

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira de Béjaïa



Mémoire en vue de l'obtention du Diplôme de Master en
Biotechnologie Microbienne

Thème

Criblage des paramètres de culture influents sur
la production d'antibiotiques par une souche
d'actinomycète par un plan d'expérience de
Plackett et Burman

Présenté par :

M^{elle} : Afroune Safia

M^{elle} : Barache Yasmina

Devant le jury :

Président : M^r KECHA.M Professeur, Université A.MIRA/Bejaia

Examineurs : M^{me} KERAMANE.B, MAA, Université A.MIRA/Bejaia

M^r BEN DJEDOU.K, MCB, Université A.MIRA/Bejaia

Promotrice : M^{me} BOUDRIES MAA, Université A.MIRA/ Bejaia

Co-promotrice : M^{me} ARKOUB MCB, Université A.MIRA/ Bejaia

PROMOTION
2013/ 2014



Remerciements

Ce travail a été effectué au sein du laboratoire de Mycologie, Faculté de Science de la nature et de la vie, département de Microbiologie appliquée à l'université de A. Mira de Bejaia.

Nous tenons à remercier, en tout premier lieu nos promotrices M^{me} BOUDRIES et M^{me} ARKOUB qui ont bien voulu diriger ce travail, pour leurs conseils, leurs compétences et leurs gentillesse qui nous ont permis de bien mener ce travail.

Nous remercions également M^r KECHA.M de nous avoir fait l'honneur de présider le jury et d'examiner notre travail, qu'elle reçoit ici l'expression de notre profonde gratitude.

Nos plus vifs remerciements s'adressent aux examinatrices M^{me} KERAMANE.B et M^r BEN DJEDOU.K Pour avoir d'accepter de juger et d'examiner ce travail.

Nous exprimons aussi nos remerciements à M^{lle} DJINNI pour nous avoir aidés au laboratoire.

Enfin, nos sincères remerciements s'adressent à toute l'équipe de laboratoire de Mycologie pour leurs encouragements et leurs conseils.

Merci

M^{lle} : Afroune Safia

M^{lle} : Barache Yasmina

Dédicaces

Je dédie ce mémoire

A celui qui ma tout donné sans rien attendre en retour.

A mon cher PAPA qui a su se montrer patient, compréhensif et encourageant, sa chaleur paternelle a été et sera toujours pour moi d'un grand réconfort, sans oublier sa femme NOURA.

A la mémoire de ma mère, de mes oncles MAAMAR et SALAH, et mon grand-père AHSAN, que dieu les accueille dans son vaste paradis.

A mes frères MAAMAR, LOUNIS et HOUAS, à ma grande sœur HASSINA, son marré HAMID et son fils AURAMTAN et ma petite sœur TAOUAS.

A mes grands- mères OUARDIA et KHOUKHA, à mon grand-père AMAR, que dieu vous protège et vous prête tous une longue et heureuse vie.

A mes oncles YUCEF, MAHMOUD ainsi que leurs femmes et leurs enfants, a mon oncle ALI et mon oncle AREF sans oublier sa fiancé BAYA.

A mes tantes MALIKA, HNIFA, AICHA ainsi leurs maris et leurs enfants, a ma tante KARIMA et son mari.

A la famille de mon oncle MAAMAR sans exception.

A mes adorables cousins et cousines que j'aimerai pour toujours

A mes meilleures amies DJIDJI, LINDA, SAMIA, HABIBA et NAIMA.

A toute la promotion Biotechnologie 2013- 2014.

SAFIA.



Dédicaces

Je dédie ce travail à mes chers parents qui m'ont tant soutenu tous le long de mon parcours, aucun hommage ni remerciement ne saurait être suffisant.

A ma très chère grande mère que dieux la garde encore longtemps.

A mon cher frère Yacine et mes adorables sœurs à qui je souhaite beaucoup de réussite.

A mon oncle Toufik et sa famille.

A toute ma famille en particulier le petit Yanis.

A toutes les personnes qui me sont chères.

Yasmina.

Liste des abréviations

- **RCC** : Répression Catabolique de Carbone
- **Czapeck_A** : Czapeck avec l'amidon
- **Czapeck_S** : Czapeck avec le saccharose
- **GC%** : Pourcentage Guanine-Cytosine
- **GEM** : Gousse Eau de Mer
- **MA** : Mycélium aérien
- **MEM** : Mincer Eau de Mer
- **MH** : Mueller Hinton
- **MS** : Mycélium de substrat
- **UFC/ml** : Unité formant colonie par millilitre
- **W_{0,2%}** : Williams avec 0,2% de NaCl
- **W_{5%}** : Williams avec 5% de NaCl

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I. Les actinomycètes : généralités, écologie et taxonomie.....3

1. Généralités.....3

2. Habitat «écologie» des actinomycètes.....3

3. Taxonomies des actinomycètes.....4

II. Les métabolites secondaires des actinomycètes.....6

1. Les antibiotiques.....6

2. Les enzymes.....7

3. Les pesticides et les insecticides.....7

4. Les antitumoraux.....8

III. Influence des sources nutritionnelles et conditions de culture sur la production des antibiotiques par les actinomycètes.....8

1. Influence des sources carbonées sur la production des antibiotiques.....8

2. Influence des sources azotées sur la production des antibiotiques.....9

3. Influence des sources de phosphates sur la production des antibiotiques.....9

4. Influence du pH, la température et le temps d'incubation sur la production des antibiotiques.....9

Chapitre II. Matériel et méthodes

I. Matériel.....11

I.1. Matériel analytique.....11

I.2. Matériel biologique.....11

II. Méthode.....11

II.1. sélection des souches productrices.....12

II.2. Criblage des paramètres influents sur la production d'antibiotiques.....12

II.3. Les matrices des expériences.....15

Chapitre III : Résultats et discussion

I. Sélection des souches d'actinomycètes productrices d'antimicrobiens.....	19
I.1. Croissance et macromorphologie.....	19
I.2. Sélection du meilleur milieu de production d'antibiotiques	19
II. Suivi des souches sélectionnées S₄₆ et S.....	22
II.1. Croissance sur les milieux sélectionnés.....	22
II.2. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des deux souches sélectionnées.....	24
II.3. Modélisation de l'activité antifongique de la souche S₁₁ par un plan d'expériences de Plackett et Burman.....	27
II.3.1. Calcul des coefficients du modèle de régression.....	28
II. 3. 2. Etude des effets des différents paramètres sur la production antifongique de la souche S ₁₁	29
Conclusion.....	38

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Introduction

Si l'apparition des antibiotiques a représenté une nouvelle étape dans l'amélioration de la qualité et la durée de vie (Kitouni *et al.*, 2005). En effet, les antibiotiques sont sans doute la famille des médicaments la plus réussie afin d'améliorer la santé humaine, outre de cette application fondamentale, les antibiotiques ont été utilisés pour prévenir et traiter les maladies infectieuses des animaux et des plantes ainsi que pour la promotion de la croissance dans l'élevage (Martinez, 2009).

Cependant, leur utilisation massive a conduit à l'apparition des bactéries résistantes aux substances antimicrobiennes qui sont une préoccupation majeure en microbiologie clinique et la recherche sur la résistance des bactéries à ces substances au cours des cinquante dernières années a été principalement axée sur les bactéries pathogènes (Tamara Garcia *et al.*, 2013). La recherche des nouveaux antibiotiques ou de nouvelles souches produisant des antibiotiques continuent d'être d'une très grande importance dans les programmes de recherche mondiale (Oskay, 2011).

Les actinomycètes représentent l'une des bactéries les plus étudiées et exploitées pour leur capacité à produire un large éventail de métabolites biologiquement actifs, en particulier, le genre *Streptomyces* qui est le plus dominant, c'est la source principale des antibiotiques disponibles dans le marché (75 %-80 %). En effet, des efforts importants ont été portés pour l'isolement de nouveaux actinomycètes provenant des sources terrestres par le dépistage des nouvelles molécules au cours des cinquante dernières années. Récemment, la vitesse de découverte de ces composés produits par ces microorganismes a diminué, alors que le taux de ré-isolement de molécule connue a augmenté, ainsi il est essentiel d'isoler de nouveaux groupes d'actinomycète d'habitat inexplorés ou non exploités en tant que source de nouveaux métabolites secondaires comme les environnements marins qui sont extrêmement différentes de celles terrestres. Il est supposé que les actinomycètes marins ont des caractéristiques différentes de celles de leurs homologues terrestres et par conséquent, pourraient produire différents types de composés bioactifs (Balaji *et al.*, 2011).

La production des antibiotiques est influencée par divers facteurs environnementaux, y compris les éléments nutritifs (source de carbone, d'azote et phosphore), les conditions de cultures (T° , pH, taux d'oxygène et la lumière) et le taux de croissance, en outre la production des métabolites secondaires par les actinomycètes diffère qualitativement et quantitativement en fonction de la souche utilisée (Oskay, 2011), par conséquent,

Introduction

l'optimisation du milieu de culture est très importante. Cependant, les procédés classiques de cette optimisation (une variable à la fois) ont été utilisés plus souvent que d'autres, mais ces derniers sont lents et souvent ne parvient pas à identifier l'optimum des facteurs parce que les interactions entre les différents facteurs sont négligées, pour cela des méthodes statistiques ont été utilisées (Baixin et *al.*, 2011).

Dans notre étude, un plan d'expériences de Plackett et Burman a été appliqué pour déterminer les facteurs les plus influençant sur la production d'antibiotiques et la manière de leur influence et pour réduire le nombre d'expériences à réaliser.

Notre travail se divise en deux parties :

La première (bibliographique) concerne : les généralités, l'écologie et la systématique des actinomycètes. Ainsi qu'un aperçu sur les antibiotiques et d'autres métabolites secondaires synthétisés par les actinomycètes.

La deuxième partie (expérimentale) concerne :

- ✓ La sélection des souches productrices d'antibiotiques sur les différents milieux.
- ✓ Mise en évidence de l'activité antibiotique des souches sélectionnées sur les différents milieux ;
- ✓ Et une modélisation de l'activité antibiotique par le biais d'un plan d'expériences de Plackett et Burman en vue déterminer les paramètres les plus influents sur cette dernière.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

I. Les actinomycètes : généralités, écologie et taxonomie

1. Généralités

Les actinomycètes sont des bactéries généralement filamenteuses à Gram positif caractérisées par un ADN riche en G+C (guanine+cytosine supérieur à 55%), généralement compris entre 60 et 75% (Ensign, 1979; Larpent et Sanglier, 1989 ; Chun et *al.*, 1997 ; Reyma et Vijayakumar, 2008).

Les actinomycètes se situent dans l'ordre des Actinomycétales (Maria et Sebald, 1990), qui comprend des genres d'une grande variabilité morphologique, allant de la forme cocci (*Micrococcus*) à un cycle bâtonnet-cocci (*Arthrobacter*) en passant par ceux formant des hyphes qui se fragmentent (*Nocardia*, *Rhodococcus*) et ceux qui possèdent un mycélium persistant et bien différencié (*Streptomyces*, *Actinomadura*, *Micromonospora*, etc.) (Lacey, 1973; Athalye et *al.*, 1981; Goodfellow et Williams, 1983; Lacey, 1997; Oskay et *al.*, 2004; Mitali et *al.*, 2006). Les formes évoluées possèdent un mycélium du substrat (nourricier) surmonté par un autre aérien sporulant (reproduction asexuées) (Lamari, 2006) avec un cycle de vie complexe (Olano et *al.*, 2009). Se sont les procaryotes les plus économiquement et biotechnologiquement intéressants (Houssam et *al.*, 2011).

Les souches d'actinomycètes peuvent être anaérobies, aérobies ou même micro-aérophiles. Ce qui leur permet de survivre et se reproduire facilement dans toutes les profondeurs de sols et de sédiments (Bandin et *al.*, 2007). Ils sont bien connus comme des bactéries saprophytes qui dégradent la matière organique, en particulier les biopolymères tel que la lignocellulose, l'amidon et la chitine (Doubou et *al.*, 2002), mais quelques uns provoquent des maladies pour l'Homme et les animaux notamment des actinomycetomes, des actinomycoses et des nocardioses (Goodfellow et *al.*, 1993).

2. Habitat «écologie» des actinomycètes

D'après Waksman (1961), Ferdinand Cohn fut le premier à décrire un actinomycète en 1875 et en 1878, Harz nommé *Actinomyces bovis*, organisme parasite rencontré dans une infection de la mâchoire d'un bovin.

Les actinomycètes sont le groupe de microorganismes le plus largement distribué dans la nature, qui essentiellement habite le sol (Marilen et *al.*, 2007), mais aussi dans les milieux marins, ce qui suggère que les actinomycètes des sédiments marins sont une bonne source de nouveaux composés bioactifs naturels (Kozue et *al.*, 2008). Certains, ils peuvent être isolés à

partir des milieux alcalins, acides, les écumes des boues actives et dans les échantillons de selle provenant de diverses sources (Khanna et *al.* 2011).

Des actinomycètes thermophiles peuvent être isolés à partir de nombreux environnements comme les sources chaudes de soufre, les sols à chauffage solaire, les sites des rejets des industries chaudes et les sols désertiques. En revanche, d'autres psychrophiles sont isolés à partir des échantillons glaciaires et de nouveaux actinomycètes ont été isolés à partir de la surface des galeries acides et riches en métaux lourds de zones minières, des rhizosphères des plantes et des sols agricoles (Khanna et *al.*, 2011). Le tableau I regroupe quelques genres d'actinomycètes par type d'habitat.

Tableau I : Répartition de quelques genres d'actinomycètes par type d'habitat (d'après Goodfellow et Williams, 1983)

Genre	Habitat
<i>Actinomadura</i>	Sol
<i>Actinoplane</i>	Sol, Eau, Litière
<i>Frankia</i>	Nodules des racines
<i>Microbiospora</i>	Sol
<i>Micromonospora</i>	Sol, Eau
<i>Rhodococcus</i>	Sol, Eau, Fumier, Litière,
<i>Saccharomonospora</i>	Sol, Eau, Litière
<i>Streptomyces</i>	Sol et Eau
<i>Streptosporangium</i>	Matière en décomposition et en fermentation

3. Taxonomie des actinomycètes

Les actinomycètes ont été longtemps rapprochés des champignons, par leur structure mycélienne particulière, et ce jusqu'à la découverte de leur structure cellulaire procaryote ayant permis de les inclure définitivement parmi les bactéries. La classification des espèces et des genres des actinomycétales reste un sujet difficile parce qu'elle est basée sur des critères extrêmement différents (Baldacci, 1962). On peut distinguer les grandes lignes des quatre périodes pendant lesquelles les critères utilisés pour la classification de ces microorganismes sont passés par différents stades de développement :

➤ La première période: Avant 1960, la systématique était descriptive et basée sur les caractéristiques macro et micromorphologiques (Pridham *et al.*, 1958 ; Transer *et al.*, 1961). Ces critères ont trouvé leur limite à partir du moment où l'ordre *Actinomycetales* commence à s'élargir.

➤ La deuxième période : Entre 1960 et 1970, elle se base sur la composition chimique des parois cellulaires en acides aminés et des cellules entières en sucres (Becker *et al.*, 1964 et 1965 ; Lechevalier et Lechevalier, 1970a), des lipides membranaires et pariétaux tel que les acides mycoliques (Mordarska *et al.*,1972 ; Minnikin *et al.* ,1975 et Minnikin *et al.*, 1977), les phospholipides (Lechevalier *et al.*, 1977 ; Minnikin *et al.*, 1977), les ménaquinones (Collins et Jones, 1981), et les acides gras (Grund et Kroppenstedt, 1990).

➤ La troisième période : Au début des années 70 puis une apogée entre 1980 et 1990, cette période est caractérisée par l'avènement de la taxonomie numérique assistée par l'outil informatique, dans le but de clarifier l'identification des espèces. Le principe consiste à traiter avec un logiciel approprié les résultats de plusieurs dizaines des tests physiologiques et biochimiques ; ce qui permet d'obtenir un dendrogramme montrant les pourcentages de similitude entre les espèces dont la position taxonomique a été clarifiée plusieurs d'entre elles (Goodfellow 1971 ; Athalye *et al.*, 1985 ; Goodfellow *et al.*, 1990 ; Grund et Kroppenstedt, 1990). En plus de ces caractères, la sensibilité des actinomycètes aux acridophages et des études immunologiques ont été également utilisées (Pranser, 1976 ; Williams *et al.*, 1980 ; Ridell, 1980 ; Wellington et Williams, 1981).

➤ La quatrième période : Cette période a commencée à partir de 1980 et elle est caractérisée par le recours à l'outil moléculaire pour la détermination des parentes phylogénétiques entre les actinomycètes à l'échelle des espèces, des genres et même des familles composant l'ordre des *Actinomycetales* (Stackebrandt *et al.*, 1997 ; Lebeda *et al.*, 2001).

Selon Bergey (1994), les actinomycètes étaient classés dans le Règne des *Procaryotes*, la Division des *Fermicutes*, la Classe des *Thallobacteria* et l'Ordre des *Actinomycetales*. Dans le Bergey's Manual de 2004, la Classe des *Thallobacteria* a été remplacée par *Actinobacteria*.

Actuellement, le phylum *Actinobacteria* tel qu'il figure dans le Bergey's Manual (2012), referme toujours une seule classe : *Actinobacteria* subdivisée en 5 sous classes, 6 ordres, 13 sous ordres (dont 10 appartiennent à l'ordre des *Actinomycetales*), 44 familles, 166 genres (dont 142 appartiennent à l'ordre des *Actinomycetales*). (Goodfellow et *al.*, in Bergey's Manual, 2012).

II. Les métabolites secondaires des actinomycètes

Les métabolites secondaires ont également été appelés «idiolites» car ils sont formés au cours de la idiophase (phase de production) de la culture. Ces métabolites spéciaux habituellement possèdent des structures chimiques complexes et ne sont pas essentiels pour la croissance de l'organisme producteur (Juan et Demain., 1980).

Les actinomycètes jouent un rôle significatif dans le futur de la biotechnologie, en raison de leur importance dans la production des antibiotiques, vitamines, enzymes, des agents antitumoraux, des antiviraux (Doralice et *al.*, 2004) et des antiparasites (Sheila et *al.*, 2010).

