

Université Abderrahmane Mira Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

Mémoire en vue d'obtention du diplôme de :
Master en Microbiologie Appliquée
à l'agroalimentaire au biomédical et
à l'environnement

Thème

Essais d'optimisation d'un milieu de culture
en vue de la production d'antifongiques par
une souche d'actinomycète T₁KJ.

Membres de Jury :

Président: M^r BENDJEDDOU K.

Promoteur : M^r KECHA M.

Examinatrice : M^{me} BOUDERIES S.

Examinatrice : M^{elle} BENDALI F.

Présenté par :

M^{elle} BRAHAMI Anissa

Promotion 2011/ 2012



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 mes grands parents que Dieu x les protèges.

A mon cher frère Anis et mon adorable sœur Melissa à qui je souhaite beaucoup de réussite.

A toute ma famille.

A tous mes cousins et cousines, en particulier mon petit cousin Selyon.

A mon cher ami Wassim a qui je souhaite beaucoup de succès.

A ma meilleure amie Ilham.

A tous mes ami(e)s : Ilyas, Nacer, Wendi, Amine, Omar, Lamia, Azziz, Nassime, Imene et Smail pour leur soutien, leur présence et leur aide précieuse.



Remerciements



Cette étude n'aurait jamais été entreprise ni achevée sans la patiente assistance, les savants conseils et orientations, les méticuleux contrôles et suivis, que m'a prodigués mon directeur de mémoire, D^r KECHA Mouloude, qui a accepté de m'accueillir dans le Laboratoire de biochimie microbienne. Je lui témoigne, ma gratitude et ma reconnaissance.

Mes remerciements s'adressent à M^r MESSIS Aziz, mon Co-promoteur. Qui m'a prodigé de précieux conseils.

Je tiens à remercier vivement les membres du jury : M^r BENDJEDOU K, M^{elle} BENDALI F, M^{me} BOUDRIES S, d'accepter de juger, d'évaluer ce travail et d'y avoir consacré de leur temps.

Je tiens aussi à remercier M^r MOUEFEK Abdenacer de l'université Ferhat Abbas, pour sa contribution et le temps qu'il a bien voulu consacrer à la réalisation de certaines analyses nécessaires à ce travail.

Je remercie l'ensemble du Personnel du Laboratoire pour m'avoir permis d'effectuer les différents tests et analyses et pour avoir mis à ma disposition le matériel et les moyens nécessaires à la réalisation de ce travail.

Je remercie aussi, tous ceux et toutes celles qui m'ont aidé ou encouragé, à quelque titre ou degré que ce soit, à entreprendre et achever ce mémoire, qui est ma modeste contribution au domaine de la Recherche Scientifique.

Ara: arabinose

C : Croissance

DAP : diaminopimélique acide

DM : Dichlorométhane

G+C : Guanine +cytosine

Gal :Galactose

Gly : Glycine

Gr : Grossissement

GYEA : Glucose-Yeast Extract Agar (milieu de culture)

ISP: International *Streptomyces* Project.

LMA : Laboratoire de Microbiologie Appliquée.

Lys : Lysine

M₂ : Milieu Williams Modifié (milieu de culture)

MA : mycélium aérien

Mad : Madurose

MS : Mycélium du substrat

OFAT : One factor at time

Orn : Ornithine

P : Production

RA : *Rectinaculcum apertum*

Rha : Rhamnose

RSM : Response surface methodologie

SCA : Starch caseine agar

UAMB : Université Abderrahmane Mira de Béjaia

MSA : milieu synthétique a base d'amidon

RF : Rectus flexibilis

PS : Pigments solubles

UFC : unite formant colonies

Xyl : Xylose

Numéro	Description	page
01	Micromorphologie des principaux genres d'actinomycètes.	5
02	Cycle de croissance en milieu solide de <i>Streptomyces</i> .	8
03	Morphologies rencontrées au cours de cultures liquides.	9
04	Répartition des agents provoquant les mycoses.	10
05	Structure chimique des deux principaux polyènes antifongiques.	11
06	Structure de la Griséofulvine.	12
07	Observation au microscope de la souche d'actinomycètes T ₁ KJ (Grossissement × 10).	26
08	Observation au microscope de la souche d'actinomycètes T ₁ KJ (Grossissement × 40).	26
09	Evolution de la cinétique de croissance et de production sur milieu SCA.	27
10	Evolution de la cinétique de croissance et de production sur milieu YEGA	28
11	Evolution de la cinétique de croissance et de production sur milieu MSA.	29
12	Evolution de la cinétique de croissance et de production sur milieu ISP ₂ .	30
13	Evolution de la cinétique de croissance et de production sur milieu ISP ₄ .	31
14	Evolution de la cinétique de croissance et de production sur milieu ISP ₅ .	32
15	Les activités des six milieux au dixième jour de culture	32
16	Effet du milieu de culture sur la croissance de la souche T ₁ KJ.	33
17	Effet du milieu de culture sur la production de la souche T ₁ KJ.	33
18	Comparaison entre la cinétique de production d'antifongiques sur milieu SCA et ISP ₅ .	34
19	Extraction au butanol des substances bioactives des filtrats de culture sur six milieux de cultures différents.	35
20	Testes d'activités des phases organiques des six milieux de cultures.	35
21	Régression linéaire entre les résultats prévus par le logiciel et ceux obtenus avec les tests d'activité.	40

22	Contour plot définissant l'interaction entre X_1 et X_2 .	40
23	Contour plot définissant l'interaction entre X_1 et X_3 .	41
24	Contour plot définissant l'interaction entre X_2 et X_3 .	42
25	Test d'activité obtenu après application des conditions optimales.	44

Numéro	Description	Page
I	Chimiotypes rencontrés chez les actinomycètes.	7
II	Models donnés par le Box Behnken pour l'optimisation du milieu M ₂ .	22
III	Caractéristiques morphologiques de la souche T ₁ KJ après 7 jours de croissance	24
IV	Caractéristiques morphologiques de la souche T ₁ KJ après 14 jours de croissance.	25
V	Model expérimental et résultats du RSM pour la production d'antifongiques par la souche T ₁ KJ sur le milieu SCA.	38
VI	Estimation des constantes des trois facteurs (Amidon, Caséine et NaCl) optimisé par le logiciel.	39
VII	Valeurs critiques des variables X ₁ , X ₂ et X ₃ .	43

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Partie bibliographique

Chapitre I : Généralités sur les actinomycètes 3

1. Taxonomie et critères d'identification des actinomycètes 3

1.1. Systématique des actinomycètes 3

1.2. Critères d'identification des actinomycètes 4

2. Cycle de développement des *Streptomyces* 8

Chapitre II : Antifongiques produits par les actinomycètes 10

1. Généralité sur les antifongiques

1.1. Classification des antifongiques selon leur mode d'obtention 11

1.2. Mode d'action des antifongiques 13

2. Optimisation de la biosynthèse des antifongiques 14

2.1. Optimisation des paramètres culturels 14

2.1. Optimisation des paramètres physique 16

3. Optimisation de la production d'antifongiques par le logiciel « Box – Bhenken » 16

Partie expérimentale :

Matériels et méthodes 18

I. Matériels 18

1. Matériels analytiques 18

2. Matériels biologiques 18

2.1. Microorganisme test « Actinomycète »	18
2.2. Germe cible.	18
II. Méthodes	18
1. Vérification de la pureté de la souche T₁ KJ	18
2. Choix du milieu de production liquide	19
2.1. Production d'antifongique en milieu liquide.....	19
2.2. Extraction des antibiotiques	20
3. Optimisation de la composition des milieux de cultures	21
4. Confirmation du modèle	22
Résultats et discussions	23
1. Etude morphologique de la souche d'actinomycète T₁KJ	23
1.1. Micromorphologie	23
1.2. Macromorphologie	26
2. Choix du meilleur milieu de production	27
2.1. Evolution des cinétiques de croissances et des cinétiques de productions.	27
2.2. Comparaison des cinétiques de croissances de la souche T ₁ KJ sur le six milieux.	35
2.3. Effet du milieu de culture sur la production de la souche T ₁ KJ.....	33
2.4. Extraction des antifongiques.	34
3. Optimisation de la production d'antifongique sur milieu SCA	37
3.1. Détermination des interactions entre les variables	37
3.2. Détermination des concentrations optimales des variables.....	44
3.3. Confirmation du modèle.....	45
Conclusion	46
Références bibliographiques	48
Annexe	
Résumé	

