
X	Valeurs de t_j	24
XI	Résultats du plan en étoile ($N_a = 2k = 6$)	26
XII	Valeurs des coefficients du modèle de second degré	27
XIII	Valeurs de t_j	27

BN-Zn : Bouillon nutritif-Zinc

BN-Fe : Bouillon nutritif-Fer

BN-Cu :Bouillon nutritif-cuivre

DAB : Acide diaminobutyrique

HPLC-MS : Hight Performance Liquid Chromatography- Mass Spectrometry

ISP : International *Streptomyces* Project

LL-DAP : Acide 2,6-diaminopimélique

MA : Mycélium Aérien

MS : Mycélium du Substrat

NA-Cd :Nutrient Agar- Cadmium

NA-Cr :Nutrient Agar-Chrome

NA-Cu : Nutrient Agar- Cuivre

NA-Fe :Nutrient Agar-Fer

NA-Mélange : Nutrient Agar- (Chrome,Cuivre,Cadmium,Fer, Zinc)

NA-Zn : Nutrient Agar-Zinc

SAA : Spectrophotométrie d’Absorption Atomique

SCA : Amidon Caséine Agar



Introduction

Les métaux lourds sont les polluants les plus fréquemment rencontrés dans les sols. Ils constituent une menace sur l'environnement et des risques sur la santé humaine en raison de leur effet toxique ainsi que leur accumulation tout au long de la chaîne alimentaire (Dary et *al.*, 2010). C'est pourquoi, plusieurs études ont fait l'objet de résoudre ce problème majeur par le biais de divers processus (Cimino, 2005)

La bioremédiation a acquis une crédibilité importante au cours de ces dernières années vu sa performance parfaite et du faible coût des biomatériaux mis en pratique (Yuan et *al.*, 2009). Cette approche a comme principe l'utilisation du matériel biologique y compris les microorganismes vivants adaptés pour l'élimination des métaux lourds (Malik, 2004)

Dans ce contexte, plusieurs études ont mis en évidence la capacité des souches d'actinomycètes à résister et éventuellement éliminer les métaux lourds toxiques par un mécanisme d'accumulation ou de biosorption (Amoroso, 2000 ; Polti, 2007).

Les actinomycètes constituent une partie significative de la population microbienne du sol, ainsi que des milieux marins (You et *al.*, 2005). Les actinomycètes sont connues pour être une source importante de produits d'intérêt biotechnologique à savoir les antibiotiques et les enzymes industrielles (Lam, 2006).

Dans la présente étude, nous nous sommes orientés vers le choix d'une souche d'actinomycètes sélectionnée comme résistante et réductrice des ions métalliques, et fixés comme objectif principal l'optimisation du rendement de réduction du cuivre en utilisant la méthode des plans d'expériences.

Ce mémoire comporte essentiellement trois chapitres : Le premier est consacré à une synthèse bibliographique qui portera sur des généralités sur les actinomycètes et leurs résistances en présence des métaux lourds ainsi que des notions fondamentales relatives aux plans d'expériences.

Le deuxième chapitre traite l'ensemble des méthodes expérimentales utilisées à savoir le criblage des souches d'actinomycètes étudiées ainsi que la mise en évidence de leurs résistances aux métaux lourds et leur capacité à réduire ces derniers, suivi de l'étude des caractères morphologiques des souches. Toutes les conditions expérimentales utilisées pour la modélisation du rendement de réduction du cuivre par la souche sélectionnée seront exposées.

Le troisième chapitre retrace et discute les résultats obtenus au cours de cette étude.

Enfin, nous terminons ce travail par une conclusion générale qui résume les principaux résultats que nous avons obtenus.

I. Généralités sur les actinomycètes

Les actinomycètes sont rattachés à l'ordre des *Actinomycetales* créés par Buchanan en 1917, leur capacité à se ramifier, permet la formation d'un réseau appelé mycélium ramifié assimilé à celui élaboré par les moisissures auxquels ils furent longtemps rattachés, ce qui explique cette nomination empruntée du grec, " **Actys**" (rayon) et " **mykes**" (champignon) (Holt *et al.*, 1994). L'étude de leur organisation cellulaire a permis de les classer comme bactéries à Gram positif.

La plupart des actinomycètes possèdent la propriété de sporuler, cependant le mode de sporulation diffère d'un genre à un autre et constitue un critère de classification. La composition de la majorité des espèces affiliées à ce groupe en Guanine-Cytosine, dans leur ADN, est relativement importante (> 55%), (Goodfellow et Cross, 1983 ; Sanglier et Trujillo, 1997).

L'ordre des *Actinomycetales* comprend des genres ayant une morphologie très diversifiée, allant de la forme cocci (*Micrococcus*) ou bâtonnet-cocci (*Arthrobacter*) en passant par ceux formant des hyphes qui se divisent (*Nocardia*, *Rhodococcus*) et ceux qui possèdent un mycélium persistant et bien différencié (*Streptomyces*, *Actinomadura*, *Micromonospora*, *etc.*) (Oskay *et al.*, 2004 ; Srivibool et Sukchotiratana, 2006).

Les actinomycètes sont des eubactéries chimio-organotrophes hétérotrophes, aérobies strictes ou microaérophiles. La majorité sont saprophytes ou commensales, on y trouve quelques-unes pathogènes (*Actinobacterium israeli*), mésophiles en général d'autres thermophiles (*Micropolyspora faeni*) produisant des spores immobiles ou parfois mobiles. (Omura, 1992 ; Conn, 2005 et Hayakawa, 2008).

En milieu solide, les colonies d'actinomycètes sont plus ou moins pigmentées ayant plusieurs aspects macroscopiques regroupés en trois types (Lechevalier *et al.* ; 1985) :

- Des colonies poudreuses habituellement couvertes d'hyphes aériens fermement attachés au milieu.
- Des colonies pâteuses rugueuses ou lisses qui peuvent être facilement détachées des milieux solides.
- Des colonies exemptes de mycélium de substrat et se composent d'hyphes aériens attachés au milieu par des crampons

Quant au milieu liquide, ces bactéries peuvent se présenter sous différents aspects : filaments libres ou ramifiés qui s'agrègent formant ainsi des pelotes hérissées, ou allongées (figure1), cette diversité est dépendante des conditions de culture (Belyagoubi, 2014).

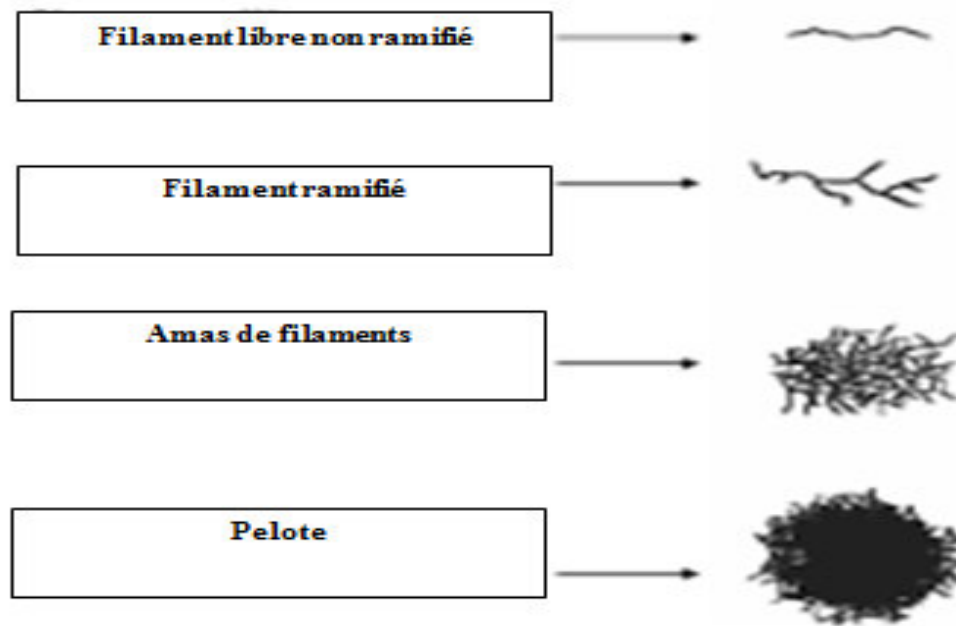


Figure 1 : Morphologie des actinomycètes dans le milieu liquide (Alonso, 2007)

Les actinomycètes sont universellement répandus ; ils sont retrouvés dans différentes niches écologiques : dans les sols alcalins et les sols riches en matières organiques (Loqman, 2009). Ils sont à l'origine des odeurs caractéristiques du sol suite à la production de différents métabolites telle que la géosmine (Madigan et Martinko, 2007). Ils ont également été isolés à partir de l'air et de nombreux habitats aquatiques (Madigan et Martinko, 2007). D'autres genres d'actinomycètes préfèrent des environnements spécifiques comme les *Micromonospora* qui sont abondants dans les lacs, les *Actinomyces* et les *Nocardia* préfèrent les cavités des hommes et des animaux, et les *Thermoactinomyces* qui se retrouvent généralement dans les sources hydrothermales (Madigan et Martinko, 2007).

I.1. Critères d'identification des actinomycètes

La définition des genres et des espèces repose sur différentes approches taxonomiques : morphologiques, physiologiques, chimiques et moléculaires (Smaoui, 2010).

I.1.1. Critères morphologiques

I.1.1.1. Critères macromorphologiques

L'aspect phénotypique et les caractères cultureux sont déterminés sur des milieux de cultures spécifiques « International *Streptomyces* Project » (ISP) :

- La présence, l'abondance, la couleur et l'aspect des hyphes du mycélium aérien (MA) et /ou du mycélium du substrat (MS).

- La production et la couleur des pigments solubles dans le milieu de culture (Nouredine, 2006 ; Boudjella *et al.*, 2007).

I.1.1.2. Critères micromorphologiques

Une observation microscopique contribue à une identification selon les critères importants suivants :

- Présence de spores en divisant certains hyphes pour former des conidies, leur nombre, taille, mobilité, forme, agencement (isolément ou en courtes/longues chaînes), et l'ornement de leurs surfaces (lisse, rugueuse, épineuses, ou duveteuse).
- Formation d'endospore de haute résistance à la chaleur (*Thermoactinomyces*).
- La fragmentation du mycélium du substrat (MS).
- Apparition d'autres structures particulières : sclérote (*Chainia*), des sporanges (*Actinoplanes*, *Streptosporangium*) ou de synnémata (*Actinosynnema*), (Demain et Solomon, 1986).

I.1.2. Critères chimiques

Etablir la composition chimique de la paroi constitue une démarche pour différencier les genres d'actinomycètes.

Composition pariétale en acides aminés et sucres caractéristiques

La paroi cellulaire des actinomycètes est composée soit de l'isomère LL-DAP (acide 2,6-diaminopimélique) contenu dans les glycoprotéines chez les *streptomyces* et les genres apparentés, soit de l'isomère méso (DL) rencontrée chez d'autres.

Cet acide aminé caractérisant des actinomycètes peut être remplacé par la lysine, l'ornithine ou même le DAB = Acide diaminobutyrique (Becker *et al.*, 1965).

Quant aux glucides, c'est en fonction des couples « arabinose-xylose », « arabinose-galactose », « rhamnose-galactose » et le « madurose » que les actinomycètes sont classés en quatre groupes majeurs montrés dans le tableau I (Annexe I), (Becker *et al.*, 1965 ; Lechevalier et Lechevalier, 1970).

Acides gras et phospholipides

Les lipides polaires les ménaquinones et les acides mycoliques sont trois groupes de lipides considérés comme les plus importants d'un point de vue taxonomique distinctifs des genres tels que *Nocardia*, *Mycobacterium* et *Rhodococcus*. suite ou reformi

La présence d'un ou de deux phospholipides constitue également un élément de caractérisation, ce qui a permis de donner cinq chimiotypes (Lechevalier *et al.*, 1977) (annexe I).

I.1.3. Critères physiologiques

Il s'agit de réaliser des tests de dégradation de différents composés de nature glucidiques, lipidiques, protidiques, polymères complexes, stéroïdes...etc. Ainsi que d'autres tests qui peuvent intervenir dans la détermination des espèces, comme la résistance aux agents antimicrobiens (antibiotiques), chimiques (métaux lourds), biochimiques et aux variations des conditions extrêmes (température, pH et salinité (NaCl), (Goodfellow *et al.*, 1990).

I.1.4. Critères moléculaires

Cette approche se base sur trois procédés :

- Détermination du coefficient de Chargaff ou GC% (Stackebrandt *et al.*, 1981b).
- Le taux d'hybridation ADN / ADN ou ADN - ARN (Wayne *et al.*, 1987).
- Séquençage des ARN ribosomiaux 16 (Larpent et Larpent-Gourgaud, 1985 b).

I.2. Taxonomie des actinomycètes

Les actinomycètes appartiennent au phylum *Actinobactéria* qui comprend 5 classes, 15 ordres, 43 familles et 203 genres. Cette répartition s'est basée sur l'étude des critères cités ci-dessus selon Goodfellow (2012).

I.3. Cycle de développement du genre *Streptomyces*

Les actinomycètes du genre *Streptomyces* présentent un cycle biologique cellulaire asexué similaire à celui des champignons imparfaits. Il débute par la germination d'une spore qui donne naissance à un mycélium végétatif formé d'hyphes ramifiés, un mycélium aérien secondaire se développe sur ce mycélium végétatif en utilisant ce dernier comme substrat (figure 2). En effet, le mycélium végétatif s'autolyse et les produits de la lyse sont utilisés par le mycélium aérien. La croissance des hyphes est apicale (se fait par le sommet) et s'accompagne de la formation de septa. Les cellules se différencient ensuite pour former des spores pigmentés en général (Kim *et al.*, 2004).