1. Les antibiotiques

Le premier antibiotique découvert est la pénicilline par Alexander Fleming en 1929 (Pamela, 1996 ; Gulay et *al.*, 2013 et Hua Zhu et *al.*, 2013), quand il a vu des zones d'inhibition de la croissance bactérienne sur la gélose autour de contaminants fongiques. Un effort massif de dépistage suivi et des milliers de composés antibiotiques ont été identifiés (Pamela, 1996).

Les antibiotiques sont des métabolites secondaires synthétisés à la fin de la phase exponentielle (trophophase) et au début de la phase stationnaire (idiophase), leur production n'est liée ni aux besoins de croissance ni aux besoins énergétiques des microorganismes producteurs (Hua Zhu et *al.*, 2013).

Les microorganismes filamenteux (mycètes et les bactéries de l'ordre *Actinomycetales*) sont la source principale des métabolites secondaires dont environ 90% sont des antibiotiques et deux tiers de ces derniers sont produits par le genre *Streptomyces* (Hua Zhu et *al.*, 2013).

Les antibiotiques utilisés à l'heure actuelle peuvent être classés selon plusieurs critères : spectre d'action (qui peut être large ou étroit) ; mode d'action (agit sur la membrane

plasmidique, paroi, génomes); type d'action (bactériostatique, fongistatique, bactéricide, fongicide) et la structure chimique qui est la plus utilisée.

2. Les enzymes

Deux propriétés les plus significatives des actinomycètes sont leur capacité à se développer sur les substrats les plus divers et leur aptitude à synthétiser de très nombreux métabolites bioactifs, parmi lesquels les enzymes qui après les antibiotiques sont les produits les plus importants des actinomycètes (Lopes et *al.*, 1999). À titre d'exemple : les actinomycètes sont capables de produire des β -glucanases qui causent la lyse des parois cellulaires dont la β -(1,6) glucanase qui est produite par plusieurs espèces de *Streptomyces* inhibe la croissance de *Phytophthora* (Karine, 1997).

La chinase est une enzyme produite par *Streptomyces heteromorphus*, elle a une activité antifongique contre divers champignons pathogènes (Seetha et *al.*, 2013).

Les actinomycètes d'origine marine présentent des activités enzymatiques très variées et sont capables de catalyser diverses réactions biochimiques grâce à un arsenal d'enzymes qui peuvent être produit par ces microorganismes. Nous pouvons citer à titre d'exemple les amylases, cellulases-galactosidases et protéases. Ces bactéries sont aussi la source potentielle de production des inhibiteurs d'enzymes qui sont utilisés en pharmacologie (Sivakumar et *al.*, 2007).

3. Les pesticides et les insecticides

Se sont des substances chimiques utilisées dans l'agriculture contre des ravages causés par des microorganismes pathogènes ainsi que des insectes ayant induits beaucoup de pertes économiques et agricoles dans le monde (Ghayur, 2000).

Les actinomycètes sont non seulement importants en raison de la production d'antibiotiques mais ils sont également employés en agriculture comme des agents biologiques, qui peuvent être utilisés pour tuer les insectes nuisibles et les mauvaises herbes. A titre d'exemple :

- Spinosad produit par *Saccharopolyspora spinosa*.
- Herbimycine produit par *Streptomyces hygrosopicus*.

- 2,4- Dihydro-4-(β -D-ribofuranosyl)-1, 2,4(3H)-triazol-3-one est un herbicide produit par *Actinomadura sp* (Loucif, 2011).

L'application de ces pesticides a non seulement causé la pollution environnementale, l'accumulation des résidus des pesticides dans les plantes (donc les viandes et le lait) mais aussi a induit un phénomène de résistance des parasites et des champignons à ces substances (Ghayur, 2000).

4. Les antitumoraux

La chimiothérapie est l'un des principaux traitements utilisés pour la lutte contre le cancer. Un grand nombre des composés produits principalement par des microorganismes, en particulier, les actinomycètes sont les producteurs d'un grand nombre des produits naturels ayant des activités biologiques, y compris les propriétés antitumorales. Ces composés appartiennent à plusieurs classes structurales, telles que les macrolides, les peptides non ribosomiques (Olano et al., 2009).

Les anthracyclines sont le groupe important des antitumoraux et sept membre, dont la daumorubicine et la doxorubicine la daumorubicine et la doxorubicine, se sont avérés être cliniquement important dans le traitement du cancer (Mukhtar et al., 2012).

III. Influence des sources nutritionnelles et conditions de culture sur la production des antibiotiques par les actinomycètes

La nature et la concentration de certains composés dans le milieu de culture ont un effet éminent sur la production des antibiotiques (Gesheva et al., 2005) entre autre chez les actinomycètes. Parmi les sources nutritionnelles, les sources de carbone, d'azote et de phosphate affectent fortement cette production. L'épuisement de ces sources nutritionnelles pourrait déclencher l'initiation de la synthèse d'antibiotique en permettant de lever la régulation négative exercée par ces nutriments (Martin et Demain, 1980).

1. Influence des sources carbonées sur la production des antibiotiques

La source de carbone telle que l'amidon, le maïs, le glucose, le saccharose et la mélasse sont couramment utilisées en tant que substrat de croissance pour produire des enzymes, des antibiotiques et d'autres métabolites secondaires par fermentation. Cependant, la production est souvent limitée en raison d'un effet négatif exercé par la source de carbone. Ce mécanisme de régulation est dit «répression catabolique de carbone(RCC)».

La synthèse de ces métabolites secondaires est généralement sensible à la RCC. Dans les milieux contenant une source de carbone rapidement métabolisable ou source de carbone lentement métabolisable, le premier est d'abord utilisé pour produire des cellules mais peu ou pas de métabolites secondaires qui sont formées après l'épuisement des composés, le deuxième est utilisé pour la production des métabolites (Sanchez et al., 2002).

2. Influence des sources azotées sur la production des antibiotiques

En général, les bonnes sources d'azote sont l'ammoniac, la glutamine et l'asparagine tandis que la proline et l'urée sont qualifiés comme sources d'azotes pauvres. Afin de sélectionner la meilleure source d'azote dans la grande diversité des sources disponibles dans le milieu, les microorganismes développent des mécanismes de détection et de régulation.

La régulation de l'azote est d'une grande importance dans la microbiologie industrielle car elle affecte la synthèse des enzymes impliquées dans le métabolisme primaire et secondaire. Chez les actinomycètes les sels d'ammonium exercent un effet négatif sur la production des antibiotiques (Sanchez et al., 2002).

3. Influence des sources de phosphates sur la production des antibiotiques

Un effet négatif assez spécifique de phosphate inorganique provient dans sa capacité à inhiber et/ou réprimer les phosphatases qui sont des intermédiaires dans certaines voies de biosynthèses des métabolites secondaires (les antibiotiques). Par exemple la biosynthèse de la streptomycine par *streptomyces griseus* comprend au moins trois étapes de clivage et le procédé est très sensible à la concentration de phosphate (Sanchez et al., 2002).

4. Influence du pH, de la température et du temps d'incubation sur la production des antibiotiques

Les conditions de culture comme le pH, la température et le temps d'incubation affectent énormément la production des métabolites secondaires (cité par Smaoui, 2010).

Depuis longtemps, il a été démontré l'influence du pH sur la production de plusieurs métabolites organiques du métabolisme secondaire. Chez *Streptomyces aureofaciens*, le changement de pH pendant le procédé de fermentation peut induire des modifications de l'équilibre entre la production de chlorotétracycline et de la tétracycline dans le milieu de culture ; un pH acide favorise la production de chlorotétracycline alors qu'un pH basique favorise la sécrétion de tetracycline (Asanza-Ternuel et al., 1977).

Le temps est également un facteur important qui affecte la fermentation, son augmentant n'induit pas forcément la production des antibiotiques mais ceci peut contribuer à produire plus de toxines pour inhiber la synthèse de métabolites antimicrobiens (Qin song et *al.*, 2012). En effet, pour la souche *Streptomyces* TN 58, la production de biomolécules commence après 60 heures d'incubation pour atteindre un maximum après 72 heures. Elle reste stable jusqu'à 80 heures puis elle décroît progressivement pour disparaître à partir de 120 heures (Mellouli et *al.*, 2004).

Concernant la température, la gamme correspondante pour la production de l'antibiotique polypeptide est variable d'une espèce à une autre (Mellouli et *al.*, 2004).

Liste des figures

Figure N°	Titre	Page
01	Histogramme de l'activité antimicrobienne de la souche S ₄₆ vis-à-vis des germes cibles testés	20
02	Illustration de l'activité antibactérienne de la souche S ₁₁ vis-à-vis SARM et <i>L. innocua</i> sur les différents milieux	Annexe II
03	Histogramme de l'activité antimicrobienne de la souche S ₁₁ vis-à-vis des germes cibles testés	21
04	Illustration de l'activité antifongique de la souche S ₁₁ vis-à-vis de <i>C. albicans</i> sur les différents milieux	Annexe II
05	Illustration de l'activité antibactérienne de la souche S ₄₆ vis-à-vis <i>L. innocua</i> , SARM et <i>E. coli</i> sur les milieux Williams	25
06	Histogramme de l'activité de la souche S ₄₆ vis-à-vis <i>E. coli</i> , SARM et <i>L. innocua</i> sur 5 milieux Williams	26
07	Histogramme de l'activité antifongique de la souche S ₁₁ à l'égard de <i>C. albicans</i> sur les 12 variantes milieux du GEM	27
08	Illustration de l'activité antifongique de la souche S ₁₁ vis-à-vis <i>C. albicans</i> sur les variantes milieux GEM	27
09	Effet des conditions de culture (coefficients) sur la production d'antifongique par la souche S ₁₁ .	29
10	Graphique d'effet de pH sur la production antibiotiques de la souche S ₁₁	31
11	Graphique d'effet de la température sur la production antibiotiques de la souche S ₁₁	32
12	Graphique d'effet de la concentration en KNO ₃ sur la production antibiotiques de la souche S ₁₁	33
13	Graphique d'effet de la concentration en l'amidon sur la production antibiotiques de la souche S ₁₁	34
14	Graphique d'effet de la concentration en MgSO ₄ sur la production antibiotiques de la souche S ₁₁	35
15	Graphique d'effet de la concentration en K ₂ HPO ₄ sur la production antibiotiques de la souche S ₁₁	36
16	Graphique d'effet de la concentration en NaCl sur la production antibiotiques de la souche S ₁₁	37

Liste des tableaux

Tablea N°	Titre	Page
I	Répartition de quelques genres d'actinomycètes par type d'habitat	4
II	Valeurs extrêmes des paramètres opératoires étudiés de $W_{0,2\%}$.	13
III	Valeurs extrêmes des paramètres opératoires étudiés de GEM.	13
IV	Composition des milieux Williams à 0,2% ($W_{0,2\%}$) et paramètres d'incubation de la souche S_{46} selon la matrice donné par le logiciel «Minitab 16»	14
V	Composition des milieux Gause eau de mer(GEM) et paramètres d'incubation de la souche S_{11} selon la matrice donné par le logiciel« Minitab 16»	15
VI	Matrice donné par le plan Plackett et Burman pour le milieu $W_{0,2\%}$.	16
VII	Matrice donné par le plan Plackett Burman pour le milieu GEM.	17
VIII	Caractéristiques morphologiques des souches S_1 , S_2 , S_4 , S_{11} et S_{46} .	Annexe II
IX	Activité des souches S_1 , S_2 , S_4 , S_{11} et S_{46} à l'égard de divers germes cibles.	Annexe II
X	Caractéristiques morphologiques de la souche S_{11} sur les 12 milieux GEM.	23
XI	Caractéristiques morphologiques de la souche S_{46} sur les milieux $W_{0,2\%}$.	24
XII	Activité de la souche S_{46} vis-à-vis des trois bactéries : <i>Escherichia .coli</i> , <i>Lesteria. innocua</i> et SARM.	Annexe II
XIII	Activité antifongique de la souche S_{11} à l'égard de <i>Candida albicans</i>	Annexe II
XIV	Matrice d'expérience	28
XV	Les valeurs des coefficients de régression.	29

Chapitre II

Matériel et méthodes

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Mycologie de l'université A. MIRA de Bejaia, sous la direction de Mesdames BOUDRIES et ARKOUB, pendant la période allant du 02/2014 au 05/2014.

I. Matériel

I.1. Milieux de culture

Les milieux de culture utilisés sont cités dans l'annexe I.

I.2. Matériel biologique

I.2.1. Microorganismes tests « Actinomycètes »

Les souches d'actinomycètes dénommées S₁, S₂, S₄, S₁₁ et S₄₆ rattachées au genre *Streptomyces* suite à une identification moléculaire des isolats (analyse du gène ADN_r 16S) et appartenant à la collection du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA) sont sélectionnées pour l'étude de leur production d'antibiotiques sur les milieux GEM (Gauss Eau de Mer), MEM (Mincer Eau de Mer), Czapeck_A (avec l'amidon), Czapeck_S (avec le Saccharose), W_{0,2%} et W_{5%} en NaCl (la composition de ces milieux est donnée dans l'annexe I). Ces souches ont été isolées par M^{me} BOUDRIES à partir de l'eau polluée de la région de Bejaia en Janvier 2011.

Selon les résultats d'une sélection de meilleures souches productrices d'antibiotiques sur leur meilleur milieu, deux souches ont fait objet d'une modélisation des paramètres de production d'antibiotiques.

I.2.2. Souches cibles

Six germes cibles sont étudiés pour leur sensibilité aux antibiotiques éventuellement produits par ces souches à savoir quatre bactéries à Gram positif (*Listeria innocua* CLIP 74915 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et SARM ATCC 43300 et *Bacillus subtilis* ATCC 6633), une bactérie à Gram négatif (*Escherichia coli* ATCC 25922) et une levure (*Candida albicans*).

II. Méthodes

Des repiquages sur les milieux GEM, MEM, Czapeck_A, Czapeck_S, W_{0,2%} et W_{5%} des souches S₁, S₂, S₄, S₁₁ et S₄₆ ont été réalisés afin de sélectionner lesquels parmi eux le plus favorable pour la production d'antibiotiques.

II.1. Sélection des souches productrices

Afin de sélectionner les souches productrices d'antibiotiques sur leur milieu favorable, les cinq isolats d'actinomycètes sont ensemencés en stries serrées à la surface des milieux GEM, MEM, Czapeck_A, Czapeck_S, W_{0,2%} et W_{5%}, afin de former un tapis homogène. Après incubation à 28°C pendant 10 jours, le test d'activité est effectué par la méthode des cylindres d'agar vis-à-vis des microorganismes cibles.

- **Test des cylindres d'agar**

La mise en évidence de l'activité antimicrobienne est réalisée par la méthode des cylindres d'agar.

Pour chaque germe cible, un inoculum a été préparé à partir d'une culture de 24 h sur milieu Chapman pour les deux souches *S.aureus* et SARM, et sur le milieu gélose nutritive (GN) pour les autres germes cibles. La charge cellulaire de cet inoculum a été ajustée par dilution dans l'eau physiologique stérile de façon à obtenir une concentration finale de 10⁷ UFC/ml.

Après incubation à 28°C, pendant 10 jours, des cylindres d'agar de 6 mm de diamètre sont découpés stérilement à l'aide d'un emporte-pièce. Ces derniers sont ainsi déposés à la surface du milieu Mueller-Hinton (MH) préalablement ensemencés par écouvillonnage avec le germe cible. Les boîtes de Pétri portant les cylindres d'agar sont mises à 4 °C pendant 2 h pour permettre une prédiffusion des substances bioactives produites par les souches d'actinomycètes étudiées, puis incubées à 37 °C pendant 24 h. La lecture est effectuée par mesure du diamètre des zones d'inhibition (en mm) autour des cylindres d'agar (le diamètre du cylindre étant pris en compte).

II.2. Criblage des paramètres influents sur la production d'antibiotiques

Dans le but de déterminer les paramètres opératoires les plus influents sur la production d'antibiotiques par les deux souches S₄₆ et S₁₁ à savoir; la concentration en amidon, en caséine, en KNO₃, en K₂HPO₄, en NaCl, en MgSO₄, en CaCO₃, le pH et la température pour le milieu W_{0,2%} et la concentration des memes composants et paramètres de culture à

l'exception du CaCO_3 pour le milieu GEM car il ne contient pas ce composé, une modélisation des résultats expérimentaux est réalisée, en utilisant le plan d'expériences de Plackett et Burman. Un logiciel de modélisation est utilisé à cet effet, nommé « Minitab 16 ». Les valeurs extrêmes choisies des différents paramètres opératoires étudiés des deux milieux sont résumées dans les tableaux II et III.

Tableau II : Valeurs extrêmes des paramètres opératoires étudiés du milieu $W_{0,2\%}$

Paramètres opératoires	Notation	Niveau minimal	Niveau maximal
La concentration en amidon (g/l)	Z_1	5	15
La concentration en caséine (g/l)	Z_2	0,15	0,45
La concentration en KNO_3 (g/l)	Z_3	1,25	2,75
La concentration en K_2HPO_4 (g/l)	Z_4	1,25	2,75
La concentration en NaCl (g/l)	Z_5	1,25	2,75
La concentration en MgSO_4 (g/l)	Z_6	0,01	0,09
La concentration en CaCO_3 (g/l)	Z_7	0,01	0,04
pH	Z_8	5,2	9,2
La température ($^\circ\text{C}$)	Z_9	28	37

Tableau III : Valeurs extrêmes des paramètres opératoires étudiés du milieu GEM

Paramètres opératoires	Notation	Niveau minimal	Niveau maximal
La concentration en amidon (g/l)	Z_1	10	30
La concentration en KNO_3 (g/l)	Z_2	1	1,5
La concentration en K_2HPO_4 (g/l)	Z_3	0,5	1
La concentration en NaCl (g/l)	Z_4	0,5	1
La concentration en MgSO_4 (g/l)	Z_5	0,5	1
Le pH	Z_6	5,2	9,2
La température ($^\circ\text{C}$)	Z_7	28	37

Douze milieux de $W_{0,2\%}$ (dénommés W_{01} à W_{12}) et douze milieux de GEM (dénommés G_{01} à G_{12}) de compositions variées sont préparés selon les deux matrices des expériences données par le logiciel « Minitab 16 » pour la modélisation de l'activité antibiotique des deux souches S_{46} et S_{11} (tableau IV et V). Sachant que ces dernières sont ensemencées sur les douze milieux de $W_{0,2\%}$ et GEM respectivement et l'incubation des boîtes est effectuée à 28 ou à 37 °C pendant 10 jours selon la matrice proposée par le Minitab 16.