Introduction

Introduction

Certaines bactéries suscitent un grand intérêt dans diverses applications, en raison de leur capacité à synthétiser de nombreux métabolites secondaires biologiquement actifs, c'est le cas des Actinomycètes (Oskay *et al.*, 2004). Elles sont surtout réputées pour leur grande production de nombreux métabolites antimicrobiens dont 70% des molécules d'origine microbienne connues sont sécrétées par les actinomycètes (Badji *et al.*, 2009). Le genre *Streptomyces* contribue à la sécrétion de plus de 80% de ces molécules (Boughachiche *et al.*, 2010). Parmi celles-ci, la gamme des antifongiques et des antiviraux est beaucoup plus restreinte que celles des antibactériens (Pallasch, 2002). En effet, c'est seulement depuis cette dernière décennie que la thérapeutique antifongique s'est réellement développé. Cette inertie trouvaient sa justification dans la relative rareté des mycoses systémiques, et le fait que l'on dispose depuis 1960 d'un antifongique systémique, l'amphotéricine B, toxique mais très efficace (Mimoz *et al.*, 2010).

La grande majorité des antifongiques naturels est synthétisée par les actinomycètes (Siva *et al.*, 2010 ; Cheraiti *et al.*, 2012). Toutefois des études d'optimisation doivent être réalisées afin d'améliorer cette production, ceci en déterminant les conditions physiologiques et nutritionnelles amenant à une production maximale (Singh *et al.*, 2009 ; Vijayakuma *et al.*, 2010).

La conception statistique expérimentale est la méthode la plus efficace pour déterminer les concentrations optimales des variables choisies (Niladevi *et al.*, 2009).

Ce travail s'inscrit globalement dans cette problématique.

Nous nous sommes fixés pour objectif l'optimisation de la production d'antifongiques par une souche d'actinomycète en utilisant la méthode « Response surface methodology ».

Nous avons adopté l'approche méthodologique suivante :

La première partie est bibliographique et concerne certaines généralités sur les actinomycètes et leur systématique. Ainsi qu'un aperçu sur l'optimisation de la biosynthèse des antifongiques notamment par le modèle Box Behnken.

La deuxième partie est expérimentale et concerne :

- Dans un premier temps, la confirmation de la pureté de la souche par observation de ces caractères morphologiques ;

- Puis le choix du milieu de culture permettant une meilleure production et ce par suivi des cinétiques de croissance et de production ;

- Ensuite l'application du modèle donné par le logiciel JMP 6 en vue de l'optimisation de la production

- Enfin, la détermination des concentrations optimales de ces variables.

*Synthèse
bibliographique*

Chapitre I

1. Généralités sur les actinomycètes

Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses à Gram positif avec une proportion de C+G élevée (>55%) (Pizzul, 2006). Leur morphologie est très variable, elle va de la forme peu évoluée comme *Mycobacterium*, à des formes très évoluées comme le genre *Streptomyces* qui présente un véritable mycélium non fragmenté et sporulant (Srividya *et al.*, 2012).

Leurs conditions optimales de croissance sont une température entre 25-30°C (50°C pour les thermoactinomycètes) et un pH neutre, mais beaucoup d'espèces ont été isolées à partir d'environnements extrêmes (Pizzul, 2006). La plupart d'entre eux sont immobiles, leur croissance est lente avec un temps de génération de 2 à 3 heures, ils croissent en l'espace de quelques jours à quelques semaines (Larpen et Sanglier, 1989).

Les actinomycètes sont généralement saprophytes (genre *Frankia*), certaines sont pathogènes pour l'Homme (*Mycobacterium tuberculosis*), d'autres pour les animaux (*Actinomyces bovis*) ou pour les végétaux (*Streptomyces scabies*, agent de la galle de la pomme de terre) (Loria, 1986).

Ces bactéries constituent une part importante de la microflore tellurique. Elles sont aussi abondantes en milieu hydrique, dans les eaux des lacs, des rivières, des ruisseaux et également des mers et des océans. C'est essentiellement dans les sédiments des fonds fluviaux ou lacustres que celles-ci sont présentes où elles jouent un rôle important dans la décomposition de la matière organique et les équilibres entre espèces, du fait de leur aptitude à produire des antibiotiques, et de lyse bactérienne (Cherai *et al.*, 2012).

L'air ne constitue pas un habitat pour les actinomycètes, mais un moyen de transport, en effet les spores d'actinomycètes se retrouvent sous forme de gouttelettes aéroportées dans l'air, de ce fait ils sont reconnus comme étant d'importants polluants de l'air intérieur (Gazenko *et al.*, 1998).

1. Taxonomie et critères d'identification des actinomycètes

1.1. Systématique des actinomycètes

Les actinomycètes sont rattachés au phylum des *Actinobacteria*, à la classe des *Actinobacteria*, à la sous classe des *Actinobacteridae* et à l'ordre des *Actinomycetales* créé par Buchanan en 1917 (Bergey's manual, 2007). Dans le manuel de Bergey's (2007), le phylum *Actinobacteria* renferme une seule classe : *Actinobacteria* celle-ci est subdivisée en 5 sous

classe, 6 ordres, 13 sous ordres, (dont 9 appartiennent à l'ordre des *Actinomycetales*), 41 familles, 163 genres et près de 1711 espèces (Bergey's manual, 2007).

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

1.2.Critères d'identification des actinomycètes

La définition des genres et des espèces se fonde sur un ensemble de caractères morphologiques et chimiotaxonomiques (voir annexe I).

1.2.1. Critères morphologiques

Les caractères morphologiques importants sont la présence et la couleur du mycélium aérien (MA) et/ou du substrat (MS), la présence ou non de sporophore sur le mycélium, la présence ou non de sporanges, de sclérotés ou de synnemata, la présence de spores, leur forme, leur mobilité, leur disposition sur les hyphes et leur nombre et enfin, la production et la couleur des pigments solubles sécrétés (PS). Parfois, il est possible de classer une souche dans un genre donné en se basant sur des critères micromorphologiques évidents et particuliers comme par exemple pour les genres *Streptosporangium*, etc (Badji, 2006) (figure 1).