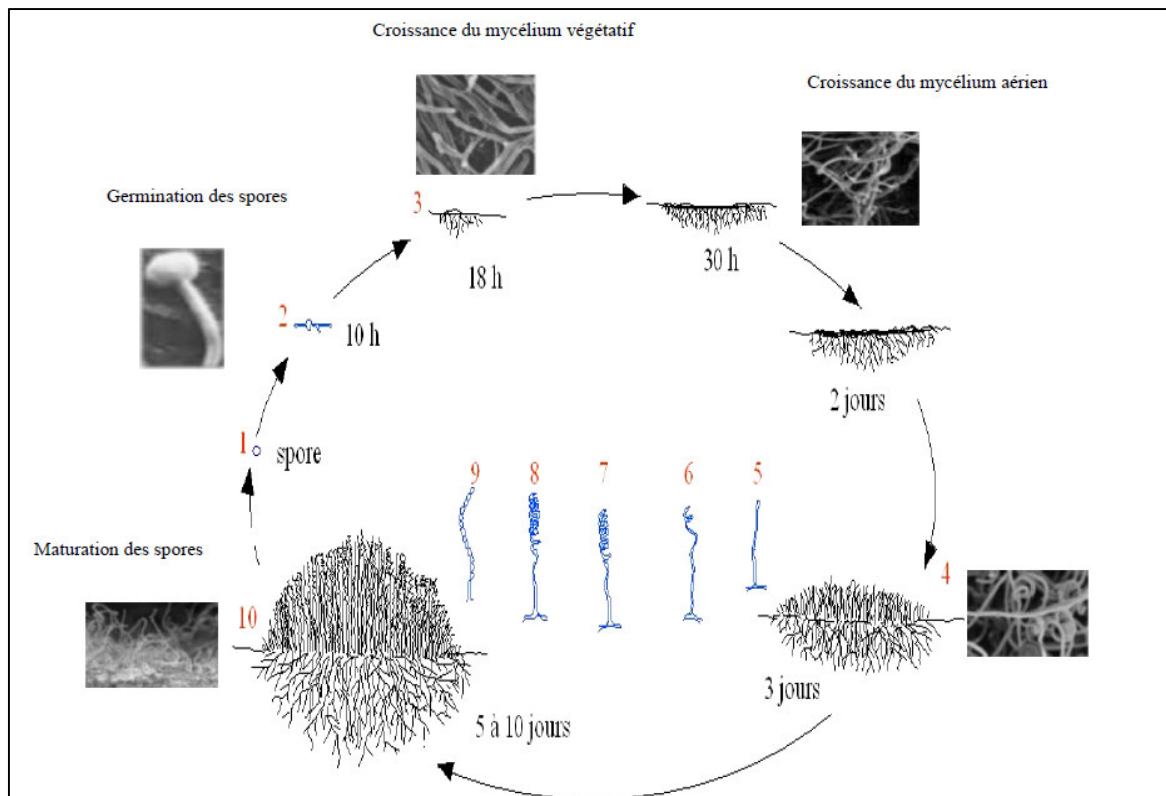


Figure 2 : Cycle de développement du genre *Streptomyces* (Hopwood *et al.*, 1985).

I.4. Importance des actinomycètes

I.4.1. En agronomie

Les actinomycètes produisent une large gamme d'enzymes hydrolytiques ayant en principe comme fonction la décomposition de la matière organique et la transformation des composés organiques complexes comme la lignocellulose, l'hémicellulose, la pectine et la chitine (Abou-Elala et Ghanem, 2005 ; Pizzul, 2006 ; Vijiyakumar *et al.*, 2007).

Au niveau de la rhizosphère, les actinomycètes agissent en symbiose avec les racines des plantes d'une manière directe par la solubilisation du phosphore, la fixation d'azote et la production de phytohormone (Goodfellow, 1983).

I.4.2. Dans les domaines biotechnologique, médical et vétérinaire

Les actinomycètes ont été commercialement exploités pour la production de produits pharmaceutiques et nutritionnels. En effet, la production d'enzymes par le genre *Streptomyces* a révélé un potentiel biotechnologique intéressant. En plus de la production d'enzymes, les actinomycètes produisent d'autres métabolites secondaires dotés d'une large gamme d'activités, tels que les vitamines, les herbicides, les pesticides, les antibiotiques, les antiviraux ou encore les antiparasitaires (Oskay *et al.*, 2004).

II. Résistance des actinomycètes aux métaux lourds

Les métaux lourds tels que le zinc, le cadmium, le cuivre, le chrome, le fer et le plomb sont présents de façon naturelle dans les sols. Ils proviennent en grande partie de l'altération de la roche mère. Toutefois, les concentrations les plus importantes de métaux lourds dans les sols sont liées à l'activité humaine: stockage de déchets industriels et urbains (mines et fonderies de métaux non ferreux, décharges publiques); pollution dues à des retombées atmosphérique (essence ou plomb, poussière des industries métallurgique, incinération des ordures ménagères...) (Belanger 2009).

Généralement, les métaux lourds se trouvent sous forme de traces ayant une densité supérieure à 6 g/cm³. Ils sont indispensables pour les réactions métaboliques et fonctionnent d'ordinaire comme un centre coordinateur de la structure et de la stabilité des enzymes et des protéines (Behrouz, 1995). Ils sont considérés aussi comme éléments toxiques à des concentrations élevées (Monchy, 2007). Leur toxicité vis-à-vis du monde vivant varie selon plusieurs facteurs, principalement la forme sous laquelle se trouvent l'élément et les espèces cibles (Behrouz, 1995).

Dans le but de minimiser les risques des métaux lourds, différents processus ont été mis en place y compris le traitement biologique qui, consiste à utiliser des microorganismes ayant une résistance vis-à-vis des métaux lourds (Hamedi *et al.*, 2015). Pour cela, plusieurs travaux ont fait l'objet d'étudier l'élimination des métaux lourds tel que le plomb par les microorganismes vivants sous l'influence de plusieurs paramètres opératoires à savoir la concentration du métal, le temps de contact, la vitesse d'agitation, effet du pH, effet de la température et enfin de la force ionique (Boulkrah, 2008).

Les actinomycètes sont connus pour être des agents très importants dans la bioremédiation, dû à plusieurs caractéristiques métaboliques et de croissance, comme la formation du mycélium, la capacité de coloniser rapidement différents substrats, mais également comme étant une source de production de plusieurs substances d'intérêts biotechnologiques comme les antibiotique, les enzymes, les molécules bioactives (Daboor *et al.*, 2014).

Plusieurs études ont montré l'efficacité de certaines souches d'actinomycètes dans le traitement biologique et l'élimination des métaux lourds (Hozzein *et al.*, 2012). En se basant sur d'autres axes, une étude a montré que l'élimination de des métaux lourds par l'espèce *Streptomyces chromofuscus* s'effectue par une réaction d'adsorption dépendante du pH et indépendante de l'âge de la souche (Daboor *et al.*, 2014), ainsi que par l'accumulation de ces

derniers avec une concentration minimale inhibitrice de $0.55 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ pour le plomb, $0.15 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ pour le chrome, et $0.10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ pour le zinc et le cuivre (El Baz *et al.*, 2015).

La concentration en métaux lourds auquel peut résister les actinomycètes diffère pour chaque genre. En effet, les expériences effectuées sur l'espèce *Streptomyces*, *Nonomuraea* ont montré une résistance de cette dernière à des teneurs élevées en ZnSO_4 , CuSO_4 , CdN_3O_6 , NiCl_2 (Hamedi *et al.*, 2015).

III. Les plans d'expériences

III.1. Définition

Un plan d'expérience est une stratégie optimale d'organisation d'un nombre minimal d'essais permettant de prédire avec le maximum de précision une réponse de manière efficace et économique (Ozil, 1997).

Le principe de la méthode des plans d'expériences est basé sur la détermination des liens existants entre deux types de variables :

Réponse : grandeur de sortie ou grandeur étudiée.

Facteurs : grandeurs physiques modifiables par l'expérimentateur, sensées influencer sur les variations de la réponse (Goupy, 2005).

III.2. La modélisation

La modélisation est considérée comme principal objectif d'un plan d'expérience, elle consiste après identification des facteurs influents à déterminer la forme de cette influence ainsi que l'équation correspondante aux variations du phénomène étudié en fonction des facteurs influents (Goupy *et al.*, 1999).

La réponse expérimentale peut être écrite sous forme :

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

Y : réponse expérimentale, **Z** : facteurs contrôlés, **ε** : erreur expérimentale, **f** : fonction inconnue (modèle théorique) des facteurs influents contrôlés.

III.3. Matrice d'expériences

La matrice des expériences est un tableau de n lignes et de k colonnes, regroupant les conditions expérimentales à réaliser. Ce tableau est donc composé de +1 et de -1. Soit, par exemple, la matrice d'expériences pour trois facteurs (A, B et C) suivante (Tableau I):

N : nombre d'expériences (essais).

k : nombre de variables codées (facteurs).

Tableau I : Matrice d'expériences pour trois facteurs

	Facteur A	Facteur B	Facteur C	Réponses
Essais (N)	X ₁	X ₂	X ₃	Y
1	-1	-1	-1	y ₁
2	1	-1	-1	y ₂
3	-1	1	-1	y ₃
4	1	1	-1	y ₄
5	-1	-1	1	y ₅
6	1	-1	1	y ₆
7	-1	1	1	y ₇
8	1	1	1	y ₈

III.4. Modèle polynomial du premier degré

Plan factoriel à deux niveaux 2^k

Ce plan possède un nombre de niveaux limité à deux pour chaque facteur. On admet que la réponse est linéaire quand un facteur passe d'un niveau minimal à un niveau maximal permettant de cerner l'étude dans l'intervalle de variation du facteur (Benoit *et al.*, 1994).

Le nombre d'expériences (N) à réaliser est en fonction du nombre (k) de facteurs

$$N = 2^k$$

III.5. Modèle polynomial du second degré

III.5.1 Plans composites centrés

Les plans composites se prêtent au déroulement séquentiel d'une étude. La première partie de l'étude est un plan factoriel complet ou fractionnaire complété par des points au centre afin de vérifier la validité du modèle du premier degré (Goupy, 1999).

Le test de validation est positif si la réponse mesurée au centre du domaine est statistiquement égale à la réponse calculée au même point, et dans le cas contraire d'autres essais supplémentaires doivent être effectués pour établir un modèle du second degré (Goupy, 1999).

Le nombre total d'essais N à réaliser est la somme de :

- N_f = 2^k essais d'un plan factoriel complet.
- N_α = 2k essais en étoile sur les axes à une distance α du centre du domaine.
- N₀ essais au centre du domaine.

III. 6. Modèle mathématique postulé

Le modèle mathématique postulé utilisé avec les plans composites est un modèle du second degré avec interactions. On ne conserve, en général, que les interactions d'ordre deux.

Ainsi pour trois facteurs ($k = 3$), l'équation de régression s'écrit :

$$y = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_3 x_3 + b_{12} x_1 x_2 + b_{13} x_1 x_3 + b_{23} x_2 x_3 + b_{11} x_1^2 + b_{22} x_2^2 + b_{33} x_3^2 + \varepsilon$$



Matériels et méthodes

I. Matériel**I.1. Matériel analytique**

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

I.2. Matériel biologique**I.2.1. Microorganismes étudiés**

Dix-neuf souches d'actinomycètes sont étudiées dans ce présent travail (Annexe III). Elles appartiennent à la collection du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA) de l'université A. Mira de Bejaia. La majeure partie des isolats ont pour origine les sédiments de rivière prélevés dans la région de Ziama Mansouriah (Oued Ziama) situé à mi-chemin entre les wilayas de Bejaia et Jijel en Janvier 2015. Par ailleurs, la souche notée WR1L1S8 est endophyte d'origine marine, elle a été isolée à partir de l'algue brune *Fucus* sp. prélevée dans la région de Bejaia en 2011 (Djinni *et al.*, 2013).

I.2.2. Revivification et repiquage des souches

Les 19 isolats ont été revivifiés par repiquage sur leurs milieux d'isolement respectifs : Amidon Caséine Agar (SCA) (Williams et Kuster, 1964), Gausse (Ivantiskaya *et al.*, 1978) et le milieu Czapeck (Lawrence, 1956).

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

II. Méthodes**II.1. Mise en évidence de la résistance des isolats d'actinomycètes aux métaux lourds**

Afin d'étudier la résistance ou la sensibilité des 19 souches aux métaux lourds, ces souches sont ensemencées sur des milieux de culture à base d'agar nutritif additionnés de différents métaux lourds sous forme de sels organiques: le cadmium ($Cd_3N_2O_6$) ; le chrome ($K_2Cr_2O_7$) ; le cuivre ($CuSO_4, 5H_2O$) ; le fer ($FeN_3O_9, 7H_2O$), le zinc ($ZnSO_4, 7H_2O$) et enfin un mélange de ces derniers à raison de 50 mg/L (Daboor *et al.*, 2014).

Cette étape a pour objectif la sélection des souches d'actinomycètes présentant une meilleure croissance sur les différents milieux de culture comportant les métaux lourds. Pour cela une observation quotidienne est réalisée après 3, 7 et 14 jours d'incubation à 28°C.

L'appréciation de la résistance ou de la sensibilité des isolats testés vis-à-vis de (s) métaux lourds est traduite par la croissance ou l'absence des souches sur les milieux respectifs.

Les isolats ayant présenté une meilleure croissance sont sélectionnés pour la suite du travail.