Tableau IV : Composition des milieux Williams à 0,2% ($W_{0,2\%}$) et paramètres d'incubation de la souche S_{46} selon la matrice donnée par le logiciel « Minitab 16 »

$W_{0,2\%}$	Agar (g /l)	Am (g /l)	Cas (g /l)	KN (g /l)	K_2H (g /l)	NaC (g /l)	MgS (g /l)	FeS (g /l)	CaC (g /l)	pH	T (°C)
W_{01}	18	5	0,15	1,25	2,75	2,75	0,09	0,01	0,01	9,2	37
W_{02}	18	15	0,15	2,75	1,25	1,25	0,01	0,01	0,04	9,2	37
W_{03}	18	5	0,15	1,25	1,25	1,25	0,01	0,01	0,01	5,2	28
W_{04}	18	15	0,45	2,75	1,25	2,75	0,09	0,01	0,01	9,2	28
W_{05}	18	15	0,45	2,75	2,75	1,25	0,09	0,01	0,04	5,2	37
W_{06}	18	15	0,15	2,75	2,75	1,25	0,09	0,01	0,01	5,2	28
W_{07}	18	5	0,15	2,75	2,75	2,75	0,01	0,01	0,04	9,2	28
W_{08}	18	15	0,45	2,75	2,75	2,75	0,01	0,01	0,04	5,2	28
W_{09}	18	15	15	1,25	1,25	2,75	0,09	0,01	0,04	5,2	37
W_{10}	18	15	0,45	2,75	2,75	1,25	0,01	0,01	0,01	9,2	37
W_{11}	18	5	0,45	1,25	1,25	1,25	0,09	0,01	0,04	9,2	28
W_{12}	18	5	0,45	2,75	1,25	2,75	0,01	0,01	0,01	5,2	37

Am : Amidon, Cas : Caséine, KN/ KNO_3 , K_2H : K_2HPO_4 , NaC: NaCl, MgS: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, FeS: $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, CaC : $CaCO_3$.

Tableau V : Composition des milieux Gousse Eau de Mer (GEM) et paramètres d'incubation de la souche S₁₁ selon la matrice donnée par le logiciel « Minitab 16»

GEM	Agar (g /l)	Amidon (g /l)	KNO ₃ (g /l)	K ₂ HPO ₄ (g /l)	NaCl (g /l)	MgSO ₄ , 7H ₂ O (g /l)	FeSO ₄ , 7H ₂ O (g /l)	pH	T(°C)
G ₀₁	20	10	0,5	0,5	0,5	0,5	0,05	5,2	28
G ₀₂	20	10	0,5	1	1	1	0,05	5,2	37
G ₀₃	20	30	0,5	1	1	0,5	0,05	9,2	28
G ₀₄	20	10	1,5	0,5	0,5	0,5	0,05	9,2	37
G ₀₅	20	30	1,5	1	0,5	1	0,05	9,2	28
G ₀₆	20	30	0,5	0,5	0,5	1	0,05	9,2	37
G ₀₇	20	10	0,5	0,5	1	1	0,05	9,2	28
G ₀₈	20	10	1,5	1	0,5	1	0,05	5,2	28
G ₀₉	20	30	0,5	1	0,5	0,5	0,05	5,2	37
G ₁₀	20	30	1,5	0,5	1	0,5	0,05	5,2	28
G ₁₁	20	10	1,5	1	1	0,5	0,05	9,2	37
G ₁₂	20	30	1,5	0,5	1	1	0,05	5,2	37

❖ Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des souches sélectionnées

Après incubation à 28 °C ou 37 °C pendant 10 jours des deux souches d'actinomycètes qui présentent une activité à l'égard au moins d'un germe cible parmi ceux testés, le test d'activité est effectué par la méthode des cylindres d'agar précédemment décrite vis-à-vis des trois bactéries (*Listeria innocua* CLIP 74915, *Escherichia coli* ATCC 25922 et SARM ATCC 43300) pour la souche S₄₆ qui est ensemencée sur les milieux de Williams à 0,2% de NaCl et vis-à-vis d'une levure (*Candida albicans*) pour la souche S₁₁ qui est ensemencée sur les milieux de Gousse Eau de Mer.

III.3. Les matrices des expériences

Le plan de Plackett et Burman est un plan de criblage basé sur des matrices d'Hadamard. En effet, ces dernières sont des matrices carrées dont les éléments sont soit -1 soit +1 et dont le nombre de lignes (ou de colonnes) est multiple de 4.

Les matrices de Plackett et Burman sont intéressantes car elles permettent d'économiser les essais par rapport aux matrices des plans factoriels. Comme pour les plans factoriels, les facteurs des plans de Plackett et Burman ne prennent que deux niveaux et il n'y a généralement pas de point au centre car on ne cherche pas à optimiser les résultats (Goupy, 2005).

Les matrices d'expériences données par le plan de Plackett et Burman des différents milieux sont présentées dans les tableaux VI et VII

Tableau VI : Matrice donnée par le plan de Plackett et Burman pour le milieu $W_{0,2\%}$.

Milieux $W_{0,2\%}$	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	x_7	x_8	x_9
W_{01}	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1
W_{02}	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1
W_{03}	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
W_{04}	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1
W_{05}	+1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1
W_{06}	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1
W_{07}	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1
W_{08}	+1	+1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1
W_{09}	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1
W_{10}	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	+1
W_{11}	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
W_{12}	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1

x_1 : [Amidon], x_2 : [Caséine], x_3 : [KNO₃], x_4 : [K₂HPO₄], x_5 : [NaCl], x_6 : [MgSO₄.7H₂O], x_7 : [CaCO₃] , x_8 : pH, x_9 : temperature.

Tableau VII : Matrice donné par le plan de Plackett Burman pour le milieu GEM.

Milieus GEM	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	x ₅	x ₆	x ₇
G ₀₁	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
G ₀₂	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1
G ₀₃	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1
G ₀₄	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1
G ₀₅	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1
G ₀₆	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1
G ₀₇	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
G ₀₈	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1
G ₀₉	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1
G ₁₀	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1
G ₁₁	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1
G ₁₂	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1

x₁: [amidon], x₂: [KNO₃], x₃: [K₂HPO₄], x₄: [NaCl], x₅: [MgSO₄.7H₂O], x₆ : pH, x₇: temperature.

Le modèle mathématique postulé est un modèle linéaire sans interactions qui s'écrit sous la forme suivante:

$$\hat{y} = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_3 x_3 + \dots + b_j x_j \quad (1)$$

\hat{y} : est l'activité estimée par le modèle.

x₁, x₂, x₃....., x_j sont des variables centrées réduites correspondants respectivement aux variables naturelles Z₁, Z₂, Z₃....., Z_j.

La formule de codage qui permet le passage des variables courantes (variables d'origine) aux variables centrées réduites est la suivante (Ozil, 1997 ; Ravikumar *et al.*, 2005)

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

tels que :

$$Z_j^0 = \frac{Z_{j\max} + Z_{j\min}}{2} \quad (3) \quad \text{et} \quad \Delta Z_j = \frac{Z_{j\max} - Z_{j\min}}{2} \quad (4)$$

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.

Chapitre III

Résultats et discussion

Dans cette partie seront présentés les résultats de la sélection des souches productrices d'antimicrobiens parmi les cinq actinomycètes étudiés S₁, S₂, S₄, S₁₁ et S₄₆. Nous allons également présenter les résultats de la modélisation de la production d'antimicrobiens par deux souches sélectionnées (S₁₁ et S₄₆) par le biais d'un plan d'expériences de Plackett et Burman afin de déterminer les paramètres opératoires qui ont plus d'influence sur l'activité antimicrobienne de ces deux souches.

I. Sélection des souches d'actinomycètes productrices d'antimicrobiens

I.1. Croissance et macromorphologie

les cinq souches S₁, S₂, S₄, S₁₁ et S₄₆ sont ensemencées sur les différents milieux de GEM (Gausse Eau de Mer), MEM (Mincer Eau de Mer), W_{0,2%} (Williams à 5% de NaCl), W_{5%} (Williams à 5% de NaCl), Czapeck_A (avec amidon comme source de carbone), Czapeck_S (avec saccharose comme source de carbone). Les boites de Pétri sont incubées à 28°C et des observations journalières sont effectuées pour toutes les souches et sur les six milieux d'ensemencement. La croissance, le virage de milieu de culture, la couleur du mycélium de substrat ainsi que celui aérien de chacune des souches sur les différents milieux sont notés (le tableau VIII, annexe II).

D'après ces observations, la variation des composés de chaque milieu s'avère influencer la croissance des souches étudiées. Pour les souches S₁, S₂, S₄ et S₁₁ tous les milieux sont favorables pour leur croissance, il en est de même pour la souche S₄₆ à l'exception pour le milieu Czapeck_S qui est moins favorable pour la croissance de cette dernière, la différence remarquable dans la composition de ce milieu est la source de carbone qui est représentée par le saccharose. Dans l'étude réalisée par Oskay en 2011, l'auteur a montré que la croissance de la souche *Streptomyces sp.*KGG32 a été plus favorable avec le milieu additionné d'amidon que celui de saccharose.

I.2. Sélection du meilleur milieu de production d'antibiotique

Afin de sélectionner le meilleur milieu de production d'antibiotiques, l'activité antimicrobienne des isolats S₁, S₂, S₄, S₁₁ et S₄₆ ensemencés sur les six milieux différents est mise en évidence par la technique des cylindres d'agar après dix jours d'incubation à 28°C. Ce test est réalisé sur le milieu Muller-Hinton à l'égard de : *Listeria innocua* CLIP 74915, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, SARM ATCC 43300, *Bacillus subtilis* ATCC 6633,

Escherichia coli ATCC 25922 et *Candida albicans*. Après 24 h d'incubation à 37 °C, le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse.

➤ **Les souches S₁, S₂ et S₄**

Les souches S₁, S₂ et S₄ ensemencées sur les 6 milieux choisis ne présentent aucune activité vis-à-vis de tous les germes cibles testés, donc les milieux utilisés sont favorables pour la croissance des souches mais pas pour la production d'antimicrobiens actifs sur les germes cibles testés (le Tableau IX, annexe II).

➤ **La souche S₄₆**

L'activité antimicrobienne de la souche S₄₆ est notée vis-à-vis de *Escherichia coli* avec les milieux GEM, W_{0,2%} et W_{5%} dont les diamètres des zones d'inhibition sont de 13,13 mm, 27 mm et 10 mm respectivement, de *Listeria innocua* avec les milieux W_{0,2%}, W_{5%} et Czapeck_S avec des zones d'inhibition de 18,65 mm, 17,23 mm et 17,83 mm respectivement et à l'égard de SARM sur les milieux MEM, Czapeck_S, Czapeck_A, GEM et W_{0,2%} avec les diamètres de 7,16 mm, 7,52 mm, 10,84 mm, 12,15 mm et 17,09 mm respectivement (figure 1) ainsi (figure 2, annexe II).

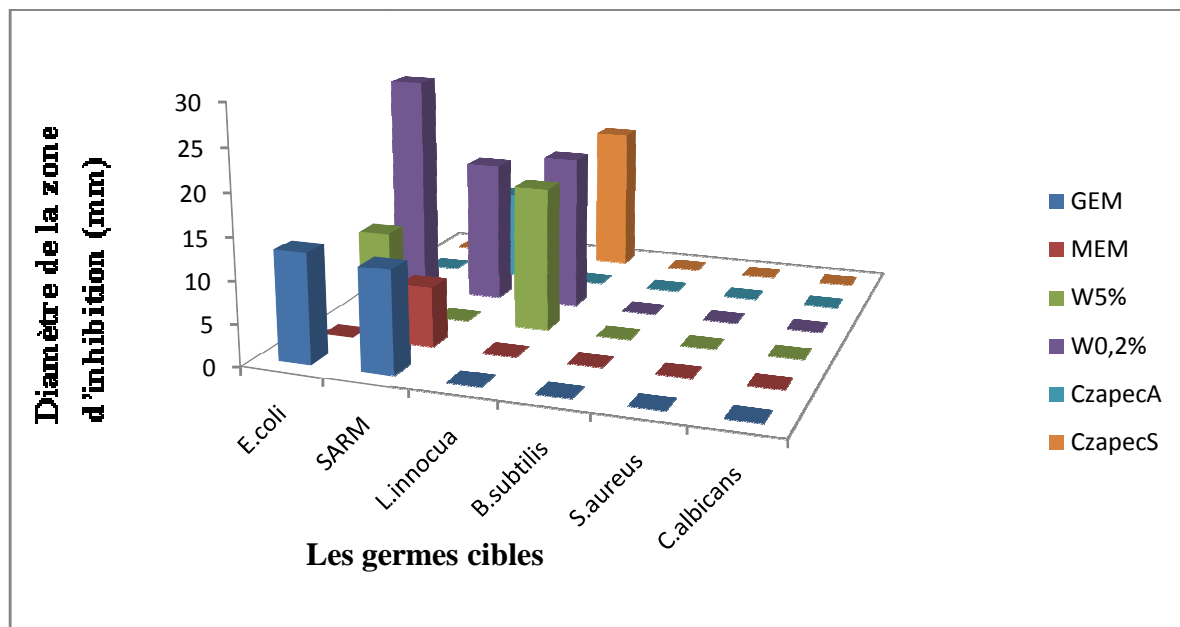


Figure 1 : Histogramme de l'activité antimicrobienne de la souche S₄₆ vis-à-vis des germes cibles testés

Ces résultats montrent que les conditions optimales pour la production des antibiotiques ne sont pas forcément identiques à celles permettant une bonne croissance, ce qui est indiqué par les résultats de test d'activité de la souche S_{46} sur le milieu Czapeck_S. En effet, ce dernier a donné une zone d'inhibition de 17,83 mm vis-à-vis de *Listeria. innocua* alors qu'il est moins favorable pour la croissance. Un résultat similaire a été rapporté par Oskay en 2011 qui a trouvé que la production d'antibiotique par la souche *Streptomyces sp.KGG2* est maximale avec le milieu additionné de saccharose comme source de carbone.

Selon ces résultats, le milieu $W_{0,2\%}$, s'avère être favorable pour la production d'antibactériens par l'isolat S_{46} (activité à l'égard d'*Escherichia .coli*, de SARM et de *Listeria. innocua*).

➤ La souche S_{11}

Son activité est notée vis-à-vis d'un seul germe cible qui est *Candida albicans* sur les trois milieux GEM, Czapeck_S et Czapeck_A et la meilleure production d'antifongique est notée sur le milieu GEM avec un diamètre de la zone d'inhibition de 20,25 mm suivit par 17,29 mm sur le milieu Czapeck_S et la plus faible activité est notée sur le milieu Czapeck_A avec une zone de 10 mm (figure 3) ainsi (figure 4, annexe II).

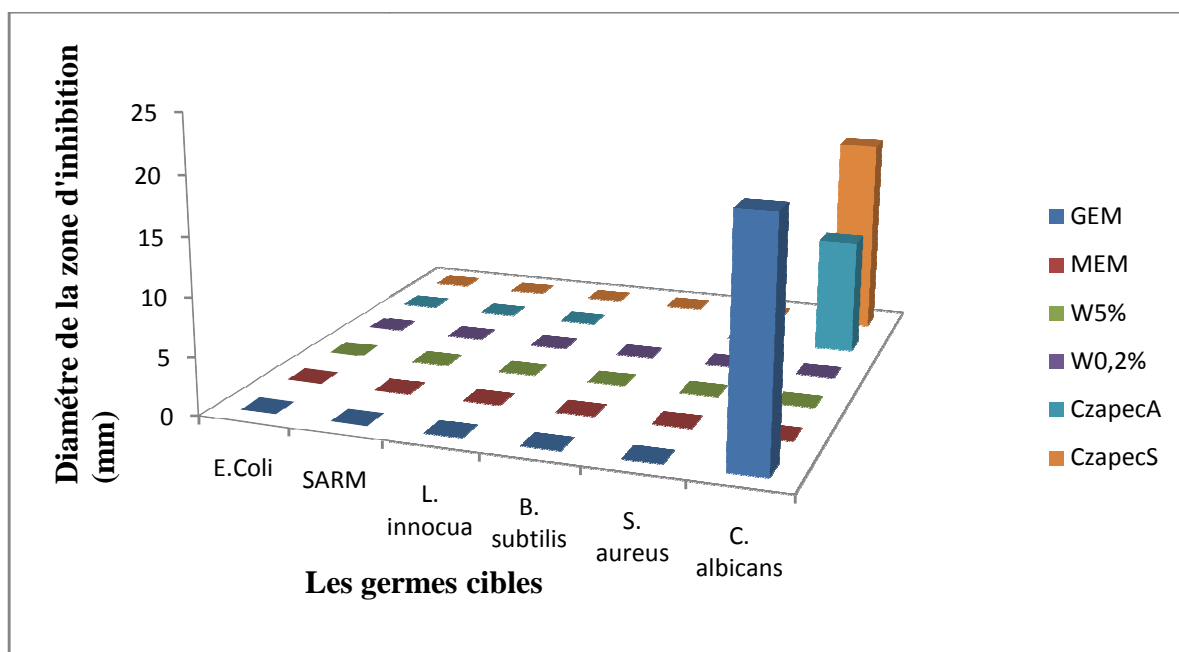


Figure 3 : Histogramme de l'activité antimicrobienne de la souche S_{11} vis-à-vis des germes cibles testés

Les résultats du test d'activité des souches S₁, S₂, S₄, S₁₁ et S₄₆ à l'égard des divers germes cibles sont représentés dans le tableau IX (voir annexe II).