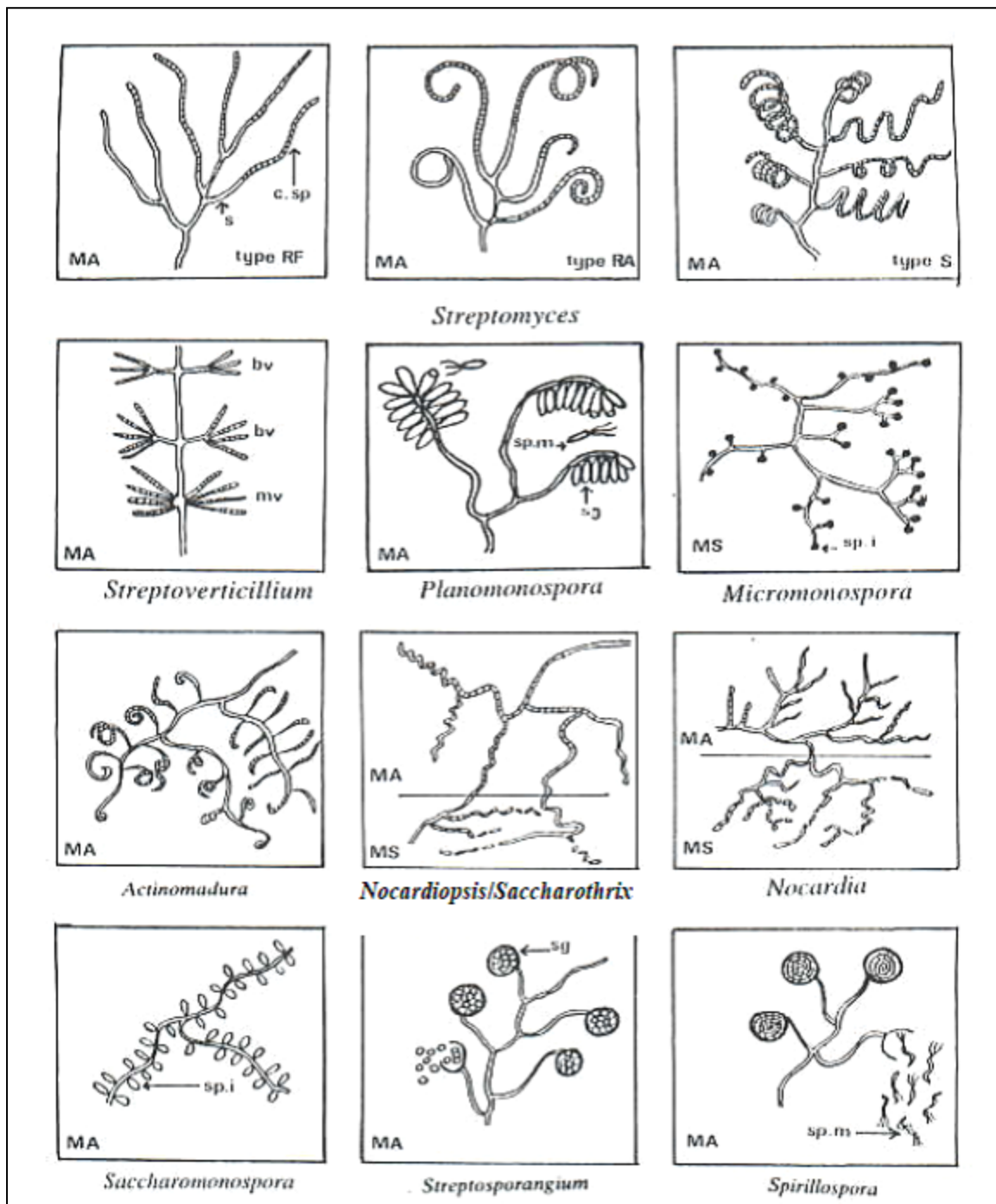


Figure 1 : Micromorphologie des principaux genres d'actinomycètes (In : Bergey's manual of determination bacteriology, 1989).

MA, mycélium aérien ; MS, mycélium du substrat ; RF, *Rectus flexibilis* (chaines de spores droites à flexuses) ; RA, *Retinaculum apertum* (chaines en crochets ou en boucles fermées) ; S, *Spira* (chaines spiralées) ; s, sporophore ; sp. ; Chaines de spores ; sp. i ; spores isolées ; sp.m. ; spores mobiles ; sg., sporanges.

1.2.2. Critères chimiotaxonomiques

La composition de la paroi cellulaire en acides aminés, glucides et lipides constituent le principal caractère utilisé en chimiotaxonomie.

Les deux acides aminés pariétaux taxonomiquement important sont l'acide diaminopimelique (DAP), qui peut être sous deux formes isométriques LL ou DL (*meso*) et la glycine qui peut être présente ou absente (Lechevalier et Lechevalier, 1970). Le DAP peut être parfois remplacé par la lysine, l'ornithine et l'acide diaminobutyrique (Becker *et al.*, 1965).

Les sucres ayant une importance taxonomiques sont principalement les couples « arabinose-galactose », « xylose-arabinose », « rhamnose-galactose », ou encore le madurose (ou 3-O-méthylgalactose) (Lechevalier et Gerber, 1970).

Les lipides cellulaires tels que les acides mycoliques pariétaux qui peuvent être présents ou absents, les phospholipides ainsi que les ménaquinones membranaires sont aussi importants pour l'identification des actinomycètes (Lechevalier *et al.*, 1977).

La détermination des genres d'actinomycètes est ainsi basée sur les critères morphologiques et chimiques, en effet, Becker *et al.*, (1965) et Lechevalier et Lechevalier (1970b) divisèrent les actinomycètes en huit chimiotypes sur la base de l'analyse des acides aminés pariétaux et des sucres cellulaires, et dont les plus importants sont les quatre premiers. (Tableau I).

Tableau 1. Chimiotypes rencontrés chez les actinomycètes (Becker *et al.* 1965).

Chimiotype	D.A.P.		Gly.	Lys.	Orn.	D.A.B.	Sucres			
	LL	DL					Ara. + Gal.	Xyl. +	Rha. +	Mad.
I C	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
II D	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
III B	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
IIIC	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
IIIE	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
IV A	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
V	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
VI	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
VII	-	-	+	v	-	+	-	-	-	-

Note : I, II, III, ..., VIII : définis par Becker *et al.*, (1965) et Lechevalier et Lechevalier (1970) en se basant sur la forme LL ou DL de l'acide diaminopimélique (DAP), la présence ou non de glycine (Gly.), de lysine (Lys.), de l'ornithine (Orn.) ou de l'acide diaminobutyrique (DAB). A, B, C, D et E : définis par Lechevalier et Lechevalier (1970) en se basant sur les sucres taxonomiquement importants : l'arabinose (Ara.), le galactose (Gal.), le xylose (Xyl.), le madurose (Mad.) et le rhamnose (Rha.).

+ : présent. - : absent. v : variable suivant les espèces d'un même genre.

1.2.3. Critères physiologiques

Ces critères couplés à ceux moléculaires, sont utilisés pour la détermination des espèces. Bien que les tests physiologiques (en nombre élevé variant de 70 à 150 en général) aient été utilisés depuis très longtemps, en même temps que la description morphologique, leur efficacité réelle n'est apparue que lorsqu'ils sont utilisés dans le cadre d'une taxonomie numérique (Athalye *et al.*, 1985) qui a permis de surmonter les difficultés inhérentes aux interprétations des grands résultats obtenus (ou matrices complexes). Par le biais d'outils informatiques de calcul, l'utilisation des résultats de ces tests dans la taxonomie des actinomycètes, a ainsi été rendu possible (Goodfellow, 1971).

1.2.4. Critères moléculaires

Avec la prolifération des espèces, l'application des méthodes chimiques et morphologiques s'est avérée insuffisante pour la distinction d'organismes proches ou pour déterminer un groupement rationnel des genres d'actinomycètes (Ouhdouche, 2003).

Les déterminations portent sur le pourcentage de guanine et cytosine, sur le profil de digestion obtenu par électrophorèse des fragments de l'ADN (obtenus par la digestion par

les enzymes de restriction), sur le taux d'hybridation ADN - ADN ou ADN - ARN et sur la séquence de l'ADNr 16S.

2. Cycle de développement des *Streptomyces*

2.1. Croissance en milieu solide

Placées dans des conditions favorables, les spores vont produire un tube germinatif qui va croître (1) et donner des hyphes qui vont se ramifier. Il s'agit du mycélium primaire également appelé mycélium végétatif ou de substrat, qui se développe en surface et à l'intérieur du support. Il est visible à l'œil nu au bout de 2 à 3 jours. Un mycélium secondaire, aérien va ensuite se développer sur la colonie (2). Ces hyphes sont peu ramifiés et pourvus d'une enveloppe hydrophobe, elles peuvent être colorées. Ce mycélium aérien va s'enrouler en spirales aux extrémités (4) puis par cloisonnement et épaissement des cloisons, des spores vont être produites (5 à 7) (figure 2). Ce mycélium secondaire va donner un aspect morphologique poudreux typique à ces colonies. Le développement du mycélium aérien portant des spores peut prendre une à deux semaines (Chater et Merrick, 1979).

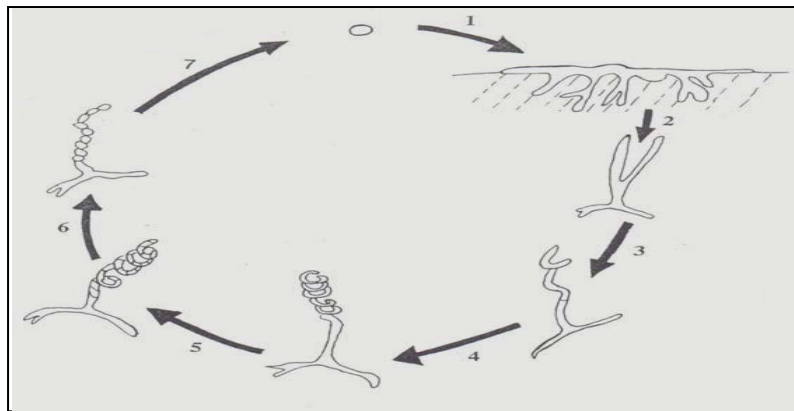


Figure 2: Cycle de croissance en milieu solide de *Streptomyces* (Saffory, 2006).