II.2. Mise en évidence de la réduction des métaux lourds sur milieu liquide par les isolats sélectionnés

Dans le but d'étudier la capacité des isolats sélectionnés à réduire les métaux lourds testés, les souches sont ensemencées sur les milieux à base d'agar nutritifs additionnés de métaux lourds et laisser incubées pendant 7 jours à 28°C. Une fois la période d'incubation achevée, des cultures sont réalisées dans du bouillon nutritif comme suit : des cylindres d'agar de 6 mm de diamètre sont découpés stérilement, à partir des milieux précédemment préparés, à l'aide d'un emporte-pièce, puis déposés dans des Erlenmeyers de 200 ml contenant 50 ml de bouillon nutritif avec une concentration de 55 mg/l en métal lourd. Les cultures ainsi préparées sont mises à incuber à 28°C pendant 7 jours sous agitation permanente à 125rpm.

Après incubation, les cultures sont récupérées puis filtrées, à l'aide d'un papier filtre de type Whatman N°1, afin de séparer la biomasse mycélienne du milieu de culture (filtrat). Les filtrats obtenus sont par la suite stérilisés en utilisant des filtres seringues de 0.45 µm de diamètre. Le dosage des métaux lourds présents dans les filtrats de cultures des isolats sélectionnés est réalisé par Spectrophotométrie d'Absorption Atomique (SAA) qui est une méthode de dosage rapide et précise et permet la détection des éléments à l'état de traces. Cette dernière a pour principe qu'une population d'atomes à l'état fondamental E_0 peut absorber des photons d'énergie $(h \nu)$ et qu'une estimation du nombre de photons absorbés peut être relié à la concentration de l'élément dans la solution à analyser(annexe IV) (Vandegans *et al.*, 1996). L'appareil est préalablement étalonné vis-à-vis de chaque métal (Annexe V).

Le résultat de cette partie sera considéré pour la sélection de la souche la plus réductrice pour la suite de ce travail.

II.3. Etude morphologique de la souche sélectionnée**II.3.1. Critères macromorphologiques**

Cette étude consiste à déterminer la couleur des mycélia aérien et du substrat, l'aspect général des colonies ainsi que les pigments solubles produits sur les différents milieux d'agar nutritif additionnés de métaux lourds.

II.3.2. Critères micromorphologiques

L'étude de ces critères se base sur une observation microscopique, à l'aide d'un microscope optique à deux grossissements (x10 et x40), effectuée directement sur les boîtes de Pétri après 7 jours d'incubation à 28°C.

II.4. Modélisation du rendement de réduction des métaux lourds par la souche sélectionnée

Après avoir sélectionné la meilleure souche réductrice et le métal le plus réduit, on procède par un plan d'expériences de type composite centré afin de modéliser le rendement de réduction du métal en fonction de différents paramètres opératoires à savoir la concentration initiale en métal lourd (Z_1), le temps d'incubation (Z_2) et la vitesse d'agitation (Z_3) à des valeurs extrêmes regroupées dans le tableau II.

Tableau II : Valeurs extrêmes des paramètres opératoires étudiés

Paramètres opératoires	Niveaux bas (-1)	Centre (0)	Niveau haut (+1)
Z_1 (mg/l)	32.5	55	77.5
Z_2 (jours)	5	7	9
Z_3 (rpm)	87.5	125	162.5

En premier lieu, un plan factoriel du premier degré est réalisé pour évaluer les effets d'interaction des paramètres étudiés. Pour cela une matrice d'expériences est réalisée en préparant des milieux de culture à base de bouillon nutritif avec des concentrations variables en métal comme présenté dans le tableau III.

La souche sélectionnée estensemencée sur chaque milieu à raison de 5 cylindres d'agar dans 50 ml du milieu et incubée à 28°C.

Tableau III : Matrice d'expériences pour trois paramètres(k=3) et $N_f = 2^k = 8$

N	Z ₁ (mg/L)	Z ₂ (J)	Z ₃ (rpm)	x ₁	x ₂	x ₃
1	32.5	5	87.5	-1	-1	-1
2	77.5	5	87.5	+1	-1	-1
3	32.5	9	87.5	-1	+1	-1
4	77.5	9	87.5	+1	+1	-1
5	32.5	5	162.5	-1	-1	+1
6	77.5	5	162.5	+1	-1	+1
7	32.5	9	162.5	-1	+1	+1
8	77.5	9	162.5	+1	+1	+1

Note : x₁, x₂, x₃ sont les niveaux en variables centrées réduites de la concentration en métal, du temps d'incubation et de la vitesse d'agitation respectivement.

k : nombre de facteurs étudiés

N_f : nombre d'expériences du plan factoriel

Six expériences sont répétées au centre du domaine expérimental (Z₁= 55 mg/L, Z₂= 7 jours et Z₃= 125 rpm) afin de valider le modèle du premier degré.

Pour élaborer le modèle du deuxième degré, les expériences du plan en étoile présentées dans le tableau IV sont réalisées.

Tableau IV : Expériences du plan en étoile

N	Z ₁	Z ₂	Z ₃	x ₁	x ₂	x ₃
1	10	7	125	-α (-1,68)	0	0
2	100	7	125	+α (+1,68)	0	0
3	55	3	125	0	-α (-1,68)	0
4	55	11	125	0	+α(+1,68)	0
5	55	7	50	0	0	-α (-1,68)
6	55	7	200	0	0	+α(+1,68)



Résultats et discussion

Dans ce chapitre, seront présentés les résultats et les discussions relatifs à la mise en évidence de la résistance ou de la sensibilité des isolats d'actinomycètes étudiés ainsi que leurs aptitudes à réduire des métaux lourds ; et à l'influence des conditions opératoires sur le taux de réduction de ces derniers à travers la description des étapes de l'élaboration du modèle mathématique par le biais de l'utilisation de la méthode des plans d'expériences.

I. Mise en évidence de la résistance des isolats d'actinomycètes aux métaux lourds

Dix-neuf souches d'actinomycètes faisant partie de la collection du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA) de l'Université de Bejaia ont été ensemencées sur des milieux de culture à base d'agar nutritif et de métaux lourds à une concentration de 50 mg/l dans le but de mettre en évidence leur aptitude à se développer en présence de différents métaux lourds. Les isolats ont été cultivés pendant 7 jours à 28°C, et les résultats de ce criblage préliminaire sont illustrés dans la figure 3 ci-dessous.

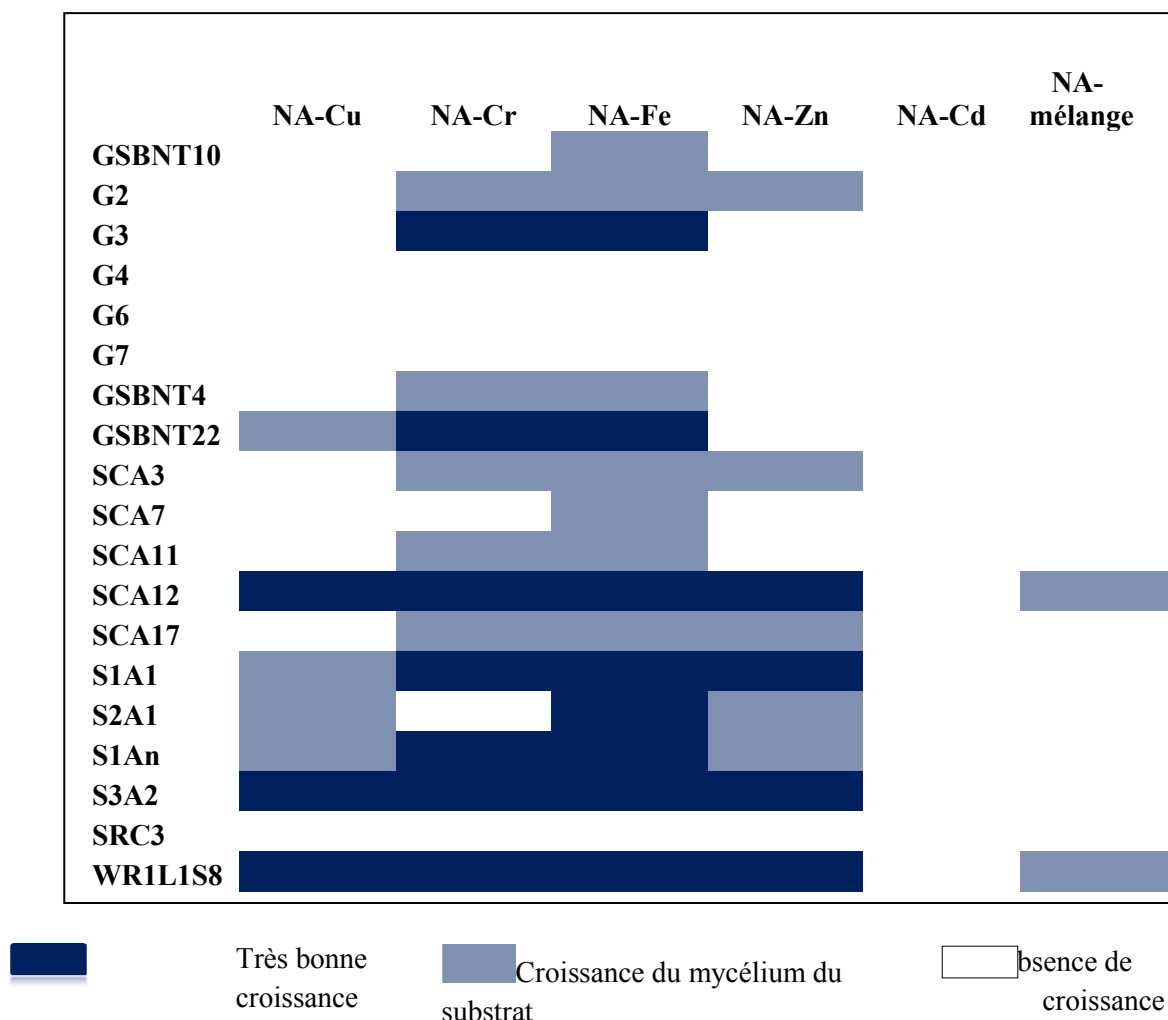


Figure 3: Carte thermique du criblage des 19 souches d'actinobactéries à la résistance ou la sensibilité aux métaux lourds.

D'après les résultats obtenus et présentés dans la figure 3, les dix-neuf souches testées présentent des profils de croissance différents sur les six milieux de culture utilisés.

En effet, pour le milieu additionné de cuivre, les souches GSBNT10, G2, G3, G4, G6, G7, GSBNT4, SCA3, SCA7, SCA11, SCA17, SRC3 présentent une sensibilité vis-à-vis du métal qui se traduit par une absence de croissance. D'autre part, les souches GSBNT22, SCA12, S1A1, S2A1, S1An, S3A2 et WR1L1S8 se développent aisément sur ce milieu traduisant une résistance à ce métal.

Pour le chrome, les isolats GSBNT10, G4, G6, G7, SCA7, S2A1, SRC3 sont sensibles à ce métal, les autres souches testées, en revanche :G2, G3, GSBNT4, GSBNT22, SCA3, SCA11, SCA12, SCA17, S1A1, , S1An, S3A2 et WR1L1S8 présentent une croissance plus ou moins bonne expliquant leur résistance vis-à-vis du chrome.

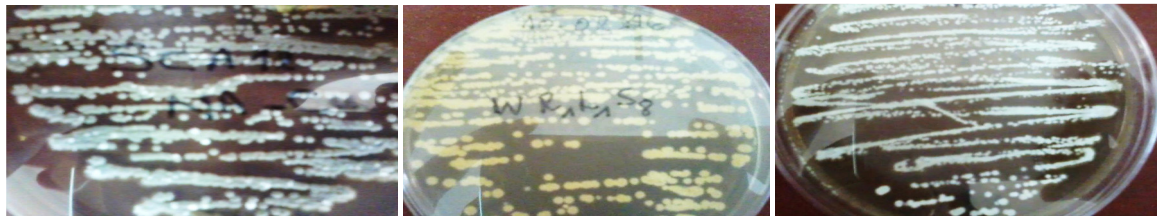
Dans le cas du cadmium, la totalité des souches étudiées présentent une sensibilité en présence de ce métal.

Sur le milieu de culture contenant le fer comme ion métallique, seulement quelques souches présentent une sensibilité à savoir les souche, G4, G6, G7 et SRC3, alors qu'une résistance à ce métal est observée pour les isolats GSBNT10, G2, G3, GSBNT4, GSBNT22, SCA3, SCA7, SCA11, SCA12, SCA17, S1A1, S2A1, S1An, S3A2, et WR1L1S8.

Pour le milieu à base de zinc, les souches ayant manifesté une sensibilité sont :GSBNT10, G3, G4, G6, G7, GSBNT4, GSBNT22, SCA7, SCA11, SRC3, les souches : G2, SCA3, SCA12, SCA17, S1A1, S2A1, S1An, S3A2 et WR1L1S8 se développent sur ce milieu avec une croissance plus ou moins bonne traduisant leur résistance vis-à-vis de cet ion métallique.

Pour finir, sur le milieu de culture préparé à base de mélange de métaux lourds (cuivre, chrome, fer, zinc et le cadmium), on observe une légère résistance traduite par la formation du mycélium du substrat des isolats SCA12 et WR1L1S8.

A la lumière des résultats de ce criblage, il en ressort clairement que parmi tous les isolats testés, trois souches à savoir : SCA12, WR1L1S8 et S3A2 présentent les profils de résistance aux métaux lourds les plus complets qui sont le cuivre, le fer et le zinc et de ce fait sont sélectionnées pour le test de réduction des métaux lourds sur milieu liquide, leur croissance est montrée dans la figure 4 ci-après.