D'après les résultats de l'activité antimicrobienne de la souche S₄₆ sur le milieu W_{0,2%} à l'égard des trois bactéries à savoir *Escherichia coli*, *Listeria innocua* et SARM et l'activité antifongique de la souche S₁₁ vis-à-vis de *Candida albicans* permettent la sélection de ces deux isolats pour une modélisation par l'application d'un plan d'expériences de Plackett et Burman. Le milieu GEM est choisi pour ce test suite à son aptitude pour la production de molécules antifongique (de la souche S₁₁ vis-à-vis de *C. albicans*).

II. Suivi des souches sélectionnées S₄₆ et S₁₁









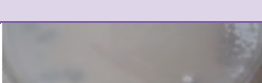



II.1. Croissance sur les milieux sélectionnés

➤ La souche S₁₁

Douze milieux de GEM donnés par le plan de Plackett et Burman sont ensemencés avec la souche S₁₁ et incubés à 28 °C ou à 37 °C selon la matrice du plan, et ce pendant 10 jours. La souche présente une bonne croissance sur les huit milieux GEM (G₀₃, G₀₄, G₀₅, G₀₆, G₀₇, G₁₁ et G₁₂), une croissance modérée sur les trois milieux (G₀₁, G₀₂ et G₁₀) et aucune croissance n'est observée sur les deux milieux (G₀₈ et G₀₉).

D'après ces observations, il ressort que la variation de la concentration des composés des milieux GEM ainsi que les conditions de culture choisis (pH et température) s'avèrent influencer la croissance de la souche S₁₁. En effet, la composition des milieux G₀₃, G₀₄, G₀₅, G₀₆, G₀₇, G₁₁ et G₁₂ est favorable pour la croissance de cette dernière, celle des milieux G₀₁, G₀₂ et G₁₀ est moins favorable alors que les deux milieux G₀₈ et G₀₉ sont défavorables pour sa croissance.

Tableau X : Caractéristiques morphologiques de la souche S₁₁ sur les 12 milieux GEM.




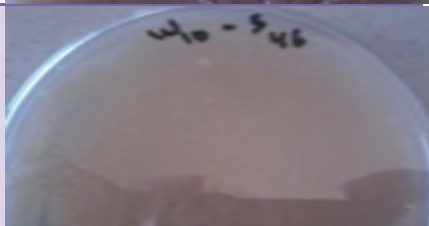

Les milieux	croissance	Mycélium aérien	Mycélium de substrat	Pigment diffusion	Les figures
G ₀₁	+	Blanc	Marron	/	
G ₀₂	++	Jaune	Jaune	/	
G ₀₃	++++	Blanc	Beige-crème	/	
G ₀₄	++++	Blanc	Beige crème	/	
G ₀₅	++++	Blanc	Marron	/	
G ₀₆	++++	Blanc	Blanc	/	
G ₀₇	+++	Blanc	Blanc	/	
G ₀₈	0	0	0	0	
G ₀₉	0	0	0	0	
G ₁₀	++	Blanc	Marron	/	
G ₁₁	++++	Blanc/ Jaune	Beige crème	/	
G ₁₂	++++	Blanc	Marron	/	

++++ : Très bonne croissance, +++ : bonne croissance, ++ : croissance moyenne, + : faible croissance, / : pas de pigment, 0 : pas de croissance

➤ La souche S₄₆

A cause des problèmes de contaminations des milieux que nous avons rencontrés au cours de cette partie, seulement cinq milieux de Williams parmi les douze ensemencés par la souche S₄₆ ont pu être analysés. Au bout de 10^{ème} jours d'incubation à 28 ou à 37 °C (selon la matrice du plan d'expériences) nous avons noté que la souche S₄₆ présente une bonne croissance sur les cinq milieux W₀₂, W₀₄, W₀₇, W₁₀ et W₁₁ avec la présence de différents aspects morphologiques qui sont consignés dans le tableau XI.

Tableau XI : Caractéristiques morphologiques de la souche S₄₆ sur les milieux W_{0,2%}.

Les milieux	Croissance	Mycélium aérien	Mycélium de substrat	Pigment diffusion	Les figures
W ₀₂	++++	Beige-crème	Jaune	/	
W ₀₄	++++	Beige-crème	Jaune claire	Marron claire	
W ₀₇	++++	Marron claire	Jaune foncé	/	
W ₁₀	++++	Beige-crème	Jaune claire	/	
W ₁₁	++++	Beige-crème	Beige-crème	Marron claire	

++++ : Très bonne croissance, / : pas de pigment.

II.2. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des deux souches sélectionnées

L'activité antimicrobienne est mise en évidence par la méthode des cylindres d'agar qui permet de détecter l'effet inhibiteur des souches d'actinomycètes envers les germes cibles testés. Ce test est réalisé sur le milieu Muller-Hinton vis-à-vis de trois bactéries à savoir *Escherichia .coli*, *Listeria. innocua* et SARM pour la souche S₄₆ et à l'égard de la levure *Candida albicans* pour la souche S₁₁. après 24 h d'incubation à 37 °C, le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré autour des cylindres pour les deux souches S₁₁ et S₄₆.

➤ La souche S₄₆

Les figures 5 et 6 montrent que la souche S₄₆ présente une activité antibactérienne sur les milieux W₀₂, W₀₄, W₀₇, W₁₀ et W₁₁ vis-à-vis de : SARM avec des diamètres des zones d'inhibition de 17,04 mm, 27,93 mm, 11,65 mm, 17,47 mm et 11,74 mm respectivement, *Listeria. innocua* avec des diamètres des zones d'inhibition de 15,22 mm, 28,31 mm, 9,48,16,00 mm et 09,18 mm respectivement et de *Escherichia .coli* dont les diamètres sont de 13,68, 28,16, 08,08, 13,42, 08,71 mm respectivement. Comme l'activité de la souche S₄₆ n'a eu lieu que sur cinq milieux à cause des problèmes de contaminations rencontrés, cette dernière n'a pas été modélisée. Les résultats du test d'activité de la souche S₄₆ vis-à-vis des trois bactéries : *Escherichia .coli*, *Listeria. innocua* et SARM sont regroupés dans le tableau XII (Annexe II).

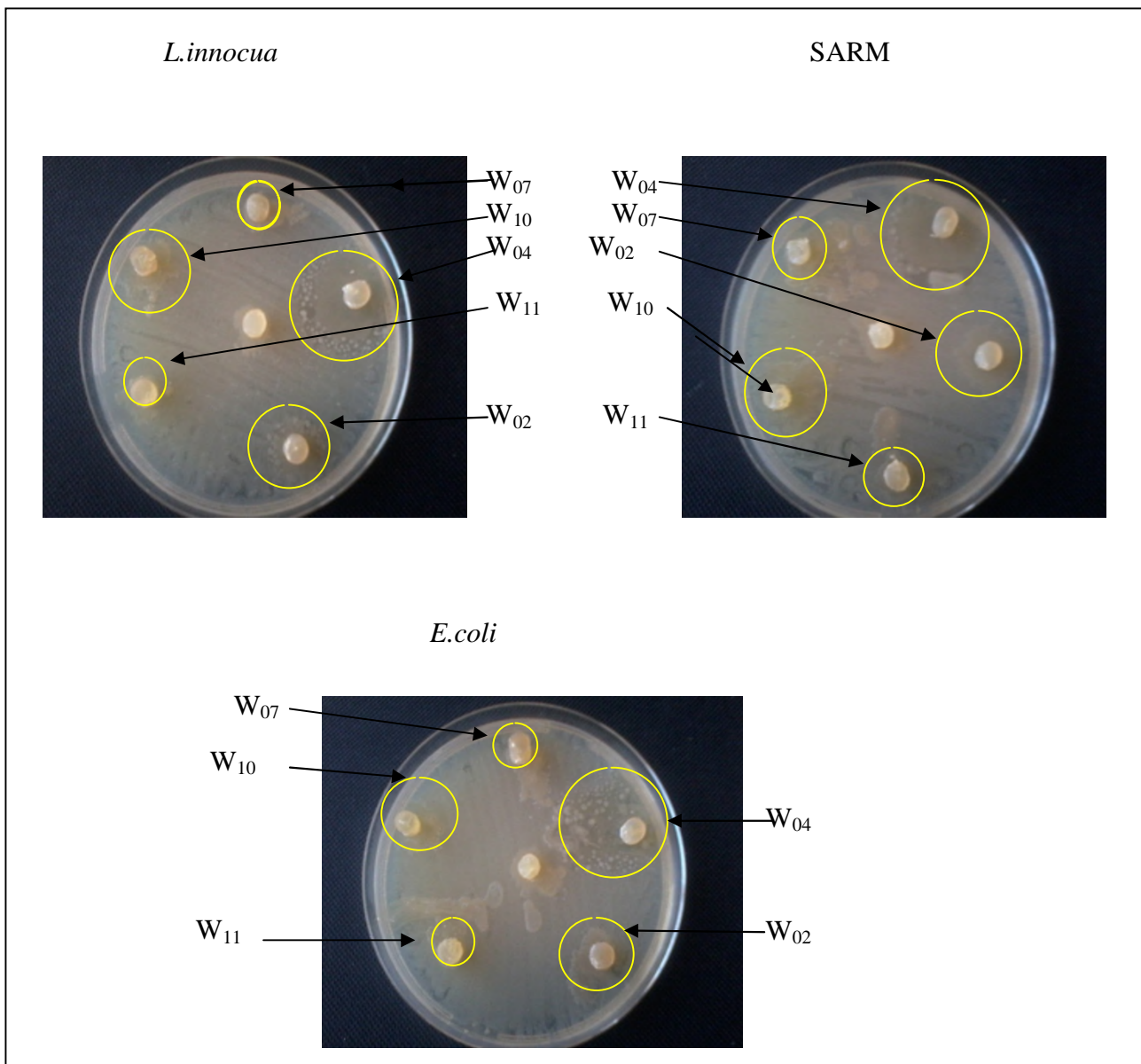


Figure 5 : Illustration de l'activité antibactérienne de la souche S_{46} vis- à- vis *L.innocua*, SARM et *E.coli* sur les milieux

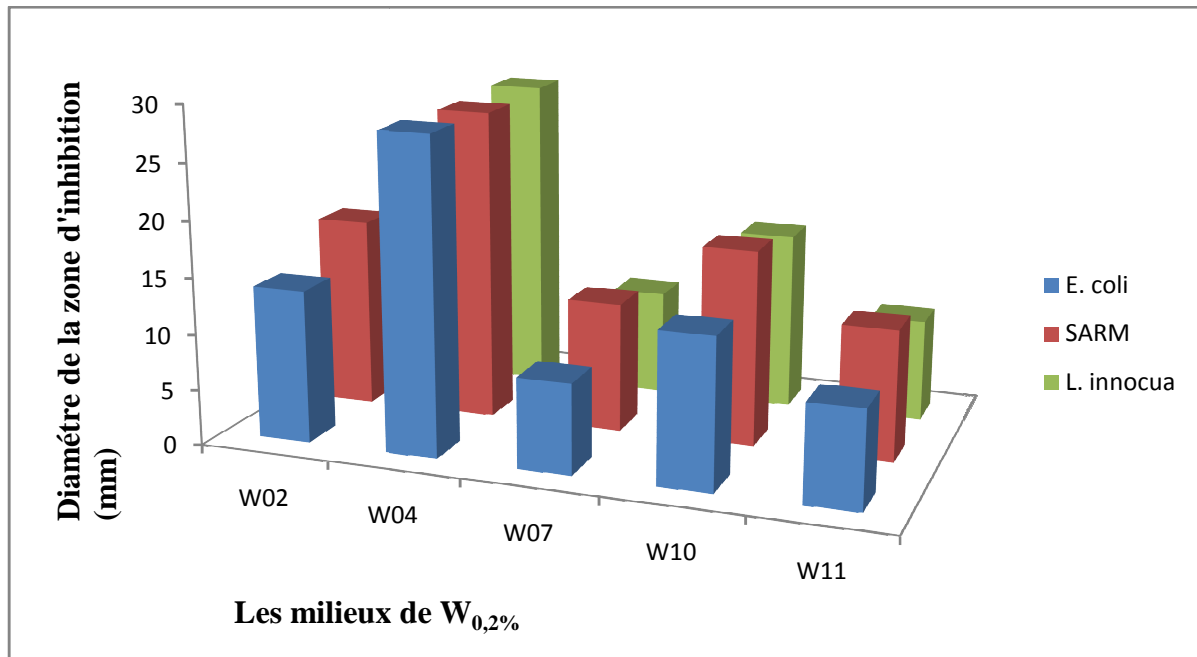


Figure 6 : Histogramme de l'activité antibactérienne de la souche S_{46} vis- à- vis *E. coli*, SARM et *L. innocua* sur 5 milieux Williams

Les résultats du test des cylindres d'agar des 5 milieux Williams testés révèlent une activité antibactérienne à l'égard des trois germes utilisés. En revanche, la meilleure activité est notée pour le milieu W_{04} suivi du W_{10} , W_{02} , W_{11} puis W_{07} .

➤ La souche S_{11}

Son activité est notée sur les milieux G_{01} , G_{03} , G_{04} , G_{05} , G_{07} et G_{11} avec une meilleure production antifongique sur le milieu G_{07} de 20,75 mm de diamètre de la zone d'inhibition suivi du milieu G_{03} avec une zone de 18,34 mm, puis le G_{01} avec une zone de 18,02 mm et une très petite zone d'inhibition est mesurée sur le milieu G_{11} dont le diamètre est de 8,01mm. Les deux milieux G_{08} et G_{09} sont défavorables pour la croissance de la souche S_{11} . Ce qui implique dans ce cas que son activité est nulle.

Les résultats de l'activité de la souche S_{11} à l'égard de *Candida albicans* s'avèrent suffisants pour la modélisation afin de déterminer les facteurs les plus influents sur la production antifongique de cette dernière. Les résultats de test d'activité sont présentés dans le tableau XIII (Annexe II) et les figures 7 et 8.

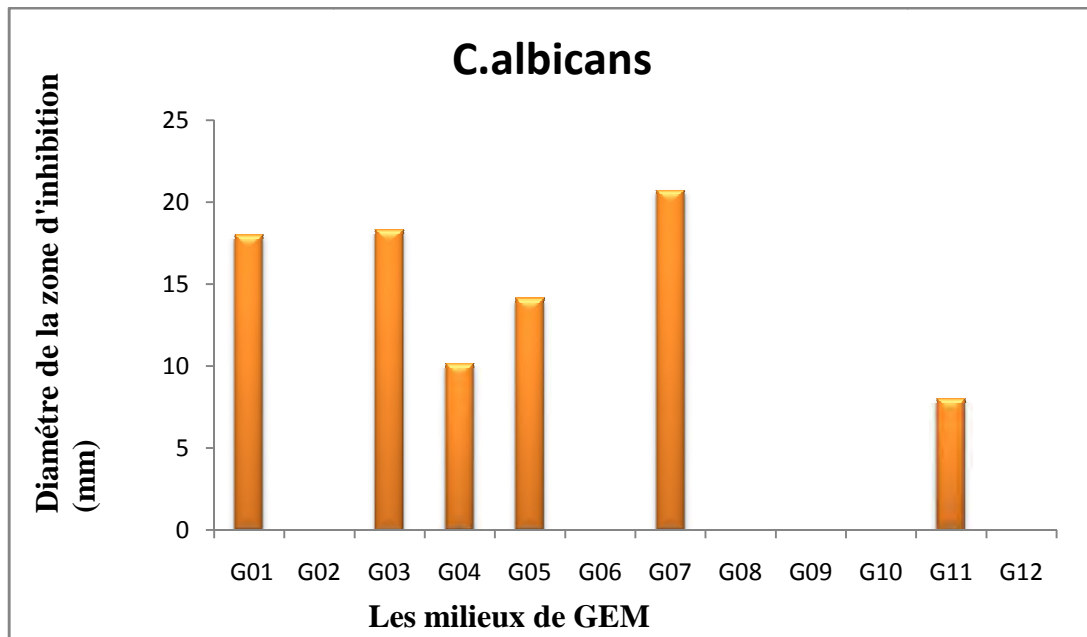


Figure 7 : Histogramme de l'activité antifongique de la souche S₁₁ à l'égard de *C.albicans* sur les 12 variantes milieux du GEM

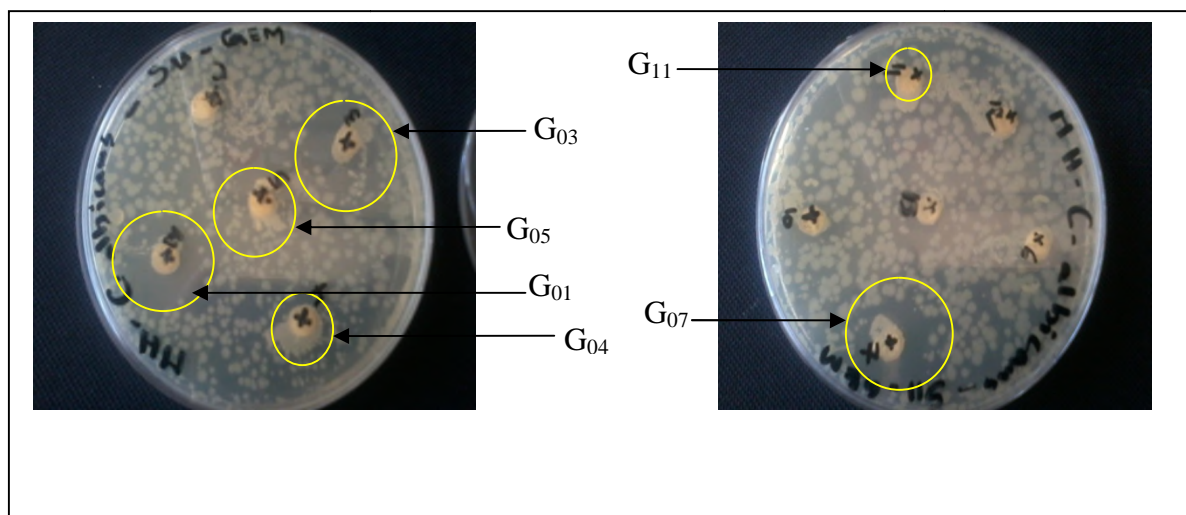


Figure 8: Illustration de l'activité antifongique de la souche S₁₁ vis-à-vis *C. albicans* sur les variantes milieux du GEM

II. 3 : Modélisation de l'activité antifongique de la souche S₁₁ par un plan d'expériences de Plackett et Burman

Les paramètres opératoires ($Z_1, Z_2, Z_3, \dots, Z_7$) considérés pour la modélisation de l'activité antifongique de la souche S₁₁ vis-à-vis *C. albicans* sont respectivement : la concentration en amidon, en KNO₃, en K₂HPO₄, en NaCl, en MgSO₄, 7H₂O et aussi le pH du milieu et la température.