2.2. Croissance en milieu liquide

La croissance en milieu liquide nécessite une aération du milieu par agitation, et/ou par injection d'air ou d'oxygène puisque ces bactéries sont aérobies strictes. *Streptomyces*, dans ces conditions, croissent par élongation des filaments et peuvent par la suite présenter trois types de morphologie (figure 3) : les hyphes, branchées ou non, sous forme de mycélium dispersé, un mycélium plus ramifié formant des enchevêtrements ou encore des pelotes denses dont la taille peut varier de 0,1 μm à plusieurs millimètres (Amanullah *et al.*, 2000).

Ces pelotes peuvent donner lieu à des limitations de transfert d'oxygène (Papagianni, 2004).

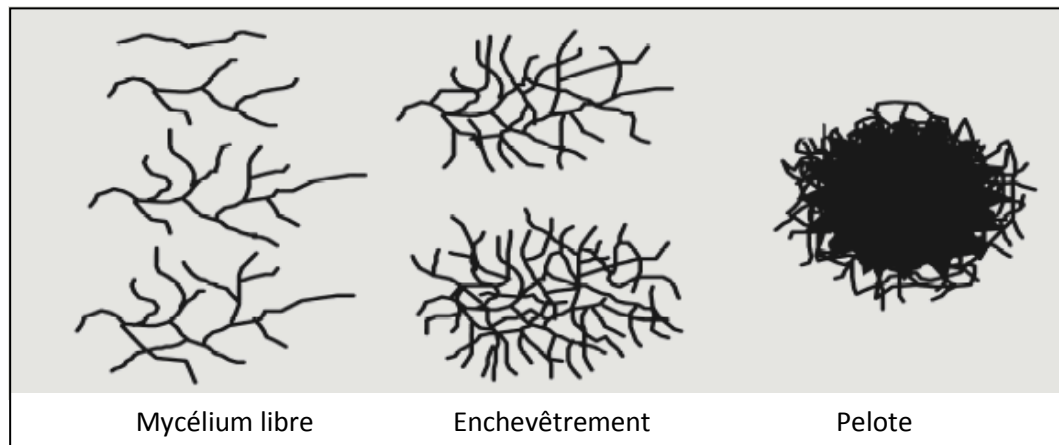


Figure 3 : Morphologie rencontrées au cours de cultures liquides (Amanullah *et al.*, 2000).

Chapitre II

Les infections fongiques, également appelées mycoses, sont des maladies causées par des champignons microscopiques. Durant ces dernières décennies ces infections ont augmenté d'une façon importante. Elles occupent le quatrième rang des infections nosocomiales. Ceci est essentiellement dû à l'augmentation du nombre des patients immunodéprimés, comme les cancéreux, les personnes infectées par le virus de l'immunodéficience humaine (HIV), et les patients ayant subi une greffe d'organes solides (Cheraiti *et al.* 2012). Prés de 90% des mycoses humaines sont provoquées par des espèces appartenant au genre *Candida*, et *Aspergillus* dont les espèces *A.fumigatus*, *A.flavus*, et *A.niger* sont responsables de la majorité des mycoses invasives (Carle, 2003, Couturaud, 2004) comme le montre la figure ci-dessous.

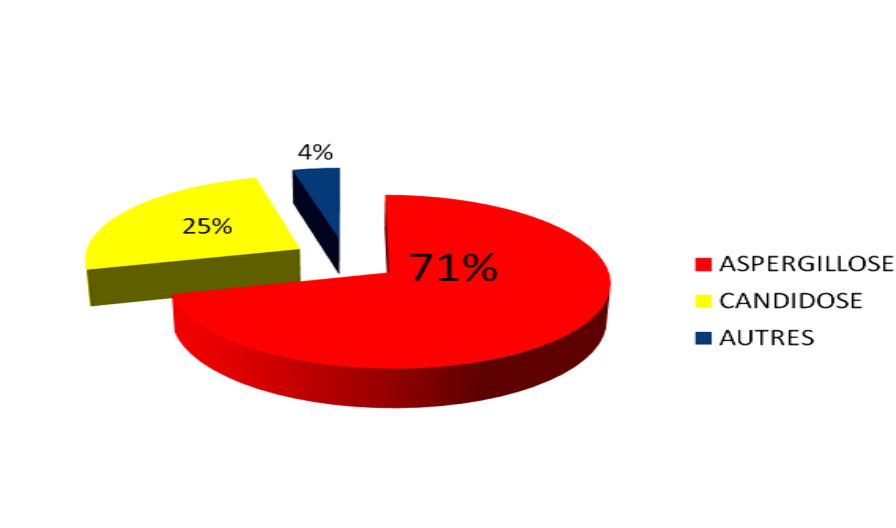


Figure 4 : Répartition des microorganismes provoquant les mycoses chez l'Homme (Bordes, 2009).

La contamination par l'espèce *A.niger* se fait le plus souvent par inhalation de spores en suspension dans l'air. Leur petite taille leur permet d'arriver jusque dans les alvéoles pulmonaires, c'est donc la pathologie pulmonaire qui est au premier plan puis vient les autres infections.

- **Antibiothérapie fongique**

La recherche de nouveaux antifongiques naturels a généré plusieurs centaines de nouvelles molécules. Cependant leur utilisation en thérapie humaine se limite surtout à l'amphotéricine B, à la nystatine, et à la griséofulvine. La raison majeure réside dans la toxicité de ces molécules notamment les antifongiques polyéniques. C'est pourquoi l'industrie pharmaceutique et les chercheurs se sont orientés vers la recherche de nouveaux agents antifongiques plus performants et moins agressifs pour l'organisme (Cheraiti *et al.* 2012).

1. Classification des antifongiques

1.1. Antifongiques polyéniques

Ce sont des macrolides, molécules organiques cycliques amphotères. La plupart sont constitués d'un cycle macro-lactone de 20 à 40 tomes de carbone, (Vendeputt, 2008) et un nombre variable compris entre 2 et 7 doubles liaison $-(CH = CH)-$ conjuguais (d'où leur nom polyènes). Ils sont actifs contre les levures, certains champignons filamenteux comme *Aspergillus* mais sont réputés moins efficace contre les dermatophytes et inactifs sur les bactéries et les virus (Hamoir et *al.*, 2001). Leur action se situe au niveau des stérols membranaires des cellules eucaryotes (champignons, animaux). Vu leur instabilité, leur toxicité et leur activité non spécifique touchant même les cellules animales, ils sont très peu utilisés en thérapie (Zitouni, 2006).

Cette classe pharmacologique rassemble notamment l'amphotéricine B et la nystatine (Hamoir et *al.*, 2001) dont la structure est indiquée dans la figure5.

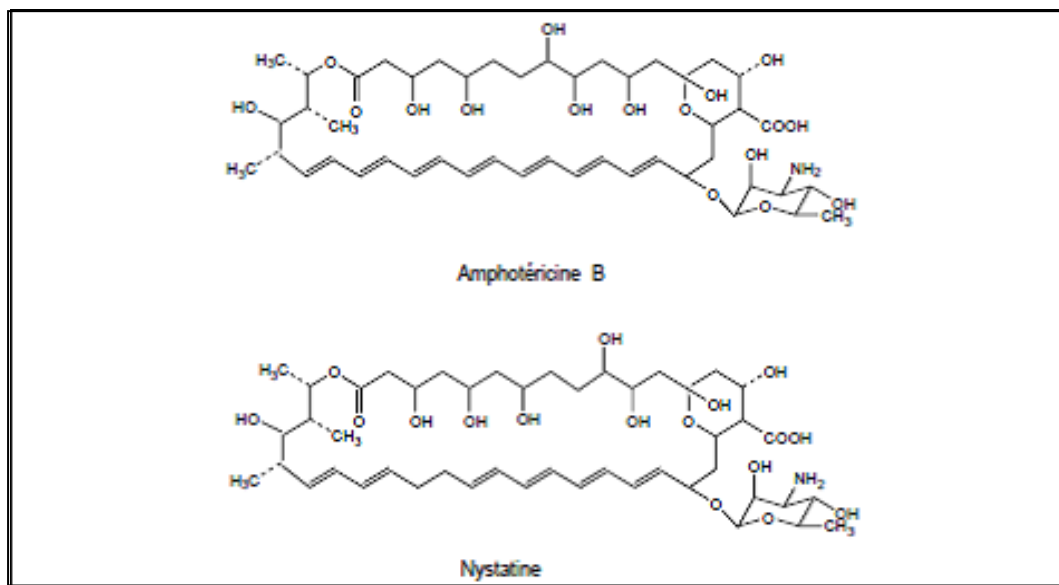


Figure 5 : Structure chimique des deux principaux polyènes antifongiques Amphotéricine B et Nystatine (Vanbambeke, 2008).