SCA12 sur NA-Cu

WR11S8 sur NA-Fe

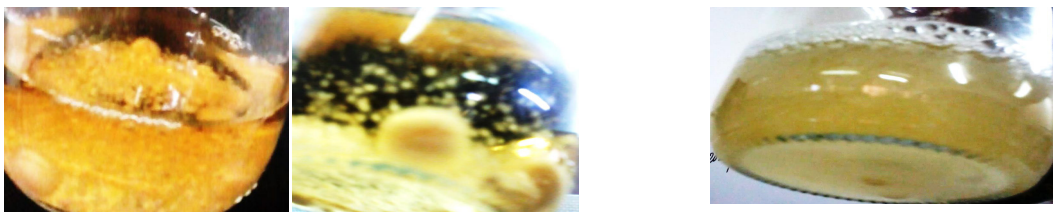
S3A2 sur NA-Cu

Figure 4: Mise en évidence de la résistance des souches sélectionnées d'actinobactéries sur les métaux lourds testés

II. Mise en évidence de la réduction des métaux lourds par les souches d'actinomycètes sélectionnées

Dans le but d'étudier la capacité des isolats préalablement sélectionnés pour leur résistance aux métaux lourds, à réduire ces derniers en milieu liquide, les souches ont été ensemencées dans des Erlenmeyers de 250 ml contenant 50 ml de bouillon nutritif additionné de 55 mg/L de chaque métal (cuivre, fer, zinc).

La figure 5 montre une croissance bien claire de la souche SCA12 sur le cuivre et le zinc après incubation à 28°C.



SCA12 sur BN-Cu

SCA12 sur BN-Zn

Figure 5 : Croissance de la souche SCA12 sur les milieux : BN-Cu et BN-Zn respectivement.

Un dosage par la Spectrophotométrie d'Absorption Atomique (SAA) est réalisé pour déterminer les concentrations finales du métal dans les 3 milieux. Le rendement de cette réduction pour chaque souche est donné en pourcentage par la relation suivante :

$$Y = \left(\frac{C_0 - C_f}{C_0} \right) \cdot 100$$

Tel que :

Y: taux de réduction du métal(%).

C₀: Concentration initiale en métal lourd.

C_f: concentration finale en métal lourd.

Les rendements de réduction des métaux obtenus pour les trois souches sélectionnées sont consignés dans le tableau Ci-dessous :

Tableau V : Rendements de réduction des métaux lourds par les souches sélectionnées

Bouillon + métal	BN-Cu	BN-Fe	BN-Zn
Souche			
SCA12	30.09%	12.62%	31.11%
S3A2	-	-	-
WR1L1S8	31.04%	31.89%	20.77%

Les résultats obtenus indiquent clairement un pourcentage de réduction du cuivre presque identique pour les deux souches SCA12 et WR1L1S8, quant au fer considéré comme étant un cofacteur pour les bactéries, on note un maximum de réduction chez l'isolat WR1L1S8, en ce qui concerne le zinc, on note que le meilleur rendement est donné par la souche SCA12.

Par ailleurs, il y'a lieu de signaler que la souche S3A2, présente une difficulté à se développer sur milieu liquide d'où l'absence de réduction des métaux lourds étudiés par cette dernière.

D'après l'études réalisées par Daboor et *al.*, 2014, le zinc s'est avéré le métal le mieux réduit par le genre *Streptomyces* 0.80 µg/ml il est d'en même pour l'étude réalisée par Hamedi et al 2015 avec une concentration de 140mM.

A la lumière des résultats obtenus, notre choix s'est porté sur l'isolat SCA12 car ayant présenté des rendements de réduction non négligeables du cuivre et du zinc ainsi que le cuivre comme étant le métal le plus réduit pour la suite de notre travail.

III. Etude des caractères morphologiques de la souche sélectionnée

III.1. Caractères macromorphologiques

Les critères culturels de l'isolat SCA12 sélectionné ont été étudiés après ensemencement de la souche sur différents milieux de culture à base d'agar nutritif additionné d'un métal lourd à une concentration de 50mg/L. Les boîtes de Petri sont ensuite incubées pendant 7jours à 28°C et la croissance ainsi que la description des traits culturels des colonies sont observées et notées. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau VI suivant.

Tableau VI : Caractéristiques macromorphologiques de la souche SCA12 après 7 jours d'incubation à 28°C sur différents milieux en présence de métaux lourds.

Milieux de culture	MA	MS	Pigments diffusibles	Aspect des colonies	Croissance
NA-Cu	Blanc grisâtre	Blanc	-	Colonies bombées	+
NA-Cr	Blanc	Blanc	-	Colonies poudreuse	+
NA-Zn	Blanc jaunâtre	Blanc	-	Colonies Rugueuses	+
NA-Fe	Gris	Blanc	-	Colonie sec	+
NA-Cd	-	-	-	-	-
NA-Mé	-	-	-	-	-

Note: +: Excellente croissance; -: Absence de croissance.

La souche SCA12 présente une très bonne croissance sur les milieux de culture en présence de cuivre, chrome, zinc, et fer révélant différents aspects morphologiques, cependant aucune croissance remarquable sur les milieux au cadmium et le mélange des cinq métaux.

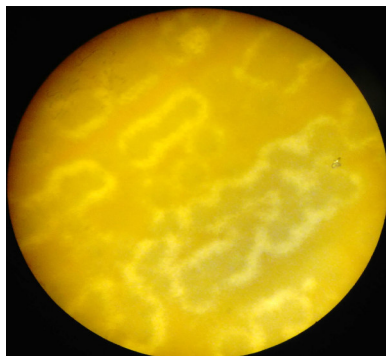
La morphologie de la souche SCA12 sur les différents milieux est illustrée sur la figure 6 ci-dessous :



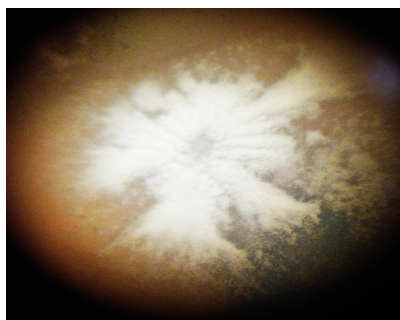
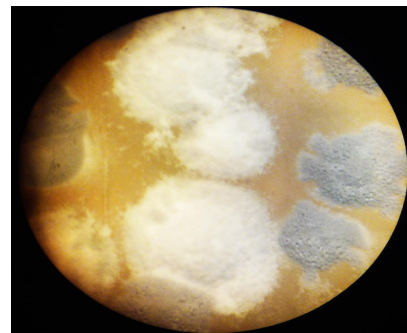
SCA12 sur NA-Cu SCA12 sur NA-Fe SCA12 sur NA-Cr SCA12 sur NA-Zn

Figure 6: Macromorphologie de la souche SCA12 sur les milieux de culture additionnés de métaux lourds après 7 jours d’incubation à 28°C.

Afin d’étudier les critères macromorphologiques de l’isolat sélectionné, une observation sous une loupe binoculaire de la souche sur les différents milieux additionnés de cuivre, zinc, chrome et fer est présentée dans la figure 7 qui suit :



(1)



(3)



(4)

Figure 7 : Observation de la souche SCA12 sous la loupe binoculaire sur les milieux NA-Zn (1), NA-Cu (2), NA-Cr (3) et NA-Fe (4)

III. 2 Caractères micromorphologiques

L'aspect micromorphologique de l'isolat SCA12 est révélé sur la figure 8 après une observation sous microscope optique.

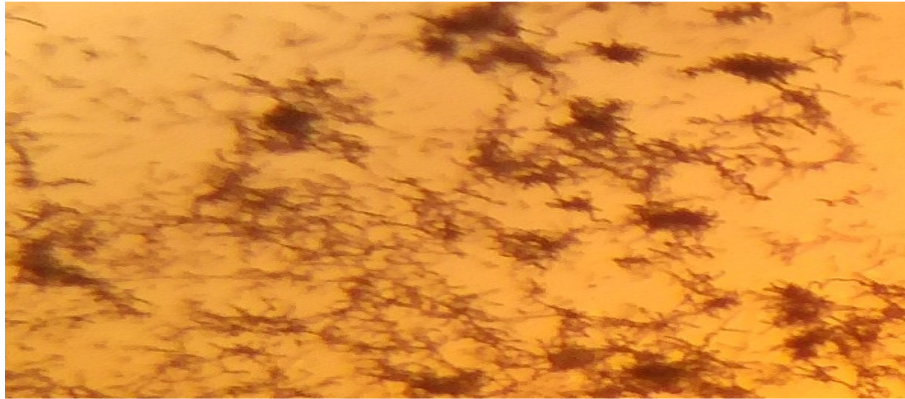


Figure 8: Observation au microscope optique de la souche SCA12(GX10) incubée pendant 7 jours à 28°C sur milieu NA-Cu.

Cette identification morphologique a permis de rattacher la souche SCA12 au genre *Streptomyces*.

IV. Modélisation du rendement de réduction du cuivre par la souche SCA12

Dans le but d'étudier l'influence de quelques paramètres opératoires à savoir la concentration initiale en métal, le temps d'incubation et la vitesse d'agitation sur le rendement de réduction du cuivre par la souche SCA12, on a opté pour un plan d'expériences de type composite centré qui consiste à appliquer un plan factoriel complet à deux niveaux avec interactions, complété par des points au centre du domaine d'étude. L'étude s'achève quand les tests de validation du modèle de premier degré sont positifs, dans le cas contraire, des essais supplémentaires sont entrepris pour établir un modèle de second degré.

V. 1. Elaboration du plan factoriel de premier degré

Les paramètres opératoires (Z_1 , Z_2 , Z_3) considérés pour la modélisation du rendement de réduction du cuivre (Y) par la souche SCA12 sont respectivement : La concentration initiale en cuivre, le temps d'incubation et la vitesse d'agitation.

Les valeurs des variables naturelles Z_j et codées x_j des différents paramètres opératoires ainsi que les rendements de réduction obtenus pour chaque essai sont regroupés dans le tableau VII, 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 VII: Matrice des expériences pour trois paramètres k = 3 et N = 8

N	Z ₁ (mg/L)	Z ₂ (j)	Z ₃ (rpm)	X ₀	X ₁	X ₂	X ₃	y %
1	32.5	5	87.5	1	-1	-1	-1	33.32
2	77.5	5	87.5	1	1	-1	-1	37.6
3	32.5	9	87.5	1	-1	1	-1	51.69
4	77.5	9	87.5	1	1	1	-1	47.09
5	32.5	5	162.5	1	-1	-1	1	30
6	77.5	5	162.5	1	1	-1	1	28.41
7	32.5	9	162.5	1	-1	1	1	39
8	77.5	9	162.5	1	1	1	1	24.72

La moyenne des rendements de réduction du cuivre des huit essais $\bar{y} = 36,46625\%$.

Le nombre (n_0) d'expériences au centre du domaine expérimental (concentration initiale en cuivre de 55 mg/l, une vitesse d'agitation de 125 tr/min et un temps d'incubation de 7 jours) est de 6 essais. Les rendements ainsi obtenues sont rassemblés dans le tableau VIII suivant :

Tableau VIII: Rendements de réduction du cuivre au centre du domaine d'étude.

n_0	$y_0(\%)$
1	44.74
2	36.25
3	40.47
4	41.42
5	44.74
6	36.25

La moyenne des rendements de réduction du cuivre pour les six essais au centre du domaine $\bar{y}_0 = 41,145\%$.

V.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 IX.

Tableau IX: Valeurs des coefficients de l'équation de régression

Terme constant	Effets linéaires		
b0	b1	b2	b3
36,466	-2,011	4,134	-5,934

Effets d'interactions			
b12	b13	b23	b123
-2,684	-1,956	-2,806	-0,489

V.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 le rendement de réduction du cuivre par la souche SCA12 est négligeable. (Goupy *et al.*, 1999)

Ce test consiste à déterminer:

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

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

y_i : Valeur du rendement de réduction du cuivre des essais au centre

\bar{y}_0 : Moyenne des essais au centre ; $\bar{y}_0 = 41,145\%$.

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

Ainsi on aura : $S_{\text{rep}}^2 = 10,786$

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

les valeurs de t_j pour chaque coefficient avec : $t_j = \frac{|b_j|}{S_{b_j}}$

Avec :

S_{b_j} : écart type défini par :

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

On aura alors $S_{b_j} = 1,161$

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

Tableau X: Valeurs de t_j

Terme constant	Effets linéaires		
t_0	t_1	t_2	t_3
31,405	1,732	3,560	5,110

Effets d'interactions			
t_{12}	t_{13}	t_{23}	t_{123}
2,311	1,685	2,417	0,421

En utilisant la table de Student relative à un test bilatéral (Annexe VII), 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 les valeurs de $t_1, t_{12}, t_{13}, t_{23}, t_{123}$ sont inférieures à la valeur tabulée du test de Student (2,57) déduisant ainsi que les coefficients correspondants ($b_1, b_{12}, b_{13}, b_{23}, b_{123}$) ne sont pas significatifs donc ils seront éliminés de l'équation de régression.

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

$$\hat{y} = 36,466 + 4,134 \cdot x_2 - 5,934 \cdot x_3$$

V.2.2. Tests de validation de l'équation de régression

- **Recherche de biais**

Avant de valider le modèle postulé, nous devons vérifier l'absence du biais. Pour cela, on calcule la variance résiduelle qu'on va comparer à la variance de reproductibilité par le test de Fisher Snedecor (Ozil *et al.*, 1997).