Pour sept facteurs opératoires ($k=7$), le plan d'expériences de Plackett et Burman nécessite de réaliser douze essais ($N= 12$). Les résultats de l'activité antifongique (y) de la souche S_{11} vis- à- vis *Candida albicans* sur les douze milieux GEM à différentes conditions expérimentales sont regroupés dans le tableau XIV qui représente la matrice d'expériences.

Tableau XIV : Matrice d'expériences

Milieux GEM	x_0	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	x_7	y (mm)
G_{01}	+1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	18,02
G_{02}	+1	-1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	0
G_{03}	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	18,34
G_{04}	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	10,17
G_{05}	+1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	14,16
G_{06}	+1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	0
G_{07}	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	20,75
G_{08}	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	0
G_{09}	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	0
G_{10}	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	0
G_{11}	+1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	18,01
G_{12}	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	0

II.3. 1. Calcul des coefficients du modèle de régression

Les coefficients b_j de l'équation de régression sont obtenus par le logiciel « Minitab 16 ». Les valeurs de ces derniers sont consignées dans le tableau XV et représentés par la figure 9.

Tableau XV : Valeurs des coefficients de modèle

Terme constant	Effets linéaires						
	b ₁	b ₂	b ₃	b ₄	b ₅	b ₆	b ₇
7,454	-2,038	-2,064	-0,702	0,396	-1,636	4,451	-4,424

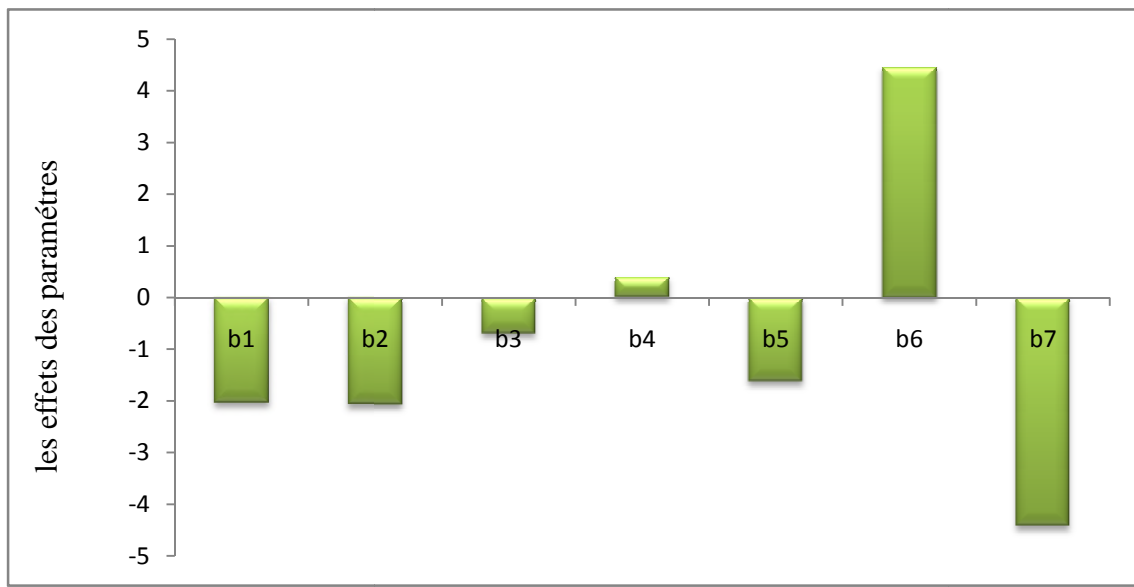


Figure 9 : Effet des conditions de culture (coefficients) sur la production antifongique de la souche S₁₁

L'équation de régression s'écrit donc comme suit :

$$\hat{y} = 7,454 - 2,038 x_1 - 2,064 x_2 - 0,702 x_3 + 0,396 x_4 - 1,636 x_5 + 4,451 x_6 - 4,424 x_7 \dots (3)$$

II. 3. 2 : Etude des effets des différents paramètres sur la production antifongique de la souche S₁₁

D'après le modèle obtenu (équation 3) par l'application d'un plan d'expériences de Plackett et Burman, on remarque que les facteurs qui ont plus d'influence sur l'activité antifongique en ordre décroissant sont: le pH (x₆), la température (x₇), le KNO₃ (x₂), l'amidon (x₁), MgSO₄ (x₅), K₂HPO₄ (x₃) et enfin le NaCl (x₄).

Les paramètres opératoires qui ont une influence positive sur la production d'antifongique de la souche S₁₁ sont le pH (x₆) avec un effet de (+4,451) et la concentration en NaCl (x₄) avec un effet de (+0,396). Le signe (+) de ces derniers indique que leur

augmentation favorise celle de l'activité antifongique (la production antifongique), alors que les paramètres opératoires qui ont une influence négative sur la réponse sont les suivants : la température (x_7) avec un effet de (-4,424), la concentration en KNO_3 (x_2) avec un effet de (-2,064), la concentration en amidon (x_1) avec un effet de (-2,038), la concentration en $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (x_5) avec un effet de (-1,636) et la concentration en K_2HPO_4 (x_3) avec un effet de (0,702). Le signe (-) de ces derniers désigne que leur augmentation du niveau minimal (-1) au niveau maximal (+1) de chacun d'eux favorise la diminution de la production antifongique.

➤ Effet de pH

D'après le modèle obtenu, le pH (x_6) est le facteur qui a un effet le plus important donc il est le plus influent sur la production d'antifongique de la souche S_{11} et son influence est positive sur cette dernière. En effet, l'augmentation de la valeur de pH dans la gamme de [5,2 à 9,2] fait augmenter l'activité antifongique de la souche S_{11} (figure 10). Ce résultat est similaire avec les travaux de Maha et collaborateurs en 2001, sur la souche *Streptomyces violatus*, ainsi que ceux d'Oskay en 2011, avec la souche *Streptomyces sp.KGG32* et de Sing et collaborateurs en 2009, avec la souche *Streptomyces tanashiensis* A2D.

Les études réalisées par Samer et Al- Hulu en 2013, avec la souche *Streptomyces spp* dont la gamme de pH est de 6 à 8, Mangamuri et collaborateurs en 2014, avec la souche *Streptomyces tritolerans* DAS 165 dont la gamme de pH testée est de 5 à 10, Vijayabharathi et collaborateurs en 2012, avec la souche *Streptomyces aurantiacus* AAA5 pour une gamme de pH testée est de 6 à 11 et Thakur et collaborateurs en 2009, avec *Streptomyces sp.201* pour un pH allant de 5 à 10, ont montrés que la meilleure production d'antibiotique est obtenu à pH neutre. Dans une autre étude réalisée par Jicheng yn et collaborateurs en 2008, avec la souche *Streptomyces rimosus* MY02, une meilleure production d'antifongique est obtenu à pH= 6, la gamme de pH utilisée est de 3,5 à 8,5.

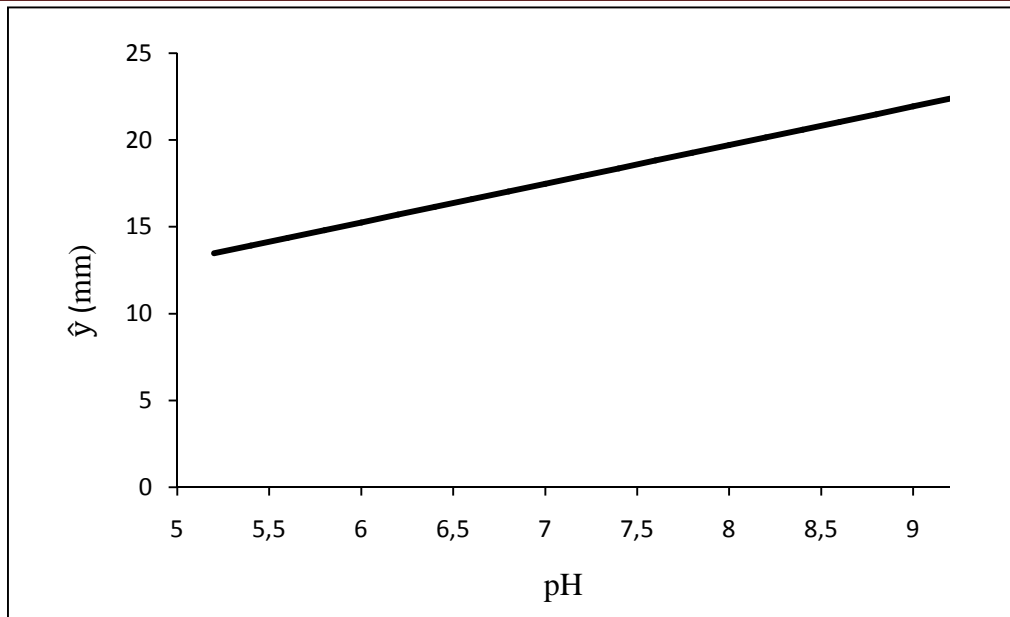


Figure 10 : Graphique d'effet de pH sur la production antibiotiques de la souche S₁₁

➤ Effet de la température

Le second facteur le plus influent est la température (x_7) avec une influence négative sur la production d'antifongiques par la souche S₁₁ (Figure 11). En effet, l'augmentation de la température dans la gamme de [28 à 37°C] fait diminuer l'activité antifongique. Ces résultats sont similaires avec ceux obtenus par Maha et collaborateurs en 2001, avec la souche *Streptomyces violatus*, Thakura et collaborateurs en 2009, avec la souche *Streptomyces sp.201* et Zidan et collaborateurs en 2012, avec la souche *Streptomyces sp.PT1*. Ces derniers ont montrés que l'incubation à des températures supérieures à 35°C a un effet négatif sur la production d'antibiotiques. L'étude réalisée par Kavitha et Vijayalakshmi en 2009, montre que la production de validamycine par *Streptomyces hygrosopicus* 5008 est importante entre 35 et 37 °C.

Jicheng Yu et collaborateurs en 2008, ont prouvés que la souche *Streptomyces rimosus* MY02 qui a été cultivée entre 20 à 35 °C a donné une meilleure activité antifongique à 28°C. Augustine et collaborateurs en 2005, qui ont travaillé avec la souche *Streptomyces rochei* AK39 ont montré que la production optimale d'antifongiques a été obtenue à 37°C. Concernant l'étude réalisée par Al Sersy et Abou-Elela en 2006, ces auteurs ont trouvés que la production la plus élevée d'antibiotiques par la souche *Nocardia brasiliensis* été observée à une température de 40 °C dont la gamme de température exploitée est de 20 à 40°C.

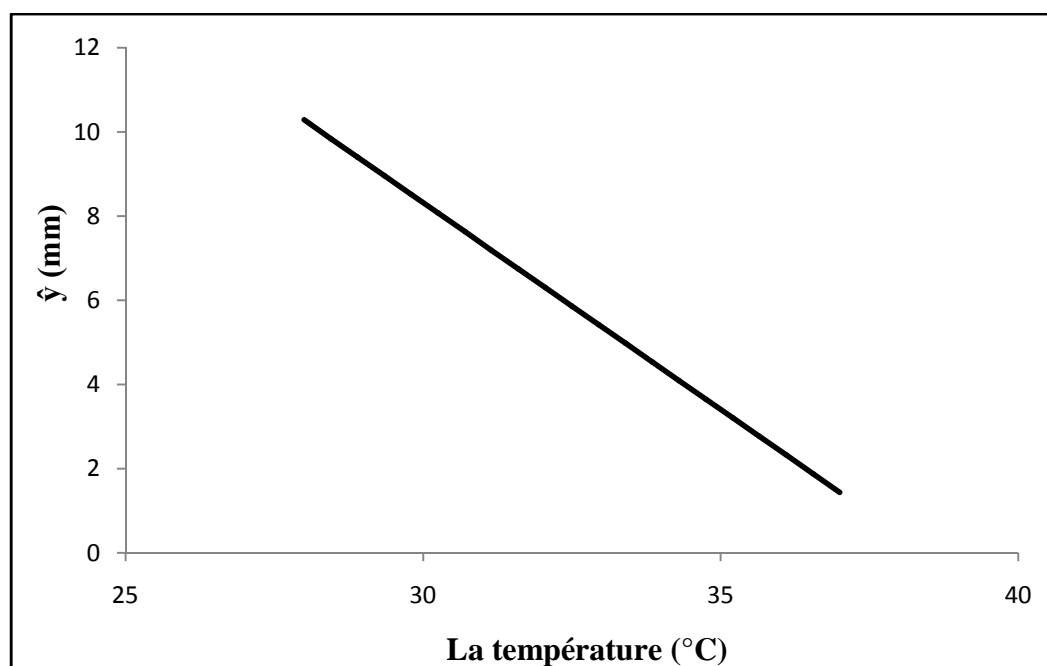


Figure 11 : Graphique d'effet de la température sur la production antibiotiques de la souche S_{11}

➤ **Effet de KNO_3**

Le concentration en KNO_3 (x_2) est le troisième facteur le plus influent sur la réponse (l'activité antifongique de la souche S_{11}) et présente un effet négatif (comme c'est montré sur la figure 12) ce qui traduit la diminution de la production antifongique de la souche lorsque la concentration de KNO_3 passe de son niveau minimal (0,5 g/l) à celui maximal (1,5 g/l). le même résultat est obtenu par Al Sersy et Abou-Elela en 2006, dans la gamme de 0,5 à 1,5 g/l. Contrairement aux résultats obtenus par Wang et collaborateurs en 2010, qui ont trouvés dans leur cas que la concentration de KNO_3 a un effet positif sur la production d'antimicrobiens par la souche *Xenorhabdus ssp* . Les résultats obtenus par Maha et collaborateurs en 2001, avec la souche *Streptomyces violatus*, Vijayakumar et collaborateurs en 2011, avec la souche *Streptomyces.sp* VTPS3-1, Houssam et collaborateurs en 2011, avec la souche *Streptomyces rimosus* AZ-146 et Kavitha et collaborateurs en 2009, avec la souche *Nocardia luvis* NK-VL-113 ont montrés que le KNO_3 est la meilleure source d'azote pour la production d'antibiotiques.

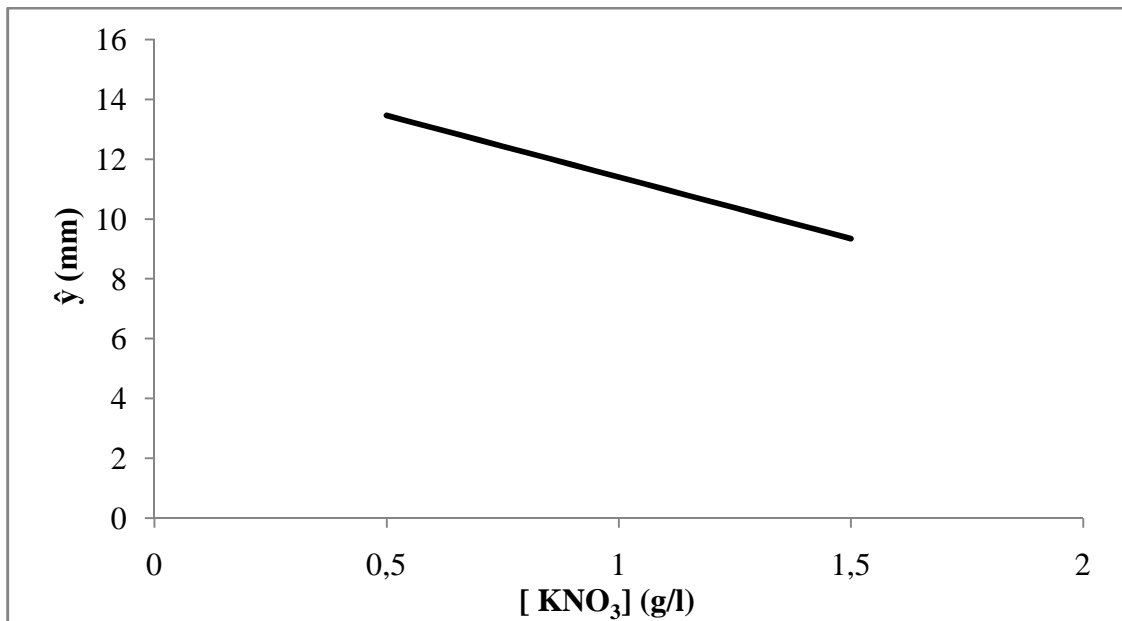


Figure 12 : Graphique d'effet de la concentration en KNO₃ sur la production antibiotiques de la souche S₁₁

➤ **Effet de l'amidon**

Le quatrième facteur important est la concentration de l'amidon (x_1) qui présente un effet négatif (figure 13) sur la production d'antifongique par la souche S₁₁, ce qui implique que l'augmentation de la concentration d'amidon dans la gamme testée [10 à 30 g/l] fait diminuer l'activité antifongique produite par la souche S₁₁. Ces résultats sont similaires avec ceux de Al Sersy et Abou-Elela en 2006, (la gamme d'amidon est de 15 à 25 g/l) qui ont trouvé que l'amidon a un effet négatif sur la production de métabolite par *Nocardia brasiliensis*, de même que par Pandey et collaborateurs en 2005, qui ont montré que l'amidon avec une concentration de 1,5% est une source de carbone faible pour la production d'antibiotique par la souche *Streptomyces kanamyceticus* M27. Les travaux de Houssam et collaborateurs en 2011, sur la souche *Streptomyces rimosus* AZ-146, de Siddique et collaborateurs en 2013, sur la souche *Streptomyces avermitilis* 41445, de Yassin et collaborateurs en 2006, sur la souche *Streptomyces kanamyceticus* EHE-68 et de Zitouni et collaborateurs en 2005, sur la souche *Saccharothrix sp.*SA103, ont montré que l'amidon est la meilleure source de carbone pour la production d'antibiotiques. Les résultats de Singh et collaborateurs en 2009, montrent que l'amidon à une concentration de 1% a un effet positif sur la production d'antibiotiques par la souche *Streptomyces tanashiensis* A2D.