1.2. Antifongiques non polyéniques

Les réactions secondaires et une certaine toxicité liée à la structure polyénique des antifongiques ont conduit à la recherche de nouveaux antibiotiques avec en priorité la production de dérivés de structure non polyénique. Contrairement aux précédents appartenant

à la famille des lactones macroliques, ces substances appartiennent à plusieurs famille d'antibiotiques (Berdy *et al.*, 1987) telles que les aminoglycosides (kasugamycine), les aromatiques (griséofulvine), les quinones (certaines anthracyclines), les hétérocycles azotés (blasticidine S), les composés alicycliques (cycloheximide), etc. Leur spectre UV – visible est très variable, mais en aucun cas ils ne présentent les trois pics caractéristiques des polyènes (Martin 1979, Badji, 2006).

Ils jouent un rôle moins important en thérapeutique que les polyènes, mais leur utilisation dans l'industrie alimentaire et dans la lutte contre certains champignons phytopathogènes est relativement courante (Vandamme, 1985).

Parmi tous les antifongiques commercialisés, la griséoflavine joue un rôle important en thérapeutique humaine dans le traitement des mycoses superficielles et sous cutanées (Misato, 1982), il est aussi actif sur les dermatophytes (Bastide *et al.*, 1986).

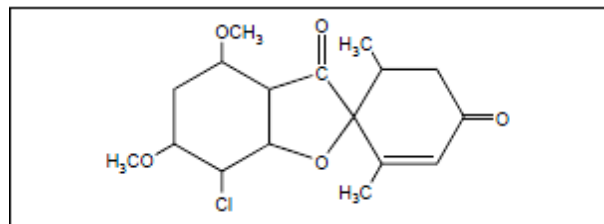


Figure 6 : Structure de la Griséofulvine (Vanbambeke, 2008).

1.3. Antifongiques de synthèse

Jusqu'à la fin des années 50, les seules molécules à usage médicale étaient naturelles. Les premiers antifongiques de synthèse ont été utilisés en agriculture. On estime que depuis 1960 environ, les antifongiques de synthèse ont dominé et ont révolutionné la recherche des antifongiques à usage médicale (Boudemagh, 2007). Les dérivés azoles sont des molécules cycliques organiques, qui peuvent être divisées en deux groupes, les imidazoles, contenant deux atomes d'azote dans le cycle azolé, et les triazolés, contenant trois atomes d'azote (Maertens, 2004). Exemples d'antifongiques de synthèse : Chlormidazole, imidazoles, flucytosine etc.

2. Mode d'action des antifongiques

2.1. Antifongiques polyéniques exemple Amphotéricine B

Les polyènes sont fongicides à haute concentration, mais fongistatiques aux doses thérapeutiques. Leur activité est inversement proportionnelle à la quantité de champignons

présente, et directement fonction du temps de contact entre l'antifongique et le champignon et de l'acidité du milieu (l'adsorption au champignon étant favorisée en milieu acide) (Vanbambeke, 2008). Les polyènes ont pour cible l'ergostérol, le principal composant de la membrane plasmique des champignons. Leur caractère amphotère leur permet de s'associer à la bicouche lipidique de la membrane fongique, en formant des pores. Cette formation des pores provoque la déstabilisation de la membrane plasmique tandis que le canal permet la fuite de composants intracellulaires, et notamment d'ions K⁺, à l'origine de la lyse cellulaire (Lemke *et al.*, 2005).

2.2. Antifongiques non polyéniques exemple Griséofluline

La griséofulvine est active sur les dermatophytes, mais pas contre les agents des mycoses profondes. Elle interfère avec la synthèse des acides nucléiques, la formation des parois des hyphes, les microtubules du fuseau mitotique. Son action est fongistatique (Vanbambeke, 2008).

2.3. Antifongiques de synthèse exemple Azolés

Les antifongiques azolés ont pour cible la voie de biosynthèse de l'ergostérol, principal composant de la membrane fongique. Ils inhibent spécifiquement la lanosterol 14 adémethylase à cytochrome P450, codée par le gène *erg 11*. Cette inhibition se fait par la liaison de l'atome d'azote libre du cycle imidazole ou triazole à l'atome de fer de l'hème de l'enzyme et a pour conséquence l'accumulation de dérivés 14a méthyles, dont la métabolisation par les enzymes situées en aval d'ERG11p dans la voie de biosynthèse produit des dérivés toxiques, incapables de remplacer l'ergostérol (Carillo-Munoz *et al.*, 2006).

3. Optimisation de la production d'antifongique

La production microbienne de métabolites secondaires est généralement influencée par le métabolisme primaire de la souche productrice en effet, dans beaucoup de voies du métabolisme secondaire, les métabolites primaires augmentent la production de métabolites secondaires soit en participant à l'augmentation de l'offre en précurseurs, soit induisant la production d'enzymes de la voie métabolique ou alors, les deux à la fois. Exemple, la lysine dont le produit de dégradation est l'acide α aminoadipique précurseur de la céphamycine (Strub, 2008).

Toute fois, la composition du milieu de culture influence les capacités métaboliques de l'organisme producteur ainsi que la biosynthèse de métabolites secondaires.

(Miao *et al.*, 2006 ; Yu *et al.*, 2008). Une approche d'optimisation efficace des conditions de production de biomolécules à partir de la souche sélectionnée peut être réalisée à travers des études et des analyses des conditions physico-chimiques de la culture ainsi que la composition du milieu de croissance et de production. Il y a couramment une étroite relation entre le taux de croissance et le rendement maximal des métabolites secondaires biologiquement actifs. Le rendement des composés bioactifs est généralement augmenté suite à l'optimisation des facteurs chimiques (composition du milieu, précurseurs, inhibiteurs, oligoéléments, etc.) et physiques (température, pH, aération, etc.) pour la croissance microbienne (Smaoui, 2010).

3.1. Optimisation de la composition du milieu de culture

La nature et la concentration de certains composés dans le milieu de culture ont un effet éminent sur la production des métabolites secondaires biologiquement actifs. En fait, les travaux de Gesheva *et al.*, (2005) cité par Smaoui, 2010 ont montré que la nature des sources : de carbone, d'azote, de phosphore, de potassium, de magnésium et de trace d'éléments minéraux (essentiellement Mn^{2+} , Cu^{2+} et Fe^{2+}), affectent fortement la production de la molécule antifongique (Smaoui, 2010).

3.1.1. Influence des sources carbonées

Pour la plupart des microorganismes producteurs d'antibiotiques, une source de carbone rapidement assimilable exerce une action négative sur la biosynthèse (répression catabolique ou «effet glucose») (Larpen et Larpen-Gourgaud, 1990). La production spécifique de métabolites secondaires s'avère souvent meilleure sur une source de carbone complexe, plus difficilement métabolisable comme les polysaccharides (amidon, dextrines) (Lebrihi *et al.*, 1988 ; Lounès *et al.*, 1995) et les oligosaccharides que sur une source de carbone rapidement assimilable telle que le glucose ou le glycérol.

3.1.2. Influence des sources d'azotes

La forme sous laquelle l'azote est apporté aux cultures influe sur les rendements. Les ions ammonium exercent un effet négatif sur la production d'antibiotiques chez les actinomycètes, cela se traduit par un effet de la concentration d'un substrat naturel approprié ou sous forme d'acides aminés lentement métabolisés (Loucif, 2011).