F est donné par le rapport : $F = \frac{S_{rés}^2}{S_{rep}^2}$

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

\hat{y}_i : Valeur de rendement calculé à partir du modèle.

Pour $N=8$ et $\ell = 3$ (ℓ est le nombre de coefficients significatifs), $S_{rés}^2 = 37,101$

$$\text{Ce qui donne : } F = \frac{37,101}{10,786} = 3,439$$

La valeur tabulée du test de Fisher (Annexe VIII) pour $F_{0,95}(N-1, n_0-1) = F_{0,95}(5,5)$ est égale à 5.05. Puisque la valeur F calculée est inférieure à la valeur tabulée, le modèle est considéré sans biais, ce qui signifie que les paramètres étudiés ont réellement une influence sur le rendement de réduction du cuivre par la souche SCA12.

- **Test de signification de la régression**

Comme le modèle est sans biais, on réalise un test de Fisher pour vérifier la signification de la régression dont le rapport F est donné par la relation (Ozil *et al.*, 1997)

$$F = \frac{\sum_{i=1}^N (\hat{y}_i - \bar{y})^2 / \ell - 1}{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2 / N - \ell} \quad \text{Avec } F = 6,86$$

$$\text{Avec : } \bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^N y_i}{N} ; \bar{y} = 36,466 \%$$

En procédant par la table de Fisher, $F_{0,95}(\ell-1, N-\ell) = F_{0,95}(2,5)$ est égal à 5.79. Étant donné que la valeur tabulée est inférieure à celle calculée, l'équation de régression est adéquate et le modèle est valide à 95%.

- **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 $\hat{y} = 36,466\%$ à la moyenne des 6 expériences réalisées au centre, soit $\bar{y}_0 = 41,145\%$.

L'erreur relative absolue entre ces deux valeurs (12,83%) étant supérieure à 5%, on conclure alors que le modèle linéaire de premier degré choisi n'est pas valide. Nous allons donc tester un modèle de second degré.

V.3. 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 rendements obtenus du plan en étoile sont regroupés dans le tableau IX.

Tableau XI: Résultats du plan en étoile ($N_\alpha = 2.k = 6$)

N_α	$Z_1(\text{mg/L})$	$Z_2(\text{j})$	$Z_3(\text{rpm})$	X_0	X_1	X_2	X_3	$y(\%)$
1	10	7	125	1	-1,68	0	0	50
2	100	7	125	1	+1,68	0	0	10.87
3	55	3	125	1	0	-1,68	0	20.58
4	55	11	125	1	0	+1,68	0	37.81
5	55	7	50	1	0	0	-1,68	47.34
6	55	7	200	1	0	0	+1,68	41.69

La moyenne des rendements de réduction du cuivre obtenus par le modèle du deuxième degré est : $\bar{y} = 37,340\%$.

V.3.1. Calcul des coefficients du modèle

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

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

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

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

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

Tableau XII : Valeurs des coefficients du modèle de second degré

Terme constant	Effet linéaire		
b_0	b_1	b_2	b_3
41,072	-6,008	4,546	-4,174

Effet d'interaction et quadratiques					
b_{12}	b_{13}	b_{23}	b_{11}	b_{22}	b_{33}
-2,683	-1,956	-2,806	-3,351	-3,772	1,653

V.3.2. 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 $S_{rep}^2=10,786$

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 ($[X^T \cdot X^{-1}]$) avec la variance de reproductibilité comme suit (Ozil *et al.*, 1997) :

$$S_{bj}^2 = C_{jj} \cdot S_{rep}^2$$

Les valeurs de t_j sont rassemblées dans le tableau suivant :

Tableau XIII : Valeurs de t_j

Terme constant	Effets linéaires		
t_0	t_1	t_2	t_3
30,665	6,757	5,113	4,695

Effets d'interactions quadratiques					
t_{12}	t_{13}	t_{23}	t_{11}	t_{22}	t_{33}
2,311	1,684	2,416	3,867	4,353	1,908

Une fois que les valeurs de t_j sont déterminées, ces dernières sont comparées à la valeur tabulée du test de Student réalisé pour un niveau de signification de $\alpha = 0.05$ et un nombre de degrés de liberté $f = n_0 - 1 = 5$. La signification des coefficients du modèle exige des valeurs de t_j supérieures à la valeur tabulée $t_{0,05}(5) = 2.57$, pour cela les coefficients du modèle suivants : b_{12} , b_{13} , b_{23} , b_{33} correspondants aux valeurs de t_{12} , t_{13} , t_{23} , t_{33} inférieures à 2.57 seront éliminés de l'équation de régression du modèle de second degré.

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

• **Recherche du biais**

Pour $N=20$ et $\ell = 6$, la valeur de la variance résiduelle calculée $S_{\text{rés}}^2 = 47,111$ ce qui donne $F=4,367$.

Pour un niveau de signification $\alpha = 0.05$ et un nombre de degrés de liberté $(N - \ell) = 14$ et $n_0 - 1 = 5$, la valeur tabulée est entre 4.62 et 4.68, comme étant cette dernière supérieure à la valeur calculée le modèle est considéré sans biais.

• **Test de signification de la régression**

La valeur F calculée par le test de Fisher est de 5,845, cependant la valeur tabulée pour un niveau de signification de $\alpha = 0.05$ et un nombre de degrés de liberté $(N - \ell) = 14$ et $(\ell - 1) = 5$ est de 2.96, comme la valeur calculée est supérieure à celle tabulée, le modèle ainsi obtenu est considéré significatif et valide à 95%.

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

$$\hat{y} = 41,072 - 6,008 \cdot x_1 + 4,546 \cdot x_2 - 4,174 \cdot x_3 - 3,351 \cdot x_1^2 - 3,772 \cdot x_2^2$$

On remarque d'après l'équation de régression ci-dessous que les trois paramètres étudiés, à savoir la concentration initiale en ions cuivre, le temps d'incubation et la vitesse de l'agitation ont tous un effet significatif sur le rendement de réduction du cuivre par la souche SCA12. Le facteur qui a plus d'influence sur la réponse est la concentration initiale en ions cuivre (x_1) avec un effet négatif de (-6,008). Le signe négatif de ce dernier indique que le rendement de réduction est meilleur pour les faibles valeurs de la concentration initiale en

ions cuivre cette déduction est confirmée chez les mousses aquatiques dans l'élimination du cadmium par accumulation (Gagnon *et al.*, 1999).

Le deuxième paramètre opératoire qui a également un effet important sur le rendement de réduction après la concentration initiale en ions cuivre est le temps d'incubation (x_2) avec un effet positif sur la réponse (+4,546). Le signe positif de ce dernier indique que le rendement de réduction croît avec l'augmentation du temps d'incubation

La vitesse d'agitation quant à elle a un effet négatif sur la réponse ($b_3 = -4,174$). C'est-à-dire que son augmentation est néfaste sur le rendement de réduction du cuivre. D'autres études ont montré que l'influence de l'agitation sur l'élimination du plomb est aussi négligeable (Boulkrah, 2008).

On ne note toutefois aucune interaction entre les différents facteurs opératoires considérés.

V.4. Optimisation

La modélisation de nos résultats par le biais d'un plan composite centré a permis d'aboutir à un modèle du second degré traduisant de manière significative l'effet de variation des différents paramètres opératoires à savoir : la concentration du cuivre, le temps d'incubation et la vitesse de l'agitation sur le rendement de réduction du cuivre par la souche SCA12. L'étape de l'optimisation a pour intérêt la détermination des valeurs optimales de ces paramètres conduisant à un meilleur rendement de réduction du cuivre.

C'est le tracé des courbes isoréponses ou des surfaces de réponses qui permettent de localiser la région du domaine d'étude où cet optimum apparaît, ainsi que toutes les conditions opératoires menant à ce dernier. Ces courbes sont tracées par le logiciel MATLAB 7.0.

A partir de l'équation de régression obtenue du modèle de second degré suivante:

$$\hat{y} = 41,072 - 6,008 \cdot x_1 + 4,546 \cdot x_2 - 4,174 \cdot x_3 - 3,351 \cdot x_1^2 - 3,772 \cdot x_2^2$$

Les valeurs optimales des paramètres opératoires conduisant à un meilleur rendement de réduction du cuivre par la souche SCA12 sont calculées en dérivant le modèle prédictif par rapport à chacune des variables x_1 , x_2 , x_3 :

$$\frac{d\hat{y}}{dx_1} = -6,008 - 2 \cdot (3,351) x_1 = 0 \quad \implies \quad x_1 = -0.896$$

$$\frac{d\hat{y}}{dx_2} = 4,546 - 2(3,772) x_2 = 0 \quad \implies \quad x_2 = 0.602$$

$$\frac{d\hat{y}}{dx_3} = 4,174 = 0 \quad \Rightarrow \quad x_3 = 0$$

Le rendement de réduction théorique obtenue en ce point en remplaçant les variables x_1 , x_2 , x_3 par ces valeurs dans le modèle du second degré est de $\hat{y} = 41\%$

La surface de réponse de la figure 9 est tracée dans le plan x_1 - x_2 (les variables les plus significatives) pour $x_3 = 0$ (vitesse d'agitation de 125 rpm). La forme parabolicoïde de cette surface de réponse suggère qu'il existe un rendement maximal unique donné par les coordonnées du sommet de cette surface.

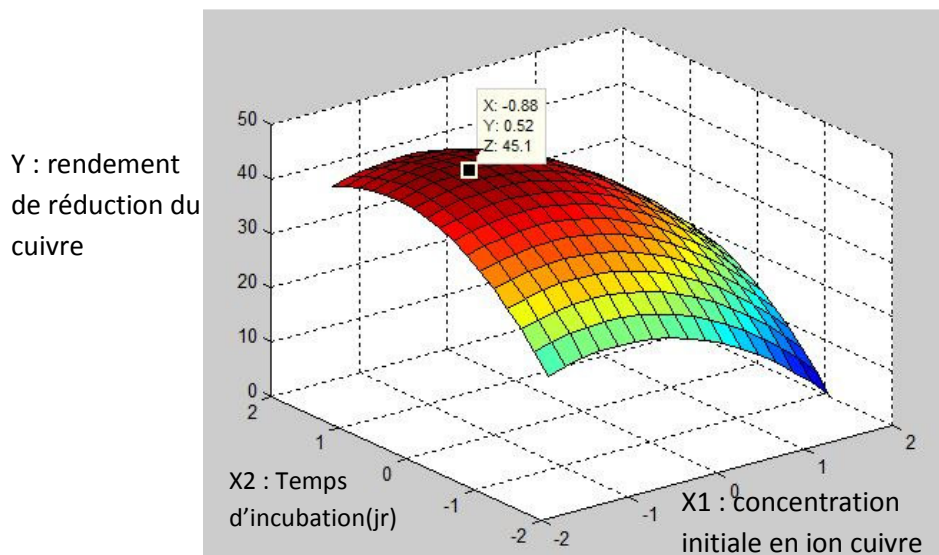


Figure 9: Surface de réponses pour $x_3 = 0$

Les courbes isoréponses sont tracées à différents niveaux de x_3 (-1,68, 0, 1,68) afin de visualiser le déplacement de la zone délimitant l'optimum en fonction des conditions opératoires.

- Pour le tracé de la figure 10 dans le plan $x_1 - x_2$:
- **Pour $x_3 = 1,68$** (figure 10 (a))

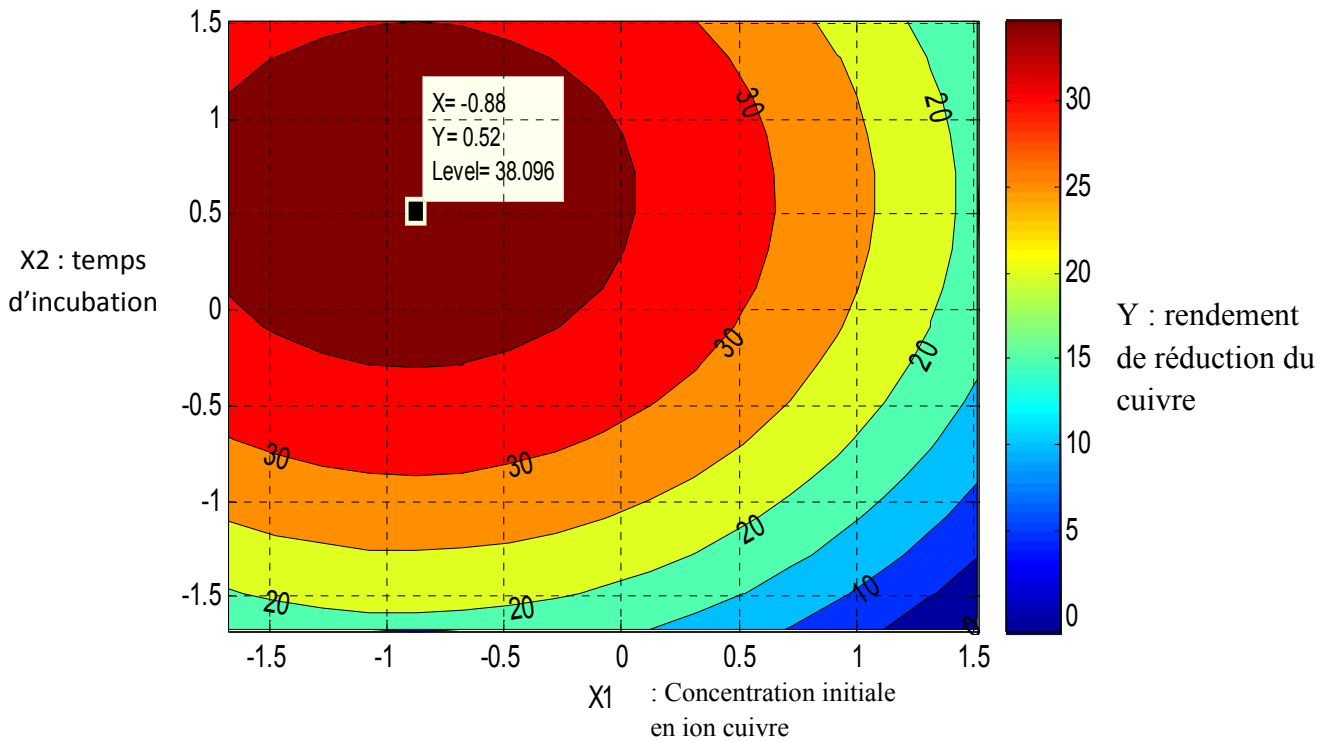
$$\hat{y} = 33,435 - 6,008 \cdot x_1 + 4,546 \cdot x_2 - 3,351 \cdot x_1^2 - 3,772 \cdot x_2^2$$
- **Pour $x_3 = 0$** (figure 10 (b))

$$\hat{y} = 41,072 - 6,008 \cdot x_1 + 4,546 \cdot x_2 - 3,351 \cdot x_1^2 - 3,772 \cdot x_2^2$$
- **Pour $x_3 = -1,68$** (figure 10 (c))