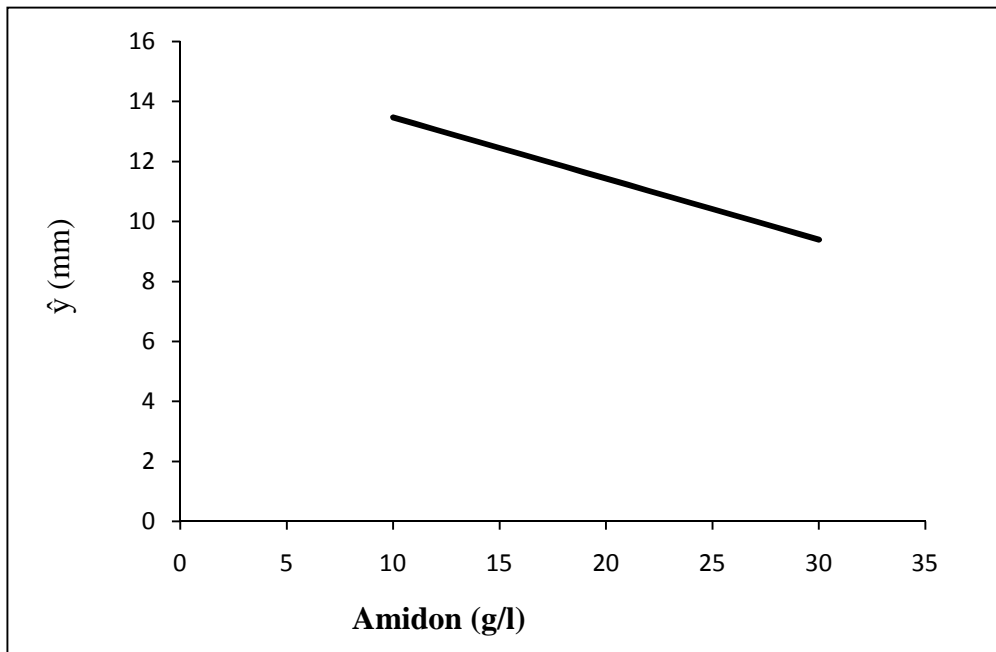


Figure 13 : Graphique d'effet de la concentration en amidon sur la production antibiotiques de la souche S₁₁

➤ **Effet de MgSO₄, 7H₂O**

La concentration en MgSO₄, 7H₂O (x_5) est le cinquième facteur qui influence l'activité, ce dernier présente un effet négatif (figure 14). L'augmentation de la concentration de MgSO₄, 7H₂O dans la gamme de [0,5 g/l à 1 g/l] fait diminuer l'activité de la souche S₁₁. Contrairement à nos résultats, Ripa et collaborateurs en 2009 ont montrés que la concentration en MgSO₄, 7H₂O a un effet positif sur la production d'antibiotique par *Streptomyces sp.* RVPDA-08PR avec un optimum à 0,05%.

Dans l'étude réalisée par Maha et collaborateurs en 2001, les auteurs ont trouvé que la concentration de 0,5 g/l de MgSO₄, 7H₂O est une valeur optimale pour la production d'antibiotiques par la souche *Streptomyces violatus* dans la gamme de la concentration de MgSO₄, 7H₂O est de 0,5 à 4 g/l. El-Sersy et Abou-elela en 2006, ont trouvé que le MgSO₄, 7H₂O à une concentration de 0,5% est le facteur qui affecte la production des agents bioactifs par la souche *Nocardia brasiliensis* dont la gamme testée est de 0,25 à 1,5 g/l.

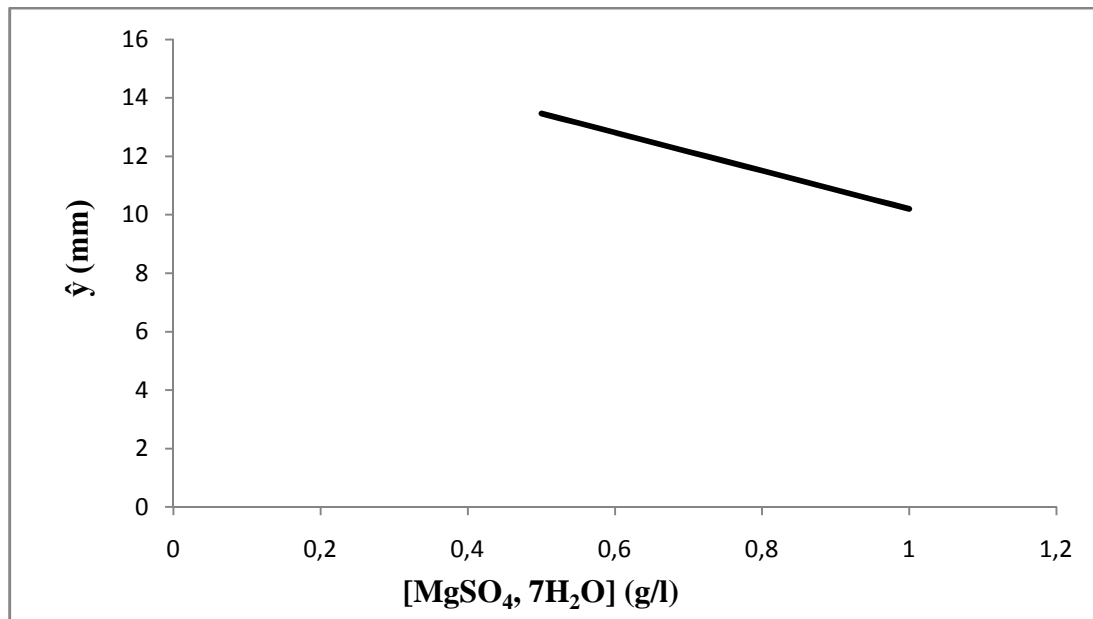


Figure 14 : Graphique d'effet de la concentration en MgSO₄, 7H₂O sur la production antibiotiques de la souche S₁₁

➤ Effet de K₂HPO₄

La concentration en K₂HPO₄ (x₆) est le sixième facteur qui influence la production antifongique de la souche S₁₁, il est de signe négatif (figure 15) ce qui traduit la diminution de la production antifongiques lorsque la concentration de K₂HPO₄ passe de sa valeur minimale (0,5 g/l) à la valeur maximale (1 g/l).

Ces résultats sont similaires à ceux de El-Sersy et Abou- Elela en 2006, sur la production des métabolites par *Nocardia basiliensis* dont la gamme est de 0,25 à 1,5 g/l. contrairement à nos résultats, nous citons les travaux de Ripa et collaborateurs en 2009, sur la souche *Streptomyces sp.*RVPDA-08PR et Kavitha et Vijayalakshmi en 2009, sur la souche *Nocardia levis*. MK-VL-113. Ainsi que d'autres études réalisées par Yassin et collaborateurs en 2006, qui ont trouvé qu'à une concentration de 1 g/l de K₂HPO₄, la production d'antifongique est maximale par la souche *Streptomyces kanamyceticus*. EHE-68 et Vilches et collaborateurs en 1990, qui ont montré que la production d'oléandomycine par *Streptomyces antibioticus* n'est pas soumit à l'effet du phosphate dans la gamme de 0 à 5 g/l.

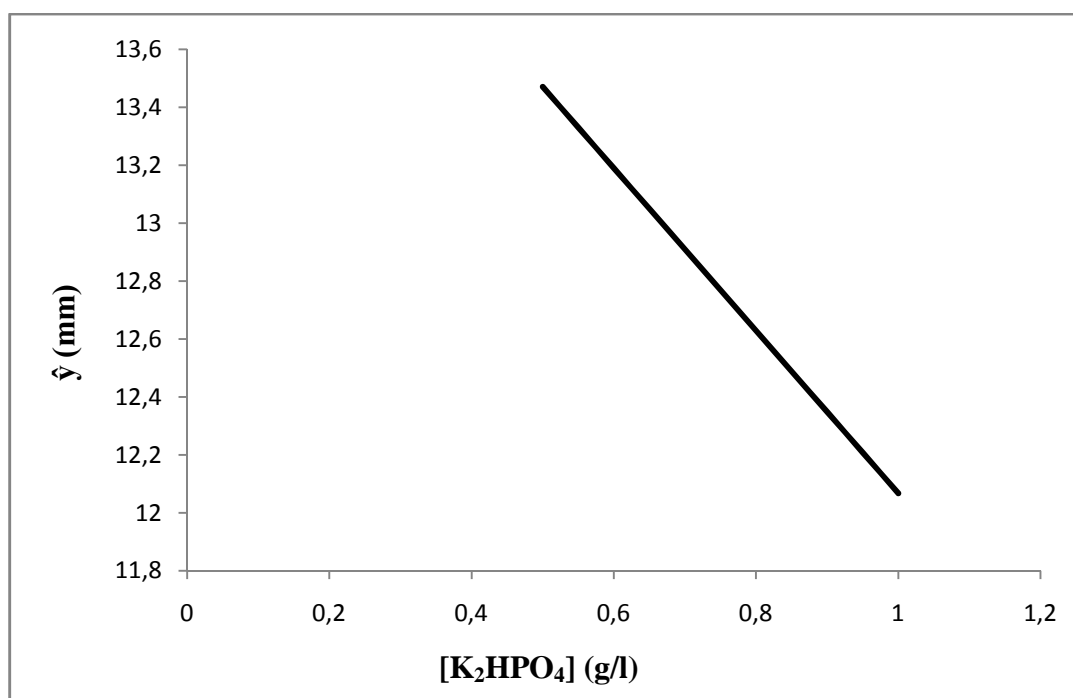


Figure 15 : Graphique d'effet de la concentration en K_2HPO_4 sur la production antibiotique de la souche S_{11}

➤ **Effet de NaCl**

La concentration en NaCl (x_7) est le dernier facteur qui influence la production d'antifongique par l'isolat S_{11} , il a un effet positif (figure 16) et affecte légèrement l'activité antifongique de la souche étudiée, c'est-à-dire que l'augmentation de NaCl dans la gamme 0,5g/l à 1g/l fait augmenter légèrement la production antifongique de [13,471 mm à 14,263 mm].

Ces résultats sont similaires avec ceux obtenus par Ripa et collaborateurs sur la souche *Streptomyces sp.*RUPA-08PR qui ont montré que le NaCl a un effet positif sur la production d'antifongique et ceux obtenus par Wang et collaborateurs en 2010, qui ont trouvé que le NaCl favorise la production antimicrobienne de la souche *Xenochabdus ssp.* Cependant, El-Sersy et Abou-Elela en 2006, ont trouvé que l'augmentation de NaCl fait diminuer la production des métabolites par la souche *Nocardia basiliensis* dans la gamme allant de 0 à 0,75 g/l.

Les travaux de Zidan et collaborateurs en 2012, qui ont montré que le NaCl affecte la production antibiotique de la souche *Streptomyces sp.*PT1 d'une manière significative dans la gamme de 1 à 2 g/l alors que notre étude a montré que le NaCl est le facteur le moins significatif parmi les 7 facteurs étudiés alors qu'une autre étude réalisée par Kavitha et

Vijayalakshmi en 2009, a montré que NaCl n'a aucun effet sur la production de la néomycine par la souche *Nocardia levis* MK-VL-113 à une concentration de NaCl de 0,05%.

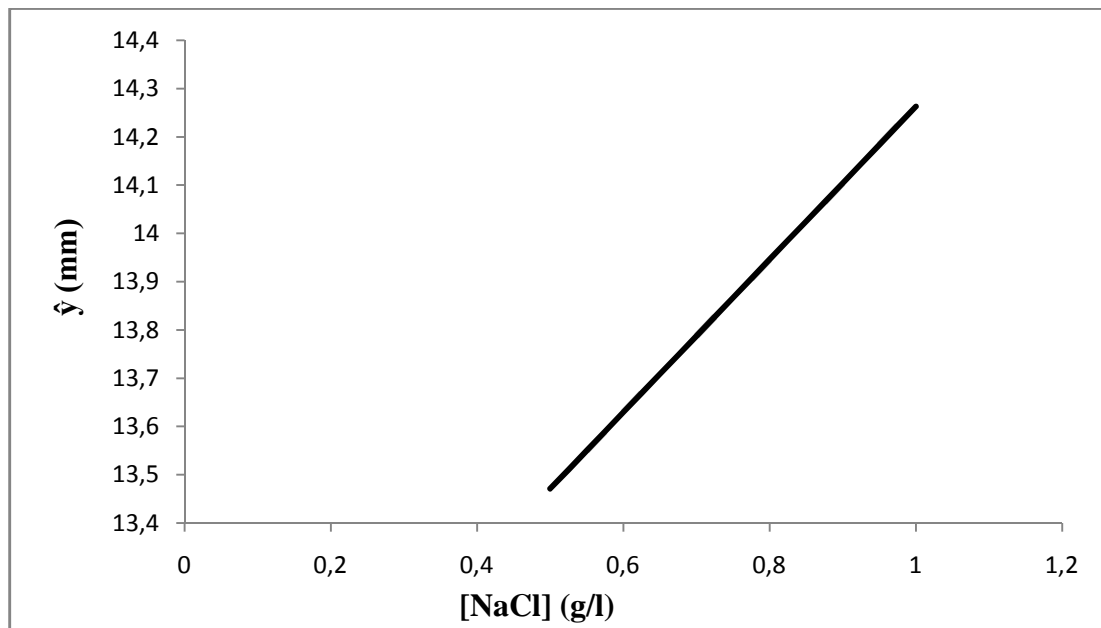


Figure 16 : Graphique d'effet de la concentration en NaCl sur la production antibiotiques de la souche S₁₁

La production microbienne de métabolites secondaires est extrêmement sensible à des facteurs environnementaux et aux sources nutritionnelles. Par exemple, la production in vitro de la plupart des antibiotiques dépend de la composition de milieu de culture dans lequel l'organisme producteur est développé (E-lattal et al, 2011).

Conclusion et perspectives

Dans le but de déterminer les facteurs les plus influents sur la production d'antibiotiques par les deux souches S_{11} et S_{46} sur les 12 milieux de GEM et les 12 milieux de $W_{0,2\%}$ respectivement avec les diverses concentrations des composés du milieu et des conditions de culture, ces isolats (S_{11} et S_{46}) ont été sélectionnés pour leur aptitude de produire des substances bioactives à partir de cinq souches testés (S_1 , S_2 , S_4 , S_{11} et S_{46}) sur les différents milieux de culture (GEM, MEM, Czapec_A, Czapec_S, $W_{0,2\%}$ et $W_{5\%}$) vis-à-vis de six germes cibles à savoir une bactérie à Gram négatif *Escherichia .coli* ATCC 25922 et quatre bactéries à Gram positif *Listeria. innocua* CLIP 74915 , *Staphylococcus. aureus* ATCC 25923 , SARM ATCC 43300 et *Bacillus. subtilis* ATCC 6633 ainsi qu'une levure (*Candida albicans.*).

Selon les résultats obtenues par le test des cylindres d'agar le milieu $W_{0,2\%}$ s'est révélé meilleur pour la production d'antibiotiques vis-à-vis de *Listeria. innocua* CLIP 74915 , SARM ATCC 43300 et *Escherichia .coli* ATCC 25922 , pour la souche S_{46} et le milieu GEM été sélectionné pour la production d'antifongique pour la souche S_{11} à l'égard de *Candida albicans.*

Après avoir cultivées les deux souches sur les 12 milieux de GEM et les 12 milieux de $W_{0,2\%}$ préparés selon les matrices données par le logiciel Minitab 16, la souche S_{11} à montré une bonne croissance sur 7 milieux ((G_{03} , G_{04} , G_{05} , G_{06} , G_{07} , G_{11} et G_{12}), une croissance modéré sur trois milieux (G_{01} , G_{02} et G_{10}) et aucune croissance sur les 2 milieux restants (G_{08} et G_{09}). La souche S_{46} à montré une bonne croissance sur cinq milieux (W_{02} , W_{04} , W_{07} , W_{10} et W_{11}) alors que les autres milieux ont été contaminés. L'activité des deux souches à été mise en évidence par la technique des cylindres d'agar vis-à-vis des germes cibles sélectionnés.

Les résultats obtenus montrent que la souche S_{46} présente une activité à l'égard des trois germes testés sur les cinq milieux de Williams et la meilleure activité été mesurée sur le milieu W_{04} dont les diamètres des zones d'inhibition sont de 28,16, 28,31, 27,93mm vis-à-vis de *E.coli*, *L.innocua* et SARM respectivement ; à cause des contaminations ces résultats restent insuffisants et non modélisables, donc S_{46} été éliminée pour la suite du travail.

Pour la souche S_{11} l'activité antifongique à été obtenue sur les milieux G_{01} , G_{03} , G_{04} , G_{05} , G_{07} et G_{11} dont la meilleure été notée sur le milieu G_{07} avec une zone de 20,75mm.

Une modélisation par le plan Plackett et Burman à été appliquer en vue de cribler les paramètres les plus influençant sur la réponse (l'activité antifongique de la souche S_{11}), sept

Conclusion et perspectives

facteurs ont été choisis comme variable : la concentration de l'amidon, du KNO_3 , du K_2HPO_4 , du NaCl , du $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ainsi que le pH et la température. Cette modélisation a montré que les facteurs les plus influençant sur l'activité antifongique de la souche S_{11} sont selon l'ordre décroissant de leur importance : le pH, la température, la concentration de KNO_3 , celle de l'amidon, du $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, du K_2HPO_4 et la concentration de NaCl . Le pH et la concentration de NaCl sont les seuls facteurs qui présentent un effet positif sur la réponse alors que tous les autres facteurs présentent un effet négatif sur celle-ci.