3.1.3. Influence des sources de phosphate

Si la croissance des micro-organismes réclame des concentrations en phosphate inférieures à 10 mM (Strub, 2008), la synthèse de très nombreux métabolites secondaires est inhibée par des concentrations trop élevées (Larpen et Larpen-Gourgau, 1990). Le phosphate inorganique inhibe la synthèse des antibiotiques, chez les actinomycètes. Non seulement le phosphate affecte le niveau de production des antibiotiques et les vitesses de formation mais il peut aussi retarder le délai d'initiation de la synthèse des métabolites secondaires (Dekleva *et al.* , 1985).

3.1.4. Influence des sources de sels minéraux et d'oligoéléments

L'addition de CaCO₃ est souvent effectuée pour maintenir le pH aux environs de la neutralité. Plusieurs chercheurs utilisent le carbonate de calcium pour favoriser la croissance bactérienne et augmenter la biomasse cellulaire, et par la même, la production d'antibiotiques. Le NaCl augmenterait la perméabilité membranaire et de ce fait, renforce l'approvisionnement de la cellule en précurseurs d'antibiotiques. Par exemple, la production de streptomycine et de la tétracycline est améliorée par l'addition respectivement de 0,5% et de 1% de NaCl, alors que des concentrations plus élevées répriment la biosynthèse. La synthèse de métabolites secondaires a une tolérance plus faible à la gamme de concentration en oligoéléments que la croissance. Plusieurs oligoéléments (Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo), cofacteurs de la croissance des microorganismes, sont nécessaires à des concentrations très faibles (environ 10⁻⁷ M). Certains jouent un rôle important, quantitativement et qualitativement, dans la biosynthèse des antibiotiques (Strub, 2008).

3.2.Optimisation des paramètres physicochimiques

3.2.1. Effet du pH, de la température, de l'agitation et du temps d'incubation

Les conditions de culture comme le pH, la température, l'agitation et le temps d'incubation, affectent énormément la production des métabolites secondaires.

Depuis longtemps, il a été démontré l'influence du pH sur la production de plusieurs métabolites organiques du métabolisme secondaire. En effet, la production d'antifongique par la souche *Streptomyces rochei* AK39 est affecter par les variations du pH, de ce fait, elle peut être stimulé ou inhibé. L'agitation quant à elle, affecte l'aération et le mélange des éléments nutritifs dans le milieu de fermentation et par conséquent la production de métabolites

secondaires. La concentration en oxygène dissous est un paramètre important dans la production de métabolites secondaires. Chez les *Streptomyces*, le temp d'incubation est un facteur important dans l'évolution de la production des métabolites secondaires, celui-ci varie d'une espèce à une autre (Smaoui, 2010). Par exemple pour la souche *Streptomyces rochei* AK39, qui produit un métabolite antifongique, la production commence après quatre jours d'incubation pour atteindre un maximum après huit jours (Augustine *et al.*, 2005).

3.2.2. Effet du taux de croissance

Beaucoup d'antibiotiques semblent être produits à faible taux de croissance comme c'est le cas pour *Saccharopolyspora erythraea*, chez *S. hygroscopicus*, chez *S. Clavuligerus*. Le problème est qu'il est difficile de déterminer le rôle du taux de croissance dans l'initiation du métabolisme secondaire car il n'est pas indépendant du phénomène de limitation nutritionnelle. Autrement dit, une limitation nutritionnelle provoque systématiquement une diminution du taux de croissance alors il n'est pas possible de faire la différence entre l'effet de la limitation nutritionnelle et l'effet du ralentissement du métabolisme primaire (Strub, 2008).

4. Optimisation alternative de la production d'antifongiques par utilisation du modèle « Box – Bhenken »

La méthode traditionnelle d'optimisation est celle variant un seul facteur à la fois (one factor at time OFAT) (Xianoyong *et al.*, 2010). Malheureusement, cette méthode a certains d'inconvénients : le nombre d'expériences est très élevé, cela consomme beaucoup de temp, surtout lors de la réalisation d'un criblage a partir de variables multiples (Feng *et al.*, 2011) mais aussi cette méthode ne considère pas les interactions existantes entre les variables (Kumar *et al.*, 2012).

Actuellement une alternative stratégique est utilisée : l'optimisation statistique en utilisant le modèle de « Box – Behnken, 1960 » (Niladevi *et al.*, 2009) qui s'est avéré être une approche plus efficace (Juntao *et al.*, 2011). En effet la méthodologie de surface réponse (Response Surface Methodology (RSM)) offre un criblage rapide a partir d'un domaine expérimental large, permettant d'évaluer les principales interactions existantes entre les variables, ainsi que leur effet quadratique, en plus d'optimiser les facteurs dans le but d'augmenter la production (Niladevi *et al.*, 2009). Plus encore, ce logiciel permet de réduire le nombre d'expérience réalisable se qui est un gain de temp considérable, donne des résultats

plus précis que ceux obtenue par la méthode traditionnelle et le résultat permet une réelle augmentation de la production (Kumar *et al.*, 2012).

La méthodologie de « surface réponse » est une collection de techniques mathématiques et statistiques à fin de construire des modèles statistiques dans le but d'optimiser la production de composés importants à l'échelle industrielle comme le cas des enzymes. Récemment, cette méthode à été adapté a l'optimisation des paramètres cultureux pour la production par exemple de lipopeptides cycliques en fermentation liquide (Xianoyong *et al.*, 2010), ou encore l'optimisation de la production de Xylanases (Kumar *et al.*, 2012), dans l'optimisation des paramètres physiques a s'avoir la température, le pH, l'agitation, temps d'incubation etc. (Feng *et al.*, 2011). Mais aussi dans l'optimisation de la production d'antibiotiques et d'antifongiques (Banga *et al.*, 2008).

*Matériel
et
méthodes*

I. Matériel

1. Matériel analytique : (voir annexe II)

2. Matériel biologique

2.1. Microorganismes tests « Actinomycètes »

La souche d'actinomycète (T₁ KJ) utilisée dans cette étude appartient à la collection du laboratoire de microbiologie appliquée « LMA » de l'université A/Mira de Bejaia, elle a été isolée à partir d'un échantillon de sol prélevé au sein du Parc National de Tikjda (Wilaya de Bouira) par Mr MESSIS (doctorant au laboratoire de Biochimie Microbienne). Cette souche a été sélectionnée pour son activité antifongique.

2.2. Souche cible

Une souche d'*Aspergillus niger* 2CA936, a été utilisée. Cette dernière a été retenue en raison de sa faible résistance à de nombreux antifongiques produits par les actinomycètes après criblage de 22 autres germes cibles testés.

II. Méthode

Avant d'entamer l'étude expérimentale, des repiquages successifs sur milieu SCA de la souche d'actinomycète (T₁ KJ) ont été réalisés. Cette souche étant conservée dans des tubes contenant du milieu M2 préconisé pour l'isolement sélectif des actinomycètes. Une incubation à 28 °C pendant 07 à 10 jours en vue de s'assurer de la viabilité de ces microorganismes.

1. Vérification de l'identité de la souche T₁ KJ

Afin de s'assurer de la viabilité de la souche, des repiquages successifs ont été réalisés sur le milieu SCA à 28 °C.

1.1. Caractères macromorphologiques

La croissance et la couleur du mycélium aérien et du substrat ainsi que la production de pigments diffusibles ont été observés après 7, 14 et 21 jours d'incubation à 28°C sur les milieux préconisés par « l'*International Streptomyces Project* » : ISP 1, ISP2, ISP3, ISP4, recommandés par Shirling et Gottlieb, (1966), ainsi que sur milieu GYEA modifié d'Athalye *et al.* (1981).

1.2. Caractères micromorphologiques

L'observation de la morphologie des chaînes de spores et la fragmentation ou non des mycélium est effectuée sur les différents milieux cités précédemment, en utilisant un microscope optique (*Optika*) aux grossissements 10 x 10 et 10 x 40, après 7,14 et 21 jours.

2. Choix du milieu de production d'antifongique liquide

Dans le but de déterminer le milieu de culture liquide permettant une production acceptable d'antifongiques, nous avons testé les milieux (dont la composition est donnée en Annexe III) suivants :

- Cinq milieux complexes : SCA (Starch Casein Agar), YEGA (Yeast Extract Glucose Agar), ISP₂, ISP₄, ISP₅ qui diffèrent par la source de carbone, d'azote et de sel minéraux ;
- Un milieu synthétique MSA (Milieu Synthétique a base d'Amidon).