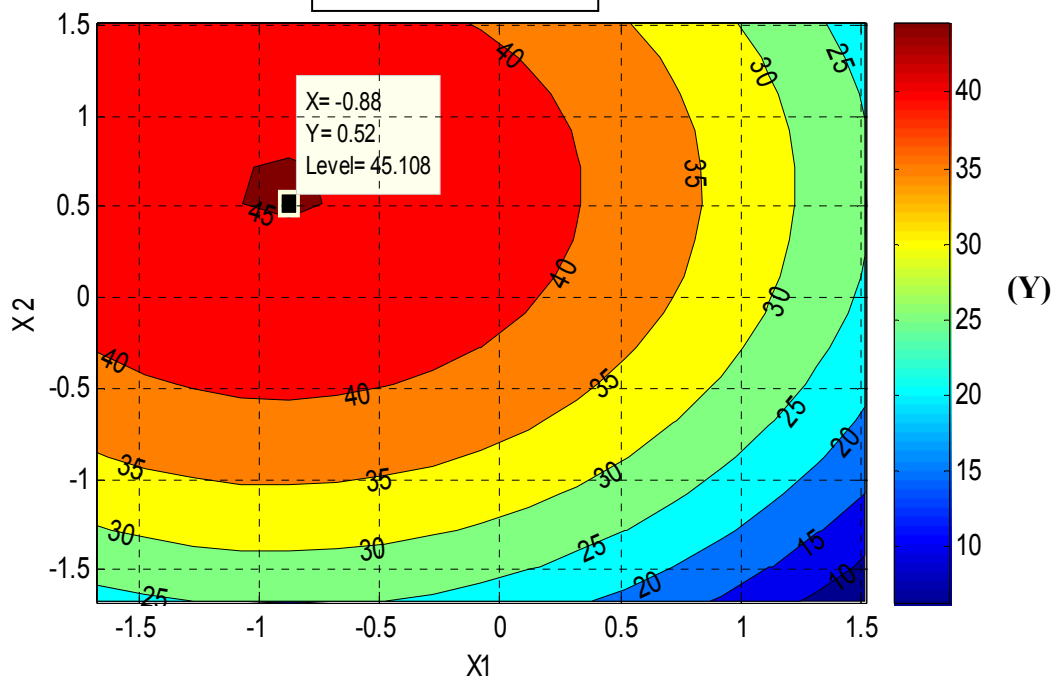
$$\hat{y} = 48,084 - 6,008x_1 + 4,546x_2 - 3,351x_1^2 - 3,772x_2^2$$

Les figures 10 montrent que la forme des courbes de niveaux obtenues sont des ellipses et le point central qui figure sur l'ensemble de ces dernières caractérise le rendement maximal.

(a) : $x_3 = 1,68$



(b) : $x_3 = 0$



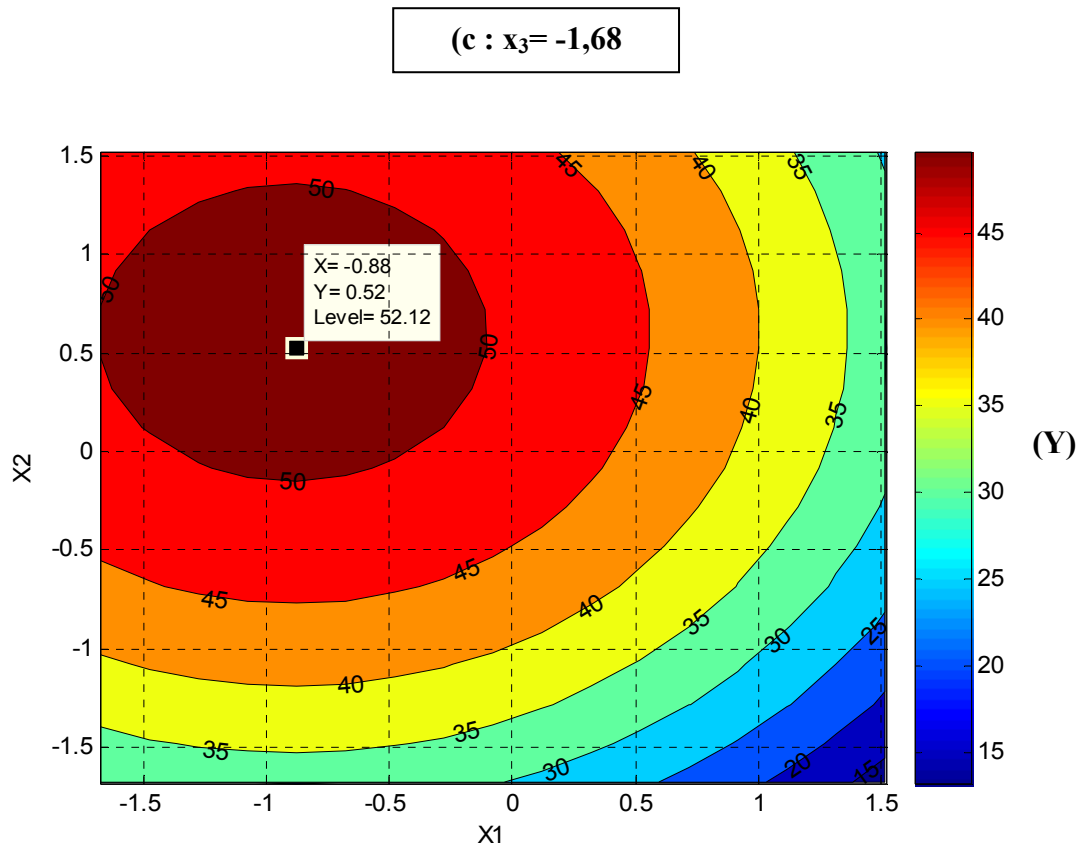


Figure 10 : Courbes isoréponses pour différents niveaux de x_3

L'analyse de ces figures montrent que le rendement de réduction de cuivre par la souche augmente dans la direction de la diminution de la vitesse d'agitation en passant d'un taux de 38,09 % à $x_3 = 1,68$ (200 rpm) (figure 10 -a) à un taux de 45,1 % à $x_3 = 0$ (125 rpm) (figure 10-b) pour atteindre un rendement de 52,12 % à $x_3 = -1,68$ (50 rpm) (figure 10-c). Les coordonnées de ce dernier sont :

$x_1 = -0,88$ (Concentration initiale en ions cuivre de 35,25 mg/L)

$x_2 = 0,52$ (Temps d'incubation de 8 jours)

$x_3 = -1,68$ (vitesse d'agitation de 50 rpm)

Pour transformer les variables centrées réduites (x_j) aux variables naturelles nous avons appliqué la formule de passage ou de codage suivante (Ozil *et al.*, 1997):

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

Tels que :

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

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 ; ΔZ_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.

Exemple :

$$Z1 = (X1. \Delta Zj) + Zj^0 \quad \Longrightarrow \quad Z1 = (0,88. 22,5) + 55$$

$$\mathbf{Z1 = 35mg/l}$$

$$Z2 = (X2. \Delta Zj) + Zj^0 \quad \Longrightarrow \quad Z2 = (0,52. 2) + 7$$

$$\mathbf{Z2 = 8 jours}$$

Ces courbes sont précieuses pour l'exploitation à l'échelle industrielle. En effet, si une contrainte de l'appareillage impose un niveau à un facteur, elles permettent immédiatement de déterminer le niveau auquel doit être fixé l'autre facteur pour conserver la réponse maximale (Goupy *et al* 1999).



Conclusion

Conclusion

L'objectif principal de ce présent travail est l'optimisation du rendement de réduction des métaux lourds par un procédé biologique à travers l'utilisation de souches d'actinomycètes d'origine tellurique et marine par le biais des plans d'expériences.

Suite à un criblage préliminaire, l'évaluation de la résistance ou de la sensibilité de 19 isolats d'actinomycètes, obtenus à partir de différentes origines a été étudié sur différents milieux de cultures solides à base d'agar nutritif additionné de métaux lourds (Cuivre, Zinc, Fer, Chrome, Cadmium et le mélange des cinq métaux) à raison de 50µg/mL.

L'étude incluant les critères macro et micromorphologiques de la totalité des souches étudiées a été réalisé dans un but d'évaluation de la croissance métabolique.

Les résultats de cette première étude a permis la sélection de trois isolats (SCA12, WR1L1S8 et S3A2) ayant présenté une résistance vis à vis de la plupart des métaux lourds testés.

Une seconde étude réalisée sur les trois souches préalablement sélectionnées qui consiste en l'évaluation du rendement de réduction des métaux lourds (Zn, Fe et Cu) sur milieu liquide en utilisant la spectroscopie d'absorption atomique (SAA). Les résultats obtenus ont permis la sélection de l'isolat SCA12 pour la suite de notre travail. Cette souche a présenté un pourcentage de réduction intéressant à la fois sur le zinc (31.11%), le cuivre (30.09 %) et le fer (12.6 2%).

D'autre part, l'identification morphologique de l'isolat SCA12 a été entreprise en utilisant une loupe binoculaire et un microscope optique. Les résultats obtenus ont permis de rattacher la souche au genre *Streptomyces*, où le nom *Streptomyces* sp. SCA12 lui a été attribué.

Une modélisation statistique a été entreprise par le biais d'un plan d'expériences composite centré en vue de déterminer l'effet des paramètres opératoires étudiés (concentration du cuivre, temps d'incubation et la vitesse d'agitation) sur le rendement de réduction du cuivre par la souche SCA12 ainsi que leur optimisation.

Le modèle de second degré développé par l'application d'un plan composite centré montre que le paramètre opératoire qui a le plus d'influence sur le rendement de réduction du cuivre est la concentration initiale en ions cuivre. En effet, la diminution de ce dernier facteur conduit à une augmentation du rendement de réduction du cuivre dans la gamme de concentrations exploitées. Quant à l'effet du temps d'incubation, le rendement augmente proportionnellement avec ce dernier et diminue avec l'augmentation de la vitesse d'agitation.

Le tracé des surfaces de réponses et les courbes isoréponses a révélé l'existence d'un rendement maximum de réduction du cuivre (de 52,12%) en fonction des trois paramètres étudiés. Leurs valeurs optimales sont :

- $x_1 = -0,88$ (Concentration initiale en ions cuivre de 35,2 mg/L)
- $x_2 = 0,52$ (Temps d'incubation de 8 jours)
- $x_3 = -1,68$ (Vitesse d'agitation de 50 rpm)

L'ensemble des résultats obtenus est intéressant et mérite la poursuite du travail autour des axes suivants :

- ✓ Penser à coupler le traitement biologique des métaux lourds réalisé dans cette présente étude aux autres procédés de traitements comme les traitements électrochimiques et physico-chimiques afin d'améliorer le rendement de réduction obtenu.
- ✓ Tester la réduction d'autres métaux lourds par d'autres souches d'actinomycètes comme la souche WR1L1S8.
- ✓ Changer la gamme de variation des paramètres opératoires exploités
- ✓ Elargir l'étude à d'autres paramètres nutritionnels de culture tel que: le pH, ...etc.
- ✓ Identification moléculaire de la souche *Streptomyces* sp. SCA12
- ✓ Etude du profil métabolique de l'isolat SCA12 par HPLC et HPLC –MS pour une meilleure compréhension du métabolisme de la souche, d'une part, et l'identification des métabolites incriminés dans la résistance et la réduction des métaux lourds d'autre part.



Références bibliographiques

A

1. A. Malik, Environ. Int., 30 (2004) 261.
2. Almaris N. Alonso. 2007. Cellulose Degradation and Biofilm Formation in the Developmental Life Cycle of the cellulolytique actinomycetes *Thermobifidafusca*. UMI. Pp: 134.
3. Abou-Elela. G.M; and Ghanem. N.B. (2005). – Phenotypic characterization and numeric altaxonomy of some actinomycetes strains isolated from burulloslake. Egyptian Journal of Aquatic Research, 31 (2), 125-144.