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

- ✓ La sélection des paramètres les plus importants parmi les sept étudiés et application d'un plan d'expériences d'optimisation (plan composite centré, plan de Box Behnken,.....).
- ✓ Etude de la cinétique de croissance des souches.
- ✓ Changer la gamme de variation des différents paramètres opératoires.
- ✓ Elargir la gamme de milieux de culture et la gamme de germes cibles.
- ✓ Etudier d'autres paramètres à savoir les éléments nutritifs et les conditions de culture.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Asanza-Ternuel ML ,Gontier E , Bienaime C , Nava-Saucedo JE et Barbotin JN. (1977). Response surface analysis of chlortetracycline and tetracycline production with K-caragenum immobilized *Streptomyces aureofaciens*. Enzyme and Microbial Technology. **21**, 314-320.
- Athalye M, Lacey J et Goodfellow M. (1981). Selective isolation and enumeration of Actinomycetes using rifampicin. J. Appl. Bacteriol. **51**, 289-297.
- Athalye M, Goodfellow M, Lacey J et White RP. (1985). Numerical classification of Actinomadura and Nocardiosis. Int. J. Syst. Bacteriol. **35**, 86-98.
- Augustine SK, Bhavsar SP et Kapadnis BP. (2005). Production of a growth dependent metabolite active against dermatophytes by *Streptomyces rochei* AK 39. Indian J Med Res **121**. 164-170.
- Balaji S, Saurav K, Gopieskhanna V et Kannabiran K. (2011). Assay of genotoxic and cytotoxic potential of a compound from marine *Streptomyces*. Pharmacologyonline. **2**, 263-271.
- Baldacci E. (1962). Tendances actuelles de la classification des actinomycètes. Ann. Soc. Belge Méd. Trop. **4**, 633-646.
- Bandin I, Michel J et Marchand C. (2007).Technologie de l'eau : Alimentation en eau potable.
- Baoxin Z, Xiangjing W et Wensheng X. Optimisation of fermentation medium for enhanced production of milbemycin by a mutant of *Streptomyces bingchenggensis* BC-X-1 using response surface methodology. African Journal of Biotechnology. **10**, 7225-7235.
- Becker B, Lechevalier MP, Gordon RE et Lechevalier HA. (1964). Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. Appl. Microbiol.**12**, 421-423.
- Becker B, Lechevalier MP et Lechevalier HA. (1965). Chemical composition of cellwall preparations from strain of various form genera of aerobic actinomycetes. Appl. Microbiol. **13**, 236-242.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (2012). Staley JT, Boone DR, Brenner DJ, Paul de Vos, Garrity GM, Goodfellow M, Krieg NR, Rainey FA et Schleifer KH. In : Volume Two : The Proteobacteria, Part A : Introductory Essays. Department of Microbiology and Molecular Genetics , Michigan State University East Lansing USA.

Références bibliographiques

- Chun J, Youn HD, Yim YI, Lee H, Kim MY, Hah YC et Kang SO. (1997). *Streptomyces seoulensis* sp. Nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **47**, 492-498.
- Collins MD et Jones D. (1981). Distribution of isoprenoid quinone structural type in bacteria and their taxonomic amplification. Microbiol. Rev. **45**, 316-354.
- Doralice R S, Rosalie RRC, Marcia DW, Luiz F, Marta GM, Luzia Td et Antonio. JR.(2004). Antimicrobial and antiviral activities of an actinomycete (*Streptomyces* sp.) isolated from a Brazilian tropical forest soil. World Journal of Microbiology & Biotechnology. **20**, 225-227.
- Doumbou CL, Michelle K, Salove H, Crawford DL et Beaulieu C.(2002). Actinomycètes promissing tools to control plant diseases and to promote plant growth.Phytoprotection.**82**, 85-102.
- Elattal NA, Hamdy AA, Ali AE et Amin MA. (2011). Nystatin production by a local *Streptomyces* sp. Isolated from Egyptian soil. J. Pharm. Biomed. Sci. **1**(6), 128-136.
- El-sersy NA et Abou-Elela GM. (2006). Antagonistic effect of marine *Nocardia brasiliensis* against the fish pathogen *Vibrio damsela*: Application of Plackett-Burman experimental design to evaluate factors affecting the production of the antibacterial agent. International Journal of Oceans and Oceanography. **1** (1), 141-150.
- Ensign JC. (1979). Formation, properties and germination of actinomycetes spores. Annus. Rev. Microbiol. **32**: 185-219.
- Gesheva V, Ivanova V et Gesheva R. (2005). Effects of nutrients on the production of AK-111-81 macrolide antibiotic by *Streptomyces hygroscopicus*. Microbiological Research. **160**, 243-248.
- Ghayur A. (2000). A study of biopesticides and biofertilisers in Hayana India.International Institute for Environment and Development.N°93.
- Goodfellow M. (1971). Numerical taxonomy of some nocardioform bacteria. J. Microbiol. **69**, 33-90.
- Goodfellow M et Williams ST. (1983). Ecology of actinomycetes. Ann. Rev. Microbiol.**37**: 189-216.
- Goodfellow M, Stalon LJ, Simpson KE et Minnikin DE. (1990). Numerical and checiatmical classification of Actinplanes and some related actinomycetes. J. Gen. Microbiol. **136**, 19-36.
- Goodfllow M , Schaal KP , Zlotnik H , Sandoval H , Brown JM , Carlotti A , Colon LC , Faibra DT , Guerin V , Gvozdiak OR , Kamne-Fotso MV , Kim SB , Panteix G ,Tarnok II

Références bibliographiques

- et Trujillo. ME. (1993). Identification of some clinically significant actinomycetes. *Res. Microbiol.* **144**, 647-651.
- Goupy J. (2005). Pratiquer les plans d'expériences. Edition : DUNOD. Paris. 295p.
 - Grund E et Kroppenstedt RM. (1990). Chemotaxonomy and numerical taxonomy of the genus *Nocardiopsis* Meyer 1976. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**, 5-11.
 - Gulay O et Demain AL. (2013). Récent advances in the biosynthesis of penicillins, cephalosporins and clavams and its régulation. *Biotechnology Advances.* **31**, 287-311.
 - Hua Zhu, Sandiford SK, Gilles P et Wezel van. (2013). Triggers and cues that activate antibiotic production by actinomycetes. *J Ind Microbiol Biotechnol.*
 - Houssam MA, El-Sayed AS, El-Desoukey MA, Hassan MM et El-Gazar MM. (2011). Screening, Identification, Phylogenetic Characterization and Optimization of Antimicrobial Agents Biosynthesis Produced by *Streptomyces rimosus*. *World Rural Observations.* **3**(3), 40-52.
 - Jicheng Yu, Liu Q, Qiao L, Xiangdong L, Qiang S, Jianfang Y, Xiaohui Q et Shengdi F. (2008). Effect of liquid culture requirements on antifungal antibiotic production by *Streptomyces rimosus* MY02. *Bioresource Technology.* **99**, 2087-2091.
 - Juan MF et Demain AL. (1980). Control of Antibiotic Biosynthesis. *Microbiological Reviews.* **44**, 230-251.
 - Karine PF. (1997). La β (1, 6)-glucanase de *Streptomyces sp. EF-14*, un actinomycètes antagoniste à *Phytophthora spp.*: production, purification et caractérisation. Mémoire en vue de l'obtention de grade de maitre és sciences. Université de Sherbrooke, 2p.
 - Kavitha A et Vijayalakshmi M. (2009). Cultural parameters affecting the production of bioactive metabolites by *Nocardia levis* MK-VL 113. *Journal of Applied Sciences Research.* **5**(12), 2138-2147.
 - Khanna M, Solanki R ET Lal R. (2011). Selective isolation of rare actinomycetes producing novel antimicrobial compounds. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research.* **2**, 357-375.
 - Kitouni M, Boudemagh A, Oulmi L, Reghioua S, Boughachiche F, Zerizer H, Hamdiken H, Couble A, Mouniee D, Boulahrouf A et Boiron P. (2005a). Isolement d'actinomycètes producteurs de substances bioactives à partir d'échantillons d'eau, de sol et d'écorces d'arbre du Nord-Est de l'Algerie. *Journal de Mycologie Médicale.* **15**, 45-51.
 - Kozue A, Takuji N, Natsumi K, Rieko S, Yuko O, Satoshi T et Katsuhiko A. (2008). Actinomycete Bacteria Isolated from the Sediments at Coastal and Offshore Area of

Références bibliographiques

- Nagasaki Prefecture, Japan: Diversity and Biological Activity. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **106**, 215-217.
- Labeda DP, Hatano K, Kroppenstedt RM et Tamura T. (2001). Revival of the genus *Lentzea* and proposal for *Lechevalieria* gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Bacteriol.* **51**, 1045-1050.
 - Lacey J. (1973). Actinomycetes in soils, composts and fodders. *Soc. App Bacteriol., Symp. Ser.* **2**: 231-251.
 - Lacey J. (1997). Actinomycetes in composts. *Ann Agric Environ Med.* **4**, 113– 121.
 - Lamari L. (2006). Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat d'Université de Tizi Ouzou (Algerie).
 - Larpent JP et Sanglier JJ. (1989). *Biotechnologie des antibiotiques*. Ed. Masson. Paris, 481.
 - Lechevalier MP. et Lechevalier HA. (1970a). Composition of whole-cell hydrolysates as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. In: *The Actinomycetales*. Prauser H. (Eds). G. Fisher Verlag, Jena. 311-316.
 - Lechevalier MP, De bievre C et Lechevalier HA. (1977). Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochem. Syst. Ecol.* **5**, 249-260.
 - Lopes A, Coelho R, Meirelles MH et Vermalho AB. (1999). Extracellular serine protéinases isolated from *Streptomyces albaniger* : Partial characterization and effect of aprotinin on cellular structure. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **94**, 763-770.
 - Maha AH, El-Naggar MY et Said WY. (2001). Physiological factors affecting the production of an antimicrobial substance by *Streptomyces violatus* in batch cultures. *Egyptian Journal of Biology.* **3**, 1-10.
 - Mangamuri UK, Vijayalakshmi M, Sudhakar P et Dayanand A. (2014). Optimization of process parameters for improved production of bioactive metabolites by *Streptomyces tritolerans* DAS 165_T. *British Microbiology Research Journal.* **4(4)**, 428-442.
 - Mariat F et Sebald M. (1990). Les actinomycètes. In: *Bactériologie médicale*. Le Minor. Edition Médecine-Science. Flammarion. France, 935-949.
 - Marilen M, Parungao Ebner BG, Maceda et Villano MAF. (2007). Screening of Antibiotic-Producing Actinomycetes from Marine, Brackish and Terrestrial Sediments of Samal Island, Philippines. *Journal of Research in Science, Computing, and Engineering.* **3**, 29-38.

Références bibliographiques

- Martin JF et Demain AC. (1980). Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiological Reviews*. **44**, 230-251.
- Martinez JL. (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution*. **157**, 2893-2902.
- Mellouli L, Karray-Rebai I, Sioud S, Ben Ameer-Mehdi R Naili B et Bejar S.(2004). Efficient transformation procedure of a newly isolated *Streptomyces* sp. TN58 strain producing antibacterial activities. *Current Microbiology*. **49**, 400-406.
- Minnikin DE, Alshamaony L et Goodfellow M. (1975). Differentiation of *Mycobacterium*, *Nocardia* and related taxa by thin-layer chromatographic analysis of whole-organism methanolysates. *J. Gen. Microbiol.* **88**, 200-204.
- Minnikin DE, Patel PV, Alshamaony L et Goodfellow M. (1977). Polar lipid composition in the classification of *Nocardia* and related bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **27**, 104-117.
- Mitali D, Royer TV et Leff LG. (2006). Diversity of Fungi, Bacteria, and Actinomycetes on Leaves Decomposing in a Stream. *Appl. Env. Microbiol.* **3**,756-767.
- Mordarska H, Mordarska M et Goodfellow M. (1972). Chemotaxonomic characters and classification of some nocardioform bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **71**, 77-86.
- Mukhtar H, Sidra I et Ikram UH. (2012). Production of Antitumor Antibiotic by *Streptomyces capoanus*. *Pak.J.Bot.* **44(1)**, 445-452.
- Olano C, Mendez C et Salas JA. (2009). Antitumor compound from marine actinomycètes. *Mar drugs*. **7**,210-248.
- Oskay M,Tamer AU et Azeri C. (2004). Antibacterial activity of same actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *Afric J Biothec.***3**, 441-446.
- Oskay M. (2011). Effects of some Environmental Conditions on Biomass and Antimicrobial Metabolite Production by *Streptomyces* sp. KGG32. *International Journal of Agriculture et Biology*. **13(3)**, 317-324.
- Ozil P. (1997). Plans d'expériences : Méthode de TAGUCHI. E.N.S d'électrochimie et d'Electrometallurgie INPG.Edition. pages
- Pamela. (1996). Experimental studies on the ecological rôle of antibiotic production in bacteria. *Evolutionary Ecology*. **10**, 405-421.
- Pandey A, Shukla A et Majumdar SK. (2005). Utilisation of carbon and nitrogen sources by *Streptomyces kanamyceticus* M 27 for the production of an Anti bacterial antibiotic. *African Journal of Biotechnology*. **4(9)**, 909-910.

Références bibliographiques

- Pimentel-Elardo SM, Kozytska S, Bugni TS, Ireland CM Moll H et Hentschel U. (2010). Anti-Parasitic Compounds from *Streptomyces* sp. Strains Isolated from Mediterranean Sponges. *Marine Drugs*. **8**, 373-380.
- Prauser H. (1976). *Nocardioides*, a new genus of the new order Actinomycetales. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **26**, 58-65.
- Pridham TG, Hesseltine CW et Benedict RG. (1958). A guide for the classification of Streptomycetes according to selected groups: placement of strains in morphological selection. *Appl. Microbiol.* **6**, 5-79.
- Qin Song, Yun Huang et Hui Yang. (2012). Optimisation of fermentation conditions for antibiotic production by Actinomycètes YJ1 strain against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Agricultural Science*. **4**, N° 7.
- Ravikumar K, Pakshirayah K, Gwaninathan T. (2005). Optimisation of batch process parametres using reponse surface methodologie for dye removal by a novel adsorbent. *Chemical engineering tournal* 105,(2005),pp 131-138.
- Remya M, Vijayakumar R. (2008). Isolation and characterization of marine Antagonistic actinomycetes from weat coast of India. *Med and Biol.***15**, 13-19.
- Ridell M. (1980). Immunodiffusion studies of some *Nocardia* strains. *J. Gen. Microbiol.* **123**, 69-74.
- Ripa F A, Nikkon F, Zaman S et Khondkar P. (2009). Optimal Conditions for Antimicrobial Metabolites Production from a New *Streptomyces* sp. RUPA-08PR Isolated from Bangladeshi Soil. *Mycobiology*. **37** (3), 211-214.
- Samir M et Al-Hulu. (2013). Study effects of some parameters on antifungal activity for *Streptomyces spp.* *Journal of Kerbala University*. **11**, 44-50.
- Sanchez S et Demain AL. (2002). Metabolic regulation of fermentation processes. *Enzyme and Microbial Technology*. **31**, 895-906.
- Seetha RK, Viharika V, Reddy KS, Kumari S, Lakshminadh M, Rajesh KV, Sivasai TG et Lokesh RS.(2013). Cost effective optimization of chitinase production using *Streptomyces heteromorphus* 4075: A progressive statistical approach. *Pakhtunkhwa J. Life Sci.***1**, 100-119.
- Sheila Marie PE, Svitlana K, Bugni TS,Ireland CM, Heidrun M et Hentschel U.(2010).Anti-Parasitic Compounds from *Streptomyces* sp. Strains Isolated from Mediterranean Sponges. *Mar. Drugs* 2010.**8**,373-380.

Références bibliographiques

- Siddique S, Quratulain S, Adnan A, Nadeem M, Irfan M et Qureshi FA. (2013). Production of avermectin B1b from *Streptomyces avermitilis* 41445 by batch submerged fermentation. *Jundishapur J Microbiol.* **6**(8).
- Singh LS, Mazumder S et Bora TC. (2009). Optimisation of process parameters for growth and bioactive metabolite produced by a salt-tolerant and alkaliphilic actinomycete, *Streptomyces tanashiensis* strain A2D. *Journal de Mycologie Médicale.* **19**, 225-233.
- Sivakumar K, Sahu MK, Thangaradjou T et Kannan L. (2007). Research on marine actinobacteria in India. *Indian J. Microbiol.* **47**, 186-196.
- Smaoui S. (2010). Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de doctorat. Université de TOULOUSE.p31.
- Stackebrandt E, Rainey FA et Ward-Rainey NL. (1997). A proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria classis nov.* *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 479-491.
- Thakura D, Bora TC, Bordoloi GN et Mazumdar S. (2009). Influence of nutrition and culturing conditions for optimum growth and antimicrobial metabolite production by *Streptomyces* sp.201. *Journal de Mycologie Médicale.* **19**, 161-167.
- Tamara Garcia A, Adriana A, Pierre Cornelis, Marc C et Pierre S. (2013). Identification of antimicrobial resistant bacteria in rivers: Insights into the cultivation bias. *Water Reserch.* **47**, 4938-4947.
- Tresner HD, Davies MC et Backus EJ. (1961). Electron microscopy of *Streptomyces* spore morphology and its role in species differentiation. *J. Bacteriol.* **81**, 70-80.
- Vijayakumar R, Panneerselvam K, Muthukumar C, Thajuddin N, Panneerselvam A et Saravanamuthu R. (2011). Optimization of Antimicrobial Production by a Marine Actinomycete *Streptomyces afghaniensis* VPTS3-1 Isolated from Palk Strait, East Coast of India. *Indian J Microbiol.* 614-625
- Vijayabharathi R, Devi PB, Sathyabama S, Bruheim P et Priyadarisini VB. (2012). Optimization of resistomycin production purified from *Streptomyces aurantiacus* AAA5 using response surface methodology. *Jour Biochem Tech.* **3** (4), 402-408.
- Vilches C, Mendez C, Hardisson C et Salas JA. (1990). Biosynthesis of oleandomycin by *Streptomyces antibioticus*: influence of nutritional conditions and development of resistance. *Journal of General Microbiology.* **136**, 1447-1454.