2.1. Production d'antifongiques en milieu liquide

Des tubes contenant 3 ml de chaque milieu stérile ont été ensemencés avec des spores obtenues par raclage de culture de l'isolat à étudier. Après 3 jours d'incubation à 28°C, sous agitation rotative à 250 rpm, ces cultures ont servi de pré-cultures pour ensemercer des volumes plus importants.

2.1.1. Cinétique de croissance par mesure du poids sec

L'évolution de la biomasse a été suivie en réalisant des prélèvements (3 ml de chaque milieu et à raison de 1ml dans chaque tube eppendorffs) quotidiens et ce pour les six milieux de cultures (à partir du 2^{ème} jour de culture).

La mesure du poids sec a été réalisée selon la méthode de Pfefferle *et al.* (2000), cité par Lamari, (2006). Les échantillons ont été centrifugés à 7000 rpm / 15 min. Le culot a été récupéré, puis lavé deux fois à l'eau distillée et séché dans une étuve à 105°C pendant 3h.

2.1.2. Cinétique de production d'antifongique

Le suivi de la production d'antifongique a été réalisé quotidiennement en prélevant 3 ml de chaque milieu de culture dans des tubes eppendorffs (1ml dans chaque tube eppendorffs). Ces tubes sont centrifugés à 7000 rpm pendant 15 min à 4°C. Le surnageant obtenu subit une stérilisation par filtration sur membrane Millipore (0,45 µm Ø). Ce filtrat

stérile, a servi pour la réalisation du test d'activité par la méthode des puits (Nouasri, 1996) vis-à-vis de la souche cible *Aspergillus niger*.

La lecture des boîtes se fait en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour du puits après 48h à 5 jours.

- **Standardisation de l'inoculum de la souche cible**

La standardisation du germe cible *Aspergillus niger* est réalisée en utilisant la méthode des suspensions-dilutions ; accompagnée d'une mesure de la densité optique. Une DO = 0,46 à une longueur d'onde de 628 nm de la solution mère sur un spectrophotomètre (Shimadzu UV mini.1240) correspond à un inoculum de 10^8 spores/ml.

- **Test d'activité antifongique**

Pour la réalisation de ce test d'activité par la méthode des puits, le milieu extrait de malt à été utilisé. Après solidification du milieu, 1ml de la suspension sporale du germe cible (10^6 spores / ml) a étéensemencé par inondation dans la boîte de Pétri.

Des puits de 6,9 mm de diamètre ont été formés avec un emporte-pièce. Une goutte de gélose blanche à été déposée au fond de chaque puits, pour éviter la diffusion sous la gélose. 100 à 150 μ l de chaque surnageant de culture de la souche sur les six milieux testés stériles ont été introduits dans le puits.

Sachant que, pour chaque surnageant, trois boîtes de Pétri ont été utilisées. Les boîtes ont été maintenues à 4°C pendant 2h pour permettre la diffusion des substances actives, puis incubées à 28°C pour le champignon.

L'activité antifongique a été évaluée en mesurant les diamètres des zones d'inhibition autour des puits après 48 – 72h.

2.2. Extraction des antifongiques

2.2.1. À partir du mycélium (cellules)

La méthode utilisée est celle de Mechlinski (1978). Après 10 jours de culture, le mycélium récupéré après centrifugation (7000 rpm, 15 min) est lavé trois fois avec de l'eau distillée pour éliminer les traces du milieu, puis égoutté et pesé. 1g de mycélium humide est extrait par 50 ml de méthanol, sous agitation durant 2h à température ambiante. Après centrifugation (7000 rpm, 15 min) et évaporation à 37°C au Rotavapor du surnageant, le produit sec est repris dans 2 ml de méthanol (80%) et ce, afin de réaliser une antibiographie.

2.2.2. À partir du filtrat de culture

L'extraction a été réalisée en utilisant 100 ml de *n*-butanol ajoutés à 100 ml de filtrat de culture (âgé de 10 jours) dans une ampoule à décanter.

La phase organique a été récupérée, puis évaporée à sec au Rotavapore 40°C.

Les résidus secs ont été repris dans 2ml de méthanol 80 %, stérilisés par filtre millipores (0.45µm) puis testés par antibiographie.

3. Optimisation de la composition des milieux de cultures

Dans le but de déterminer les concentrations optimales en sources de carbone, d'azote et [NaCl] permettant une bonne production d'antifongique par la souche d'actinomycète T1KJ, une étude statistique expérimentale a été réalisée, en utilisant un logiciel de plan d'expérience JMP version 6 par le modèle « Box Behnken » (Niladevi *et al.*, 2009).

Cette étude est réalisée sur le meilleur milieu sélectionné précédemment. Les variations des concentrations portent essentiellement sur la source de carbone, la source d'azote ainsi que sur la [NaCl] comme le montre le tableau II.

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

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_{ij}$$

Où X_i sont les variables correspondant aux facteurs étudiés (source de carbone, la source d'azote ainsi que sur la [NaCl]). Y est la production d'antifongique prédite par le modèle pour ces valeurs expérimentales (Niladevi *et al.*, 2009, Xianoyong *et al.*, 2010).

On appelle les coefficients :

β_0 : Constante de l'équation de régression ; β_i : $i^{\text{ème}}$ coefficient linéaire ; β_{ii} : $i^{\text{ème}}$ coefficient quadratique ; β_{ij} : $i^{\text{ème}}$ coefficient d'interaction.

Ce plan factoriel admet que la réponse est linéaire quand un facteur passe d'un niveau minimale à un niveau maximal symbolisés par les signes (-) et (+) définissant la valeur basse et haute de chaque facteur respectivement. Ainsi les facteurs choisies ont été analysées à trois niveaux : la concentration la plus basse, la moyenne et la plus haute ce qui donne respectivement -1, 0, +1, l'unité de la source de carbone a été fixée à 5, celle de la source d'azote a été fixée à 0,2, pour le NaCl elle a été fixée à 2. Un total de quinze modèles expérimentaux a été livré par ce logiciel.

Tableau II: Model donné par le “ Box Behnken » pour l’optimisation du milieu SCA.

Nombre D’expérience	Variables		
	X ₁	X ₂	X ₃
01	0	-1	1
02	0	0	0
03	1	1	0
04	1	-1	0
05	0	1	-1
06	-1	1	0
07	1	0	-1
08	-1	0	1
09	0	0	0
10	0	-1	-1
11	0	1	1
12	1	0	1
13	0	0	0
14	-1	0	-1
15	-1	-1	0

X₁ : source de carbone, X₂ : source d’azote, X₃ : source de NaCl.

Ces 15 expériences ont été réalisées, des pré-cultures de 3 jours de 1,5 ml puis des cultures de 50 ml ont été incubée pendant 10 jours dans un bain marie à 28°C sous une agitation de 250 rpm durant 10 jours. Les surnageants de culture obtenues, ont subits une concentration au Rotavapor a 5ml puis stérilisés par des filtres seringues (de 0,45 µm). 150 µl de chaque filtrat à été utilisé pour tester l’activité contre *Aspergillus niger*. Le diamètre des zones d’inhibition a été mesuré pour les 15 expériences, cette valeur correspond au Y pour chaque expériences (Y₁, ...Y₉, ...Y₁₅), puis introduit dans le logiciel pour les valeurs correspondante afin d’obtenir les concentrations optimales des sources étudiées.

4. Confirmation du modèle

Une confirmation pratique du modèle obtenu après optimisation est nécessaire. Après avoir calculé les concentrations optimales des facteurs étudiés, celle-ci ont été utilisées pour la réalisation des précultures de 3 jours puis des cultures de 10 jours. Le surnageant obtenu de cette culture a été concentré à un volume de 5ml, stérilisé par filtre millipore puis des testes d’activité antifongiques ont été réalisés dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment. La zone d’inhibition obtenue doit être comparée à l’intervalle prédit par le logiciel en respectant une marge d’erreur définie.