B

4. Becker B., Lechevalier M.P. et Lechevalier H.A. (1965). Chemical composition of cell-wall preparations from strain of various form genera of aerobic actinomycetes. Appl. Microbiol. 13(2), 236-243.
5. Belanger David. Utilisation de la faune macrobentique comme bioindicateur de la qualité de l'environnement marin côtier. maitre en écologie internationale. Canada, Aout 2009.
6. Belyagoubi L. (2014). Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. Thèse de Doctorat. Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, 7p.
7. Benoit D., Tourbier Y. et Germain S. (1994)." Plans d'expériences, construction et analyse". Technique et documentation. Edition LAVOISIER. Paris. 206p.
8. Boudjella. H ; Bouti. K ; Zitouni. A ; Mathieu. F ; Lebrihi. A; andSabaou. N. (2007). – Isolation and partial characterization of pigment-likeantibioticsproduced by a new strain of *Streptosporangium* isolated from an Algerian soil. J. Appl. Microbiol, 103, 228–236.

C

9. Conn. V.M. (2005). - Molecular Interactions of Endophytic Actinobacteria in Wheat and *Arabidopsis*. Thèse de Doctorat. Flinders University. pp 297.

D

10. Daboor S.M., Amany M.H., Neven Abd Elfatah E., and Hanouna S.I. (2014). Heavy metal adsorption of *Streptomyces chromofuscus*. J. C. L. Med. 2(6),431-437.

11. Demain A.L. and Salomon N.A. (1986). Manual of industrial microbiology and biotechnology. American Society for Microbiology Press, Washington.

G

12. G. Cimino, R. M. Cappello, C. Caristi and G. Toscano, Chemosphere, 61 (2005) 947.

13. Goodfellow M. and Williams S.T. (1983). Ecology of Actinomycetes. Ann. R. Microbiol. 37,139-216.

14. Goodfellow M., Stalon L.J., Simpson K.E. and Minnikin D.E. (1990). Numerical and chemical classification of *Actinoplanes* and some related actinomycetes. J. Gen. Microbiol., 136, 19-36.

15. Goupy J. (2005). Pratiquer les plans d'expériences. Edition : DUNOD. Paris.p501-295.

16. Goupy J.(1999). Plans d'expériences pour surfaces de réponses. Edition: DUNOD. Paris. 409p.

H

17. Hamedi,J, Dehhaghi,M et Mohammadipanah,F(2015) *Isolation of extremely Heavy metal Resistant Strains of Rare Actinomycetes from High Metal Content Soils In Iran*. Int. J. environ. Res ., 9(2) : 475-480

18. Hayakawa. M. 2008. Studies on the Isolation and Distribution of Rare Actinomycetes in Soil. The Society for Actinomycetes Japan. Vol: 22. N°: 1. Pp: 12-19.

19. Holt J. D., Krieg N. R., Sneath P.H.A., Staly J. T. and Williams S. T. (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th edition. Williams and Wilkins. Baltimore.

20. Hopwood D.A., Bibb M. J., Chater K.F., Kieser T., Bruton C.J., Kieser H.M., Lydiate D.J.,Smith C. P., Ward J.M. and Schremph H. (1985) Genetic Manipulation of *Streptomyces*: A Laboratory Manual. Norwich, UK: John Innes Foundation.

J

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

K

22. Kitouni M. (2007). Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotique à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse de Doctorat. Université Mentouri- Constantine, Faculté des sciences de la nature et de la vie, 6p.

L

23. Lam. Ks (2006). Discovery of novel metabolites from marine actinomycets, current opinion in Microbiology. 9,245-251.
24. Larpent J.-P. et Larpent-Gourgaud M. (1985 b). Manuel pratique de microbiologie. Hermann. Paris. 157-162
25. Lawrence C.H. (1956). A method for isolating actinomycetes from scabby potato tissue and soil with minimal contamination. Canad. J. Bot. 34, 44-47.
26. Lechevalier M.P., De Bievre C. and Lechvaleir H.A. (1977). Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: Phospholipid composition. Biochem. Syst. Ecol. 5, 249-260.
27. Lechevalier M.P AND Lechvaleir H.A. (1985). Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes : Phospholipid composition. Int. J. Syst. Bacteriol ? 20,435-443.

M

28. M. J. Amoroso, G. R. Castro, A. Duran, O. Peraud, G. Oliver and R. T. Hill, J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 26 (2001) 210. 39.
29. M. A. Polti, M. J. Amoroso and C. M. Abate, Chemosphere, 67 (2007) 660.
30. MONCHY, S. 2007 : Organisation et expression des gènes de résistance aux métaux lourds chez *Cupriavidus metallidurans* CH34. thèse de doctorat, Pp (13.33).
31. Michael T. Madigane ., John Martinko 11^{ème} édition. ISBN : 978-2-7440-7209-3. Université Carbondale de Illinois du sud.

N

32. Nouredine. L. (2006). - Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat. Université de Tizi Ouzou (Algerie). pp 186.

O

33. Omura S. (1992). The search for bioactive compounds from microorganisms. Springer, Verlag, New York;
34. Oskay M., Tamer A. and Azeri C., (2004). Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farmingsoils of Turkey. *Afr J Biotechnol.*, 3(9), 441–446.
35. Ozil P. (1997). Plans d'expériences : Méthode de TAGUCHI. E.N.S d'électrochimie et d'Electrométallurgie INPG.

P

36. Pizzul. L. (2006). - Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Actinomycetes. Thèse de Doctorat. Université d'Uppsala (Suède). pp 39 .

S

37. Sanglier JJ et Turjillo M, 1997. Substances bioactives produites par les actinomycètes et stratégie de sélection des souches. Bulltin de la société Française et Microbiologie. Vol 12(13).
38. Smaoui S. (2010). Purification et caractérisation de biomolécules à partir demicroorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de doctorat., Institut national polytechnique de Toulouse. France. p26.
39. Soraia El Baz, Mohamed Baz,1 Mustapha Barakate, Lahcen Hassani,1 Abdelhay El Gharmali, and BoujamâaImziln (2015). Resistance to and Accumulation of Heavy Metals by Actinobacteria Isolated from Abandoned Mining Areas.
40. Srivibool R. and Sukchotiratana M. (2006). Bioperspective of actinomycetesisolates from coastalsoils: A new source of antimicrobial producers. *Songklanakarinn. J. Sci. Technol.*, 28, 493-499.
41. Stackebrandt E. and Woese C.R (1981). The evolution of procaryotes. *Synopsia of the society for generalmicrobiology*, 32, 1-31.

T

42. Thakur D., Yadav A., Gogoi B.K., et Bora T.S., (2007). Isolation and screening *Streptomyces* in soil from areas from the states of Assam and Tripura, India, forantimicrobialmetabolites. *J. Microbiol. Médi.*, 17 : 242-249.

V

43. Valan Arazu. M; Duraipandiyan. V; Agastian. P; Ignacimuthu. S. (2009). In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rocksoil (India). *Journal de Mycologie médicale* 19 :22-28.
44. Vijayakumar R., Muthukumar C., Thajuddin N., Panneerselvam A. and Saravanamuthu R. (2007). Studies on the diversity of actinomycetes in the Palk Strait region of Bay of Bengal, India. *Actinomycetologica*, 21(2), 59-65.



45. Wael N.Hozzein, Mohammed bastawy Ahmed et Marzouka Shaban Abdel Tawab (2012). Efficiency of some actinomycetes isolates in biological treatment and removal metals from wastewater. *A.J.B.V.* 11(5), pp1163-1168.
46. Wayne L.G., Brenner D.J., Colwell R.R., Grimont P.A.D., Kandler O., Krichevsky M.I., Moore L.H., Moore W.E.C., Murry R.G.E., Starr M.P. and Trüper H.G. (1987).
47. Williams and Kuster E.. S.T. (1964). Selection of media for isolation of *Streptomyces*. *Nature*. 202,928-929. Lawrence, 1956).



Annexes

Annexe I

Tableau I: Chimiotypes de parois chez les actinomycètes (Larpent, 2000).

Type	Genres
Type I : LL-DAP, Glycine	<i>Arachnia, Intrasporangium, Kineosporia, Nocardioides, Pimelobacter, Sporichthya, Streptomyces, Streptoverticillium,</i>
Type II : meso DAP, Glycine, arabinos	<i>Glycomyces, Micromonospora, Actinoplanètes (Actinoplane Ampullariella, Catellatospora, Dactylosporangium, Pilimelia).</i>
Type III : meso DAP, Galactose	<i>Actinobispora, Brevibacterium, Caseobacter, Corynebacterium, Corynebacterium Dermatophilus, Frankia, Nocardia, Nocardiosis, Thermomonospora, Spirillospora, Thermoactinomyces, Streptosporangium, Geodermatophilus, Microtetraspora, Microbispora, Microtetraspora, Planobispora, Planomonospora, Streptosporangium, Saccharothrix, Streptoalloteichus, Mycobacterium, Rhodococcus</i>
Type IV : meso DAP, Arabinose, Galactose	<i>Actinopolyspora, Amycolata, Amycolatopsis, Kibdelosporangium, Pseudonocardia, Saccharomonospora, Saccharopolyspora.</i>

Annexe II :

Matériel utilisé:

- Autoclave (OMRON)
- Anse de platine
- Balance analytique (RADWAG Model : WLC 0.6/A1/C/2)
- Bain marie (GFL : Gesellschaft fur Laborstechnikm.b.H& Co. D 3006 Burgwedel 1)
- Barreaux magnétiques
- Bécher
- Bec bunsen
- Boite de pétri de 99 mm
- Boite de pétri de 57 mm
- Entonnoir
- Emporte pièce
- Erlenmeyers
- Etuve à 28°C (memmert)
- Filtre (PTFE 0.45 µm, ISOLAB)
- Fiole jaugée (50ml)
- Flacons (200 mL)
- Four Pasteur
- Microscope optique (WILL wetzlar)
- Micropipette de 1000 µL avec ambouts plastiques
- Papier filtre Whatman
- PH-mètre
- Pince métallique
- Plaque agitatrice (VELP SCIENTIFICA)
- SAA (ASC-6000.SHIMADZU)
- Spatule
- Tubes à essais

Annexe III

Tableau : Origine des souches d'actinomycètes

Souches	Origine
G2	Sédiments de rivières
G3	Sédiments de rivières
G4	Sédiments de rivières
G6	Sédiments de rivières
G7	Sédiments de rivières
NT10	Sédiments de rivières
GSBNT4	Sol du Sud Algérien
GSBNT 22	Sol du Sud Algérien
S1A1	Algue brune
S1An	Anémone de mer
S2A1	Algue marine
S3A2	Algue marine
SCA3	Sédiments de rivières
SCA7	Sédiments de rivières
SCA11	Sédiments de rivières
SCA12	Sédiments de rivières
SCA17	Sédiments de rivières
SRC3	Sédiments de rivières
WR₁L₁S₈	Algue brune <i>Fucus.sp</i>

Annexe IV : Milieux d'isolement**I. Milieu SCA (Starch Casein Agar) (Kuster et Williams, 1964) :**

Amidon : 10g, Caséine : 0.3g, KNO₃ : 2g, K₂HPO₄ : 2g, NaCl : 2g, MgSO₄.7H₂O : 0.05g, CaCO₃ : 0.02g, FeSO₄.7H₂O : 0.01g, Agar : 18g, H₂O d : qsp 1000 mL, pH 7.2±0.

II. Milieu Czapeck (Lawrence, 1956)

NaNO₃:3.0 g, K₂HPO₄:1.0 g, MgSO₄, 7H₂O :0.5 g, KCl : 0.5 g, FeSO₄.7H₂O : 10.0 mg, Amidon : 10.0 g, Agar : 18.0 g, H₂O d : qsp 1000 ml pH 7±0.2..

III. Milieu Gausse (Ivantiskaya et al., 1978)

Amidon : 20 g, K₂HPO₄:0.5g, KNO₃:1g, MgSO₄, 7H₂O :0.5g, Agar : 20g, H₂O d : qsp 1000 mL, pH 7.4±0.2..

Annexe V: Spectrophotométrie d'absorption atomique

La spectrophotométrie d'absorption atomique est une méthode très utilisée pour doser des métaux présents en solution. C'est une méthode de dosage rapide et précise et permet la détection des éléments à l'état de traces. Elle est basée sur le principe qu'une population d'atomes à l'état fondamental E_0 peut absorber des photons d'énergie ($h \nu$) et qu'une estimation du nombre de photons absorbés peut être relié à la concentration de l'élément dans la solution à analyser.

Cette population d'atomes est générée dans un atomiseur où elle est éclairée par un rayonnement lumineux de longueur d'onde λ et d'intensité I_0 . Lors du passage de ce rayonnement au travers du nuage atomique, les atomes au niveau fondamental E_0 peuvent absorber de la lumière de telle sorte qu'à la sortie du nuage, l'intensité lumineuse est égale à I et la longueur d'onde n'a pas changé. Les atomes qui sont passés à l'état excité E_1 vont très rapidement revenir à l'état fondamental en émettant un photon de même énergie que celle absorbée, et par conséquent, à la même longueur d'onde λ . La quantité d'énergie absorbée est directement proportionnelle au nombre d'atomes à doser. La concentration de l'élément à doser est déduite à partir de la loi de Beer- Lambert (J. Vandegans., et al 1996):

$$\log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \epsilon.L.C$$

Avec :

I_0 : Intensité de la radiation incidente;

I : Intensité de la radiation après absorption;

ϵ : Coefficient d'absorption spécifique de l'élément à doser;

C : Concentration de l'élément à doser ;

L : Longueur du trajet dans la flamme contenant l'élément à doser.