Références bibliographiques

- Wang X, Huang L, Kang Z, Buchenauer H et Gao X. (2010). Optimization of the Fermentation Process of Actinomycete Strain Hhs.015T. *Journal of biomedicine and biotechnology*. **10**: 1-10.
- Wellington EMH et Williams ST. (1981). Host ranges of phages isolation to *Streptomyces* and other genera. *Zentralb. Bakterio. Mikrobiol. Hyg. I. Abt. Suppl.* **11**, 93-98.
- Williams ST, Wellington EMH et Tipler LS. (1980). The taxonomic implication of the reactions of representatives Nocardia strains to actinophage. *J. Gen. Microbiol.* **119**, 173-178.
- Yassin MH, Shash SM et El-Doraidy EH. (2006). Potentiality of actinomycete isolates against dermatophytic fungi biological, taxonomical studies and nutritional requirements for antifungal production of *Streptomyces kanamyceticus* EHE-68. *Proceeding of First Scientific Environmental Conference*.133-152.
- Zidan AB, Asmat A, Shukor MN et Gires U. (2012). Factors affecting bioactivity of secondary metabolites produced by *Streptomyces* sp.PT1 using Plackett-Burman design. *Advances in Environmental Biology*. **6**(12), 3043-3051.
- Zitouni A, Boudjella H, Lamari L, Badji B, Mathien F, Lebrihi A et Sabou N. (2005). Nocardiosis and *Saccharothrix* genera in saharan soils in Algeria : Isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. *Research in Microbiology*. **156**, 984-993.

Annexes




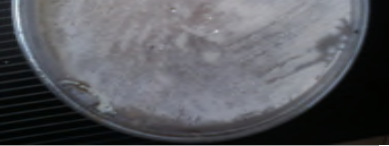
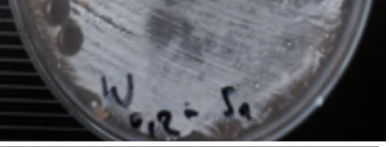






Annexe I

I. Les milieux





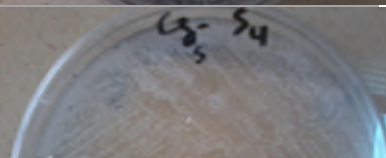
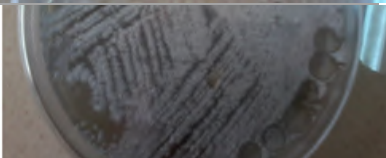






- **Milieu Williams modifié (Williams et Kuster, 1964)** : agar : 18g, amidon : 10g, caséine : 0,3g, KNO_3 : 2g, NaCl : 50g, K_2HPO_4 : 2g, $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0,05g, CaCO_3 : 0,02g, $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0,01g, eau distillée : 1000ml, pH : 7,2, T° : 28°C.
- **Mueller-Hinton(MH)** : Extrait de viande : 3g, Hydrolysate de caséine : 17,5g, amidon : 1,5g, agar : 16g, pH : 7,3, T° : 37°C.
- **Gélose Nutritive(GN)** : Extrait de viande : 1g, extrait de levure : 2,5g, peptone : 5g, NaCl : 5g, agar : 15g, pH: 7,24, T° : 37°C.
- **Milieu Chapman**: Chapman: 111g, pH: 7.4, T° : 37°C, eau distillée: 1000ml.
- **Gausse Eau de Mer modifié (GEM)** : agar : 20g, amidon : 20g, KNO_3 : 1g, K_2HPO_4 : 0.5g, NaCl : 0,5g, $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0.5g, $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0,01g, pH : 7,2, T° : 28°C, eau de mer synthétique : 500ml, T° : 28°C, eau distillée : 500ml.
- **Mincer Eau de Mer modifié (MEM)** : agar : 20g, amidon : 10g, extrait de levure : 4g, peptone : 2g, pH : 7.2, eau de mer synthétique : 500ml, eau distillée : 500ml.
- **Czapec_{saccharose}** : agar: 15g, saccharose : 30g, NaNO_3 : 3g, $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0,5g, KCl : 0,5g, $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0,01g, K_2HPO_4 : 1g, pH: 7,2, T° : 28°C, eau distillée: 1000ml.
- **Czapec_{amidon}** : agar : 15g, amidon : 10g, NaNO_3 : 3g, $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0.5g, KCl : 0.5g, $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0,01g, K_2HPO_4 : 1g, pH : 7,2, T° : 28°C, eau distillée : 1000ml.
- **Williams 0.2% de NaCl** : agar : 18g, amidon : 10g, caséine : 0,3g, KNO_3 : 2g, K_2HPO_4 : 2g, NaCl : 2g, $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0,05g, CaCO_3 : 0,02g, $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0,01g, pH: 7,2, T° : 28°C eau distillée: 1000ml.
- **Eau de mer synthétique**: NaCl : 25g, MgSO_4 : 5g, CaCl_2 : 1g, KCl : 1g, eau distillée: 1000ml.

Annexe II

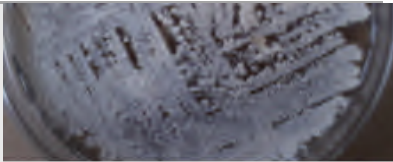






Tableau VIII : Caractéristiques morphologiques des souches S₁, S₂, S₄, S₁₁ et S₄₆.

Les souches	Les milieux	Croissance	MA	MS	Pigment diffusible	Les figures
S ₁	GEM	++++	Blanc	Vert	Vert	
	MEM	++++	Blanc	Jaune	/	
	Czapeck _A	++++	Blanc	Beige - crème	Marron claire	
	Czapeck _S	+++	Blanc	Jaune	/	
	W _{0,2%}	++++	Blanc	Rouge foncé	Vert foncé	
	W _{5%}	++++	Blanc	Jaune	/	
S ₂	GEM	++++	Gris foncé	Rouge foncé	Vert	
	MEM	++++	Gris foncé	Rouge foncé	Vert	
	Czapeck _A	++++	Gris foncé	Rouge foncé	Vert	
	Czapeck _S	++++	Gris foncé	Rouge foncé	Gris claire	
	W _{0,2%}	++++	Gris foncé	Rouge foncé	Vert	

Annexe II

	W _{5%}	++++	Gris	Vert	Vert claire	
S ₄	GEM	++++	Gris	Rouge rosâtre	Gris	
	MEM	++++	Gris	Jaune	Vert	
	Czapeck _A	++++	Gris	Rouge rosâtre	Vert	
	Czapeck _S	+++	Blanc	Blanc	Blanc	
	W _{0,2%}	++++	Gris	Vert	Vert	
	W _{5%}	++++	Gris	Rouge rosâtre	Vert	
S ₁₁	GEM	++++	Blanc	Marro n	Marron foncé	
	MEM	++++	Blanc	Marro n	Marron foncé	
	Czapeck _A	++++	Blanc	Marro n	Marron foncé	
	Czapeck _S	++++	Jaune	Marro n	Marron foncé	
	W _{0,2%}	++++	Gris	Marro n	Marron	

Annexe II

	W _{5%}	++++	Blanc	Marro n	Marron foncé	
S ₄₆	GEM	+++	Blanc	Blanc	Crème	
	MEM	+++	Blanc	Blanc	Crème	
	Czapeck _A	+++	Beige - crème	Beige - crème	Marron claire	
	Czapeck _S	++	Beige - crème	Blanc	Crème	
	W _{0,2%}	+++	Blanc	Blanc	Crème	
	W _{5%}	++++	Blanc	Blanc	Beige- crème	

++++ : Très bonne croissance, +++ : bonne croissance, ++ : croissance moyenne, + : faible croissance, / : pas de pigment.

Tableau IX : Activités des souches S₁, S₂, S₄, S₁₁ et S₄₆ à l'égard de divers germes cibles

Les germes cibles	Les milieux de culture	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)				
		S ₄₆	S ₁₁	S ₄	S ₂	S ₁
<i>E. Coli</i>	GEM	13,13	/	/	/	/
	MEM	/	/	/	/	/
	Czapeck _A	/	/	/	/	/
	Czapeck _S	/	/	/	/	/
	W _{5%}	10	/	/	/	/
	W _{0,2%}	27	/	/	/	/
<i>B. subtilis</i>	GEM	/	/	/	/	/
	MEM	/	/	/	/	/
	Czapeck _A	/	/	/	/	/
	Czapeck _S	/	/	/	/	/

Annexe II

	W _{5%}	/	/	/	/	/
	W _{0.2%}	/	/	/	/	/
SARM	GEM	12,15	/	/	/	/
	MEM	07,16	/	/	/	/
	Czapeck _A	10,84	/	/	/	/
	Czapeck _S	07,52	/	/	/	/
	W _{5%}	/	/	/	/	/
	W _{0.2%}	17,09	/	/	/	/
<i>S.aureus</i>	GEM	/	/	/	/	/
	MEM	/	/	/	/	/
	Czapeck _A	/	/	/	/	/
	Czapeck _S	/	/	/	/	/
	W _{0.2%}	/	/	/	/	/
	W _{5%}	/	/	/	/	/
<i>L.innocua</i>	GEM	/	/	/	/	/
	MEM	/	/	/	/	/
	Czapeck _A	/	/	/	/	/
	Czapeck _S	17,83	/	/	/	/
	W _{5%}	17,23	/	/	/	/
	W _{0.2%}	18,65	/	/	/	/
<i>C.albicans</i>	GEM	/	20,25	/	/	/
	MEM	/	/	/	/	/
	Czapeck _A	/	10	/	/	/
	Czapeck _S	/	17,29	/	/	/
	W _{5%}	/	/	/	/	/
	W _{0.2%}	/	/	/	/	/

Tableau XII : Activité antibactérienne de la souche S₄₆ vis-à-vis des trois bactéries : *Escherichia .coli*, SARM et *L. innocua*.

La souche	Le diamètre de la zone d'inhibition (mm)			
	Les milieux	Les germes cibles		
		<i>E. coli</i>	SARM	<i>L. innocua</i>
S ₄₆	W ₀₁	/	/	/
	W ₀₂	13,68	17,04	15,22
	W ₀₃	/	/	/
	W ₀₄	28,16	27,93	28,31
	W ₀₅	/	/	/
	W ₀₆	/	/	/
	W ₀₇	08,08	11,65	09,48
	W ₀₈	/	/	/
	W ₀₉	/	/	/
	W ₁₀	13,42	17,47	16,00
	W ₁₁	08,71	11,74	09,18
	W ₁₂	/	/	/

Annexe II

Tableau XIII : Activité antifongique de la souche S₁₁ sur *Candida albicans*

La souche	Le diamètre des zones d'inhibition (mm)	
	Les milieux	Le germe cible : <i>Candida albicans</i>
S ₁₁	G ₀₁	18,02
	G ₀₂	0
	G ₀₃	18,34
	G ₀₄	10,17
	G ₀₅	14,16
	G ₀₆	0
	G ₀₇	20,75
	G ₀₈	/
	G ₀₉	/
	G ₁₀	0
	G ₁₁	08,01
	G ₁₂	0

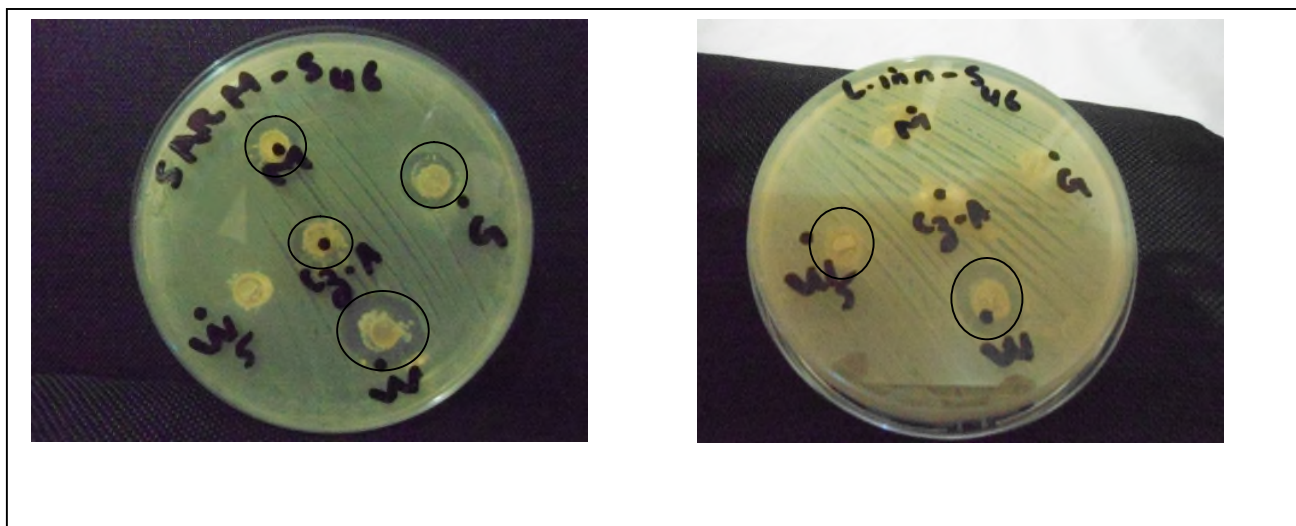


Figure 2 : Illustration de l'activité antibactérienne de la souche S₄₆ vis-à-vis SARM et *L. innocua* sur les différents milieux

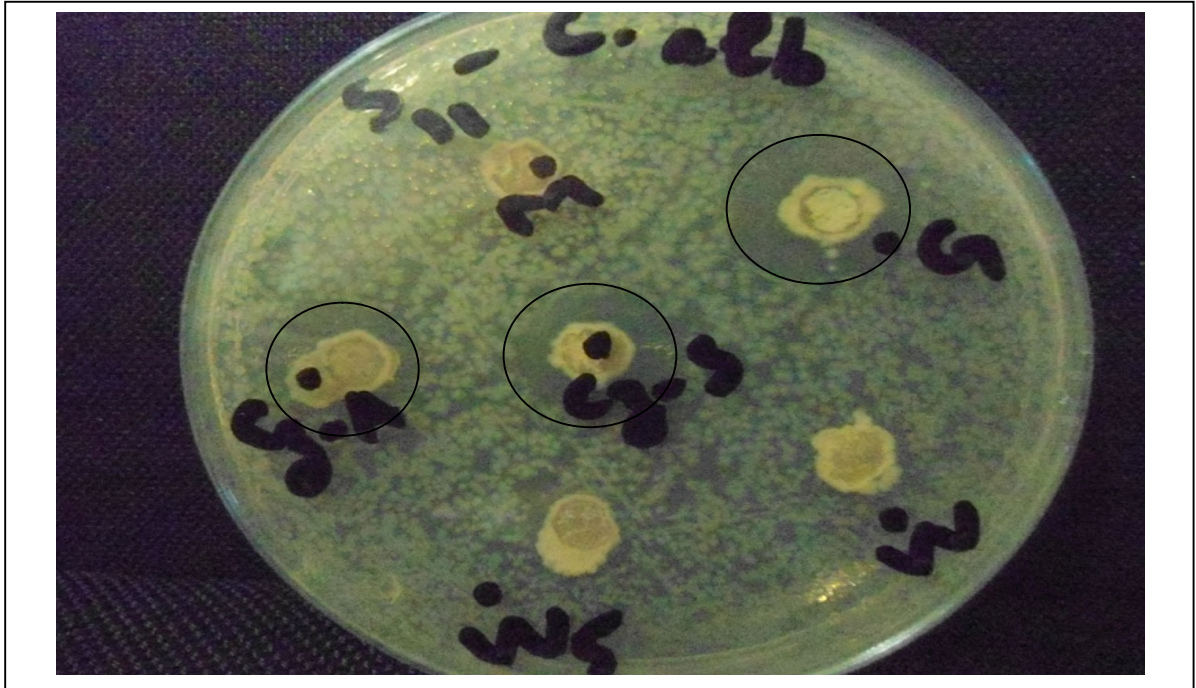


Figure 4 : Illustration de l'activité antifongique de la souche S₁₁ vis-à-vis de *C. albicans* sur les différents milieux

Résumé :

Dans ce travail cinq souches d'actinomycètes isolées à partir d'eau polluée de la région de Bejaia ont fait l'objet d'un criblage pour leur aptitude de production d'antibiotiques sur six milieux de culture (GEM, MEM, W_{0,2%}, W_{5%}, Czapeck_A et Czapeck_S) par le test des cylindres d'agar. Deux souches ont été sélectionnées pour leurs importantes activités antimicrobiennes vis-à-vis au moins d'un germe cible parmi les six testés. Les résultats obtenus montrent que la souche S₄₆ présente une activité vis-à-vis d'*E. coli*, *L. innocua* et SARM et la souche S₁₁ présente une activité à l'égard de *Candida albicans*. Les milieux W_{0,2%} et GEM se sont révélés meilleurs pour la production d'antibiotiques par les deux souches S₄₆ et S₁₁.

La modélisation par le plan Plackett et Burman indique seulement deux facteurs pH et la température qui présentent un effet positif sur la souche S₁₁ et les autres facteurs varient ont un effet négatif.

Mots clés: Actinomycètes, criblage, Plackett et Burman, Production d'antibiotiques.

Abstract:

The aim of this work is the screening of strains of actinomycetes isolated from the polluted water of Bejaia for their fitness of production of antibiotics about six culture medium (GEM, MEM, Czapeck_A, Czapeck_S, W_{0,2%} and W_{5%}). Two strains among five was selected for their important antimicrobial activities against at list one of target germs. The results obtained show that strains S₄₆ present an activity against *E. coli*, *L. innocua* and SARM and the strains S₁₁ present activity against *Candida albicans*, the W_{0,2%} and GEM mediums were reveal to the best of the production of antibiotics by strains S₄₆ and S₁₁ respecting the modeling by Plackett Burman design indicates only two factors pH and temperature that present a positive effect on the production of antibiotics of the strains S₁₁ and the other factors on a negative effect.

Key words: Actinomycetes, screening, Plackett Burman design, antibiotic production.