Selon le schéma général de l'installation (Figure -1), on distingue :

- Une source de lumière qui produit une radiation caractéristique de l'élément à doser à la longueur d'onde λ ;
- Un système pour moduler le rayonnement provenant de la source;

- Un atomiseur dont le rôle est de produire un nuage d'atomes à l'état fondamental;
- Un monochromateur qui sert à éliminer toutes les radiations autres que celles à la longueur d'onde λ ;
- Un détecteur couplé à un système électrique pour enregistrer et traiter les signaux.
- La détermination expérimentale de la concentration C est effectuée après un étalonnage de l'appareil qui permet de s'affranchir des paramètres ϵ et L .

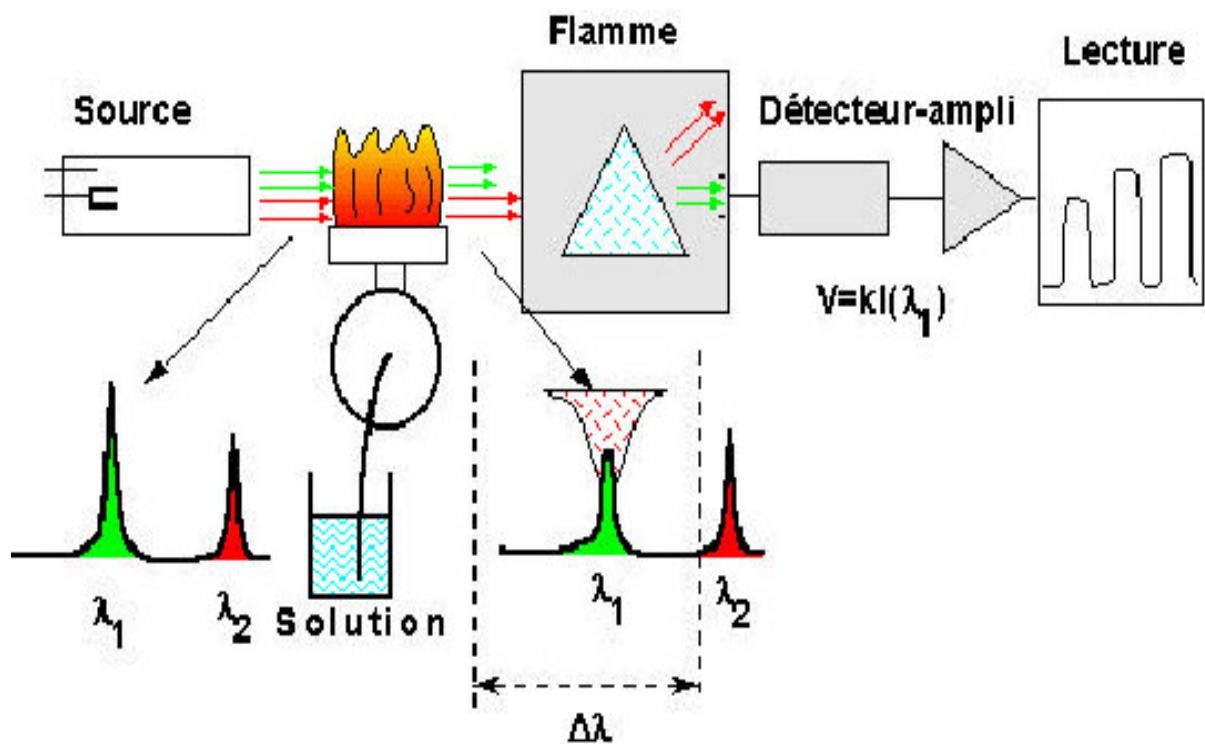
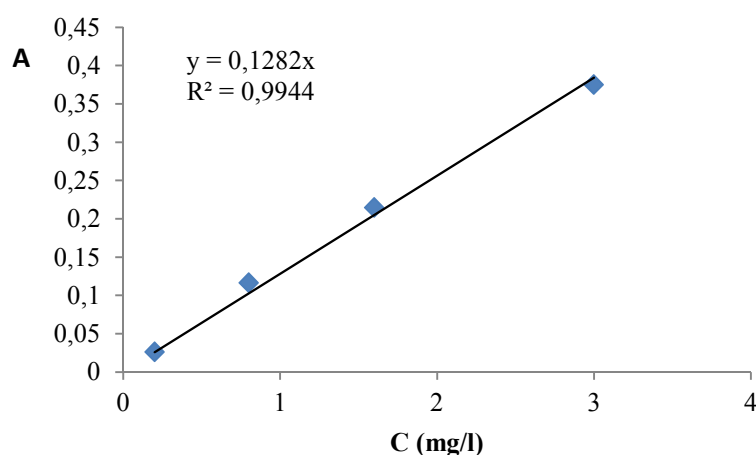


Figure-1 : Schéma du principe de fonctionnement d'un spectrophotomètre d'absorption atomique (Vandegans., et *al* 1996)

Annexe VI : Les courbes d'étalonnage

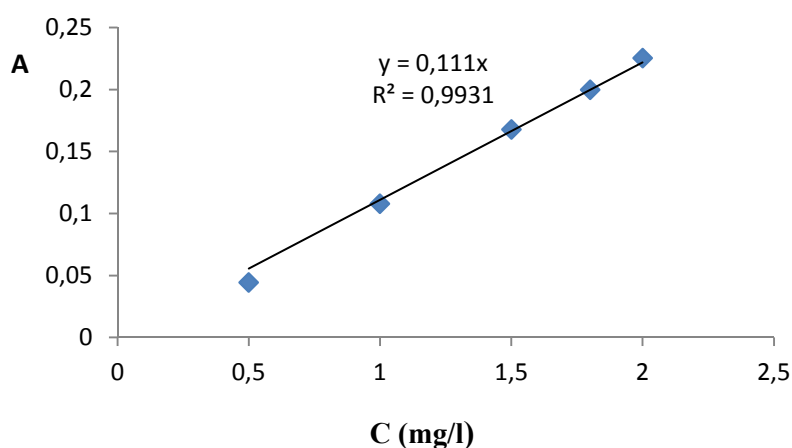
Nos analyses ont été effectuées sur un spectrophotomètre de marque SHIMADZU de type AA6500 assisté par micro-ordinateur. L'appareil est préalablement étalonné avant analyse en faisant passer des solutions étalons. Pour s'assurer de la linéarité de la courbe d'étalonnage, 4 étalons ont été préparés dans une gamme de concentrations bien déterminée pour chaque métal. L'exploitation de la courbe d'étalonnage tracée en portant l'absorbance en fonction de la concentration (figure ci-dessous) est assurée par l'ordinateur. Cette exploitation sert à déterminer la concentration en cuivre des échantillons à analyser

Concentration C(mg/l)	Absorbance A
0.2	0.0264
0.8	0.1165
1.6	0.2149
3	0.3755



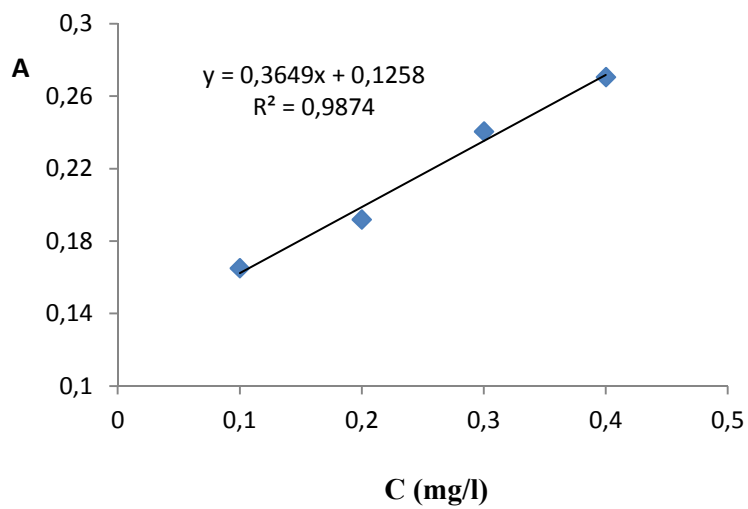
Courbe d'étalonnage du cuivre

Concentration C (mg/l)	Absorbance A
0.5	0.0443
1	0.1080
1.5	0.1678
1.8	0.1998
2	0.2253



Courbe d'étalonnage du fer

Concentration (mg/l)	Absorbance A
0.1	0.1651
0.2	0.1919
0.3	0.2406
0.4	0.2705



Courbe d'étalonnage du Zinc

Annexe VII :

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

Annexe VIII :

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

Valeurs des 95^{èmes} centiles (niveaux 0.05)

F0.95 pour la distribution F

v_1 → v_2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	∞
1	161	200	216	225	230	234	237	239	241	242	244	246	248	249	250	254
2	18.5	19.0	19.2	19.2	19.3	19.3	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.5	19.4	19.5
3	10.1	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.74	8.7	8.66	8.64	8.62	8.53
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.0	5.96	5.91	5.86	5.80	5.77	5.75	5.63
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.68	4.62	4.56	4.53	4.50	4.37
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.00	3.94	3.87	3.84	3.81	3.67
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.57	3.51	3.44	3.41	3.38	3.23
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.28	3.22	3.15	3.12	3.08	2.93
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.07	3.01	2.94	2.90	2.86	2.71
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.91	2.85	2.77	2.74	2.70	2.54
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.79	2.72	2.65	2.61	2.57	2.40
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.8	2.75	2.69	2.62	2.54	2.51	2.47	2.30
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.60	2.53	2.46	2.42	2.38	2.21
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.7	2.65	2.60	2.53	2.46	2.39	2.35	2.31	2.13
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.48	2.40	2.33	2.29	2.25	2.07
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.42	2.35	2.28	2.24	2.19	2.01
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.38	2.31	2.23	2.19	2.15	1.96
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.34	2.27	2.19	2.15	2.11	1.92
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.31	2.23	2.16	2.11	2.07	1.88
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.28	2.20	2.12	2.08	2.04	1.84
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32	2.25	2.18	2.10	2.05	2.01	1.81
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30	2.23	2.15	2.07	2.03	1.98	1.78
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27	2.20	2.13	2.05	2.01	1.96	1.76
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25	2.18	2.11	2.03	1.98	1.94	1.73
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24	2.16	2.09	2.01	1.96	1.92	1.71
26	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27	2.22	2.15	2.07	1.99	1.95	1.9	1.69
27	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25	2.2	2.13	2.06	1.97	1.93	1.88	1.67
28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24	2.19	2.12	2.04	1.96	1.91	1.87	1.65
29	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22	2.18	2.10	2.03	1.94	1.90	1.85	1.64
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.09	2.01	1.93	1.89	1.84	1.62
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08	2.00	1.92	1.84	1.79	1.74	1.51
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04	1.99	1.92	1.84	1.75	1.70	1.65	1.39
120	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.18	2.09	2.02	1.96	1.91	1.83	1.75	1.66	1.61	1.55	1.25
∞	3.84	3.00	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.88	1.83	1.75	1.67	1.57	1.52	1.46	1.0

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

Résumé

19 souches d'actinobactéries de différentes origines appartenantes au laboratoire de Microbiologie Appliquée ont fait l'objet de la mise en évidence de la résistance ou de la sensibilité des souches vis-à-vis ces métaux lourds (Cuivre, Zinc, Chrome, Cadmium, Fer) ainsi que leur aptitude à les réduire

Suite au screening des souches d'actinobactéries, trois souches (SCA12, S3A2, WR1L1S8) prouvant une meilleure croissance sur les différents milieux de culture comportant les métaux lourds ont été sélectionnées pour le test d'activité réductrice sur milieu liquide avec une concentration initiale de 55mg/L en métal, un pH de 7,2 et incubées à 28C° pendant 7 jours sous une agitation de 125 rpm.

Les résultats du test de réduction des trois souches sélectionnées nous ont permis d'optimiser le rendement de réduction du cuivre par la souche. A cet effet, un plan d'expériences de type composite centré a été élaboré pour l'étude de l'influence de trois paramètres opératoire sur le rendement de réduction du cuivre : la concentration initiale en ions cuivre, le temps d'incubation et la vitesse d'agitation.

Les valeurs optimales de ces paramètres qui ont conduit à un meilleur rendement de 52,12% ont été déterminées par le tracé de courbes iso- réponses avec une concentration initiale en cuivre de 35,2 mg/L, un temps d'incubation de 8 jours et une vitesse d'agitation de 50 rpm.

Mots clés : Actinomycètes, Métaux lourds, Activité réductrice, Plan d'expériences, Plan Composite centré, Optimisation.

Abstract

19 actinobacterial strains isolated from Ziama different origins have been studied in order to show than tested on media culture supplemented with heavy metals (Copper, Zinc, chromium, cadmium, iron) in order to shpw their resistance or their sensitivity as well as the reduction ability of heavy metals ions.

After screening, three actinobacteria strains (SCA12, S3A2, WR1L1S8) showing abundant growth on culture media supplemented with heavy metals, those strains were selected for metals reducing activity test on liquid medium at an initial concentration: 55mg/L of each tested metal, pH = 7.2, at 28C° and shaken at 125 rpm for seven days of incubation.

This test allowed the selection of SCA12 isolate because its important ability. For this purpose, a central composite design was elaborated in order to study the effect of three operating parameters: the copper metal ion initial concentration, the incubation time and the agitation speed.

The optimal values of these parameters have been delimited by tracing isoresponse curves are: an initial concentration of copper metal ion: 35.2 mg/L, the incubation time of eight days and a stirring of 50 rpm. Consequently, at these conditions, the reduction efficiency is of 52,11%.

Keywords: Actinomycetes, Heavy metals, Reducing activity, Design of experiments, Central composite design, Optimization.