*Résultats
et
discussion*

Ce travail qui a été réalisé au sein du laboratoire de Microbiologie Appliqué de l'Université A/Mira- Bejaia, de la période allant de 02/2012 jusqu'à 06/2012. Nous présentons les résultats obtenus en trois parties

- La première partie est consacrée à l'étude des caractères morphologiques de la souche d'actinomycètes T₁KJ ;
- La deuxième partie est consacrée au choix du milieu permettant une meilleure production d'antifongiques ;
- La troisième partie porte sur l'optimisation des concentrations du meilleur milieu de production d'antifongiques.

1. Etude morphologique de la souche d'actinomycètes T₁KJ

Les caractéristiques de la souche T₁KJ ont été notées sur sept milieux différents: ISP₁, ISP₂: ISP₃, ISP₄, ISP₅, SCA et YEGA après 7, 14 et 21 jours d'incubation à 28 °C. L'observation a été réalisée sous loupe binoculaire et au microscope optique.

1.1. Macromorphologie

Au bout du 7^{ème} jour, la souche T₁KJ a présenté une bonne croissance ainsi qu'une bonne sporulation sur les milieux ISP₂, ISP₄, ISP₅ et M₂, par contre celles-ci sont modérées sur milieu YEGA et ISP₃ très faibles sur milieu ISP₁ (faible production du mycélium de substrat et de mycélium aérien).

La couleur du mycélium aérien et du mycélium du substrat diffère selon le milieu, il varie du blanc craie pour les milieux : ISP₁, ISP₂, ISP₃, M₂ et YEGA au jaune sur milieu ISP₄ et au beige sur milieu ISP₅.

Le mycélium de substrat est faible pour le milieu ISP₁, modéré pour le milieu ISP₃ et YEGA et très abondant sur ISP₂, ISP₄, ISP₅ et M₂.

La production de spores est plus abondante sur le milieu ISP₄ et M₂ contrairement aux autres milieux.

Le milieu ISP₁, qui est un milieu préconisé pour la production de pigments n'a pas changé de couleur, ce qui indique qu'il n'y a pas eu de production de pigments mélanoides.

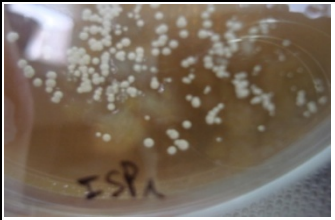
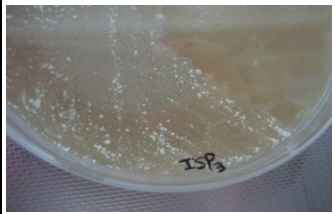
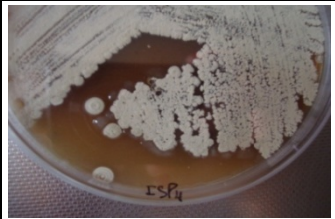

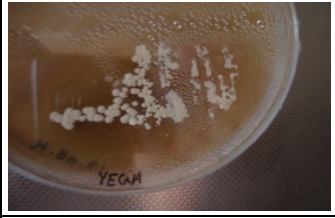
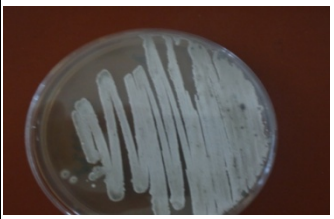
Le tableau III et IV décrivent les caractéristiques morphologiques de la souche T₁KJ après 7 et 14 jours de croissance sur les différents milieux précédents.

Tableau III:Caractéristiques morphologiques de la souche T₁KJ après 7 jours de croissance

Milieu	Croissance	Mycélium Aérien	Mycélium de Substrat	Spoires	Pigment soluble
ISP ₁	+	Faible Blanc clair (craie)	Présent Pauvre	Blanc craie	Absent
ISP ₃	+	Modéré Blanc clair	Non visible Pauvre	Blanc claire	Absent ou non visible
ISP ₄	++++	Abondant Jaune	Présent Abondant	Abondant Jaune	Marron Caramel
ISP ₅	+++	Modéré Beige	Présent	Beige	Rose clair
YEGA	++	Blanc	Présent	Modéré Blanc	Marron Jaunâtre
ISP ₂	+++	Abondant Blanc clair	Présent	Abondant Blanc clair	Marron
M2	++++	Abondant Blanc claire	Présent	Abondant Blanc claire	Blanchâtre

++++ : Très bonne, +++ : Bonne, ++ : Modérée, + : Faible.

Tableau IV : Caractéristiques morphologiques de la souche T₁KJ après 14 jours de croissance.

Milieu	Croissance	Mycélium Aérien	Mycélium de Substrat	Spores	Pigment soluble	Figures
ISP ₁	+	Faible Blanc clair (craie)	Présent Pauvre	Blanc craie	Absent	
ISP ₃	+	Modéré Blanc claire	Visible Jaune	Blanc claire	Absent ou non visible	
ISP ₄	++++	Abondant blanchâtre	Présent Abondant	Blanc craie	Marron foncé	
ISP ₅	++++	Modéré Beige	Présent	Beige	Rose clair	
YEGA	+++	Blanc	Présent	Modéré Blanc	Jaunâtre	
ISP ₂	++	Abondant Blanc clair	Présent	Abondant Blanc claire	Marron	
M2	++++	Abondant Blanc claire	Présent	Abondant Blanc claire	Blanchâtre	

++++ : Très bonne, +++ : Bonne, ++ : Modérée, + : Faible.

- Les résultats observés au 21^{ème} jour sont identiques à ceux obtenus au 14^{ème} jour.

1.2.Micromorphologie

Les observations microscopiques sont effectuées directement sur boîte de Pétri après 7, 14 et 21 jours. On a observé des hyphes fins très ramifiés et non séptés, non fragmentés portant des chaînes de spores du type RF (*Rectus- Flexibilis*). Ce type de mycélium est caractéristique du genre *Streptomyces* (Figures 7,8).

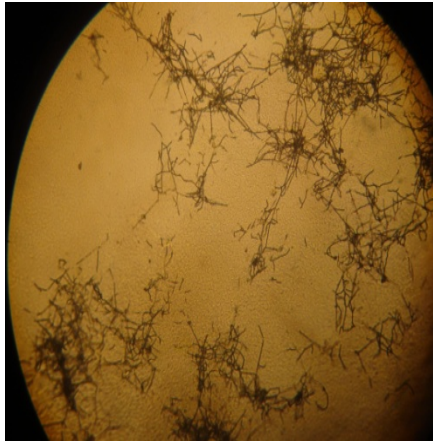


Figure 7 : Observation au microscope de la souche d'actinomycètes T₁KJ (Grossissement × 10).

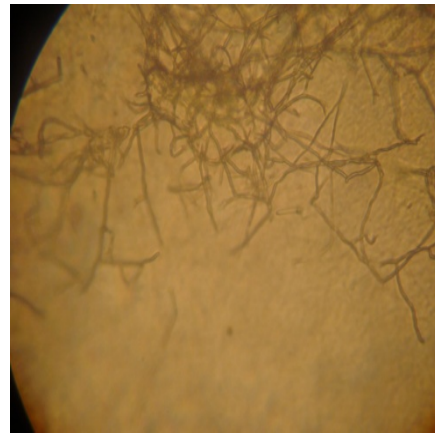


Figure 8 : Observation au microscope de la souche d'actinomycètes T₁KJ (Grossissement × 40).

D'après ce qui précède, on déduit que l'isolat T₁KJ peut croître sur une large gamme de milieux de culture en accord avec les résultats de Tahakur *et al.*, (2007) et Banga *et al.*, (2008). Cet isolat montre des caractéristiques typiques, une chaînes de spores portés par le mycélium, hyphes liés au genre *Streptomyces* (Jongrungruangchok *et al.*, 2006; Vijayakumar *et al.*, 2008).

2. Choix du meilleur milieu de production

Six milieux ont été testés dans le but d'obtenir la meilleure production d'antifongiques : SCA (Starch Casein Agar), YEGA (Yeast Extract Glucose Agar), ISP₂ (International Streptomyces Project 2), ISP₄, ISP₅ et MSA (Milieu Synthétique). Ces milieux diffèrent par la source de carbone, d'azote et de minéraux. Les paramètres étudiés étaient : la cinétique de croissance de la souche T₁KJ (par la mesure des poids sec), ainsi que la cinétique de production des antifongiques (par la mesure du diamètre des zones d'inhibitions de surnageant brut des prélèvements effectués quotidiennement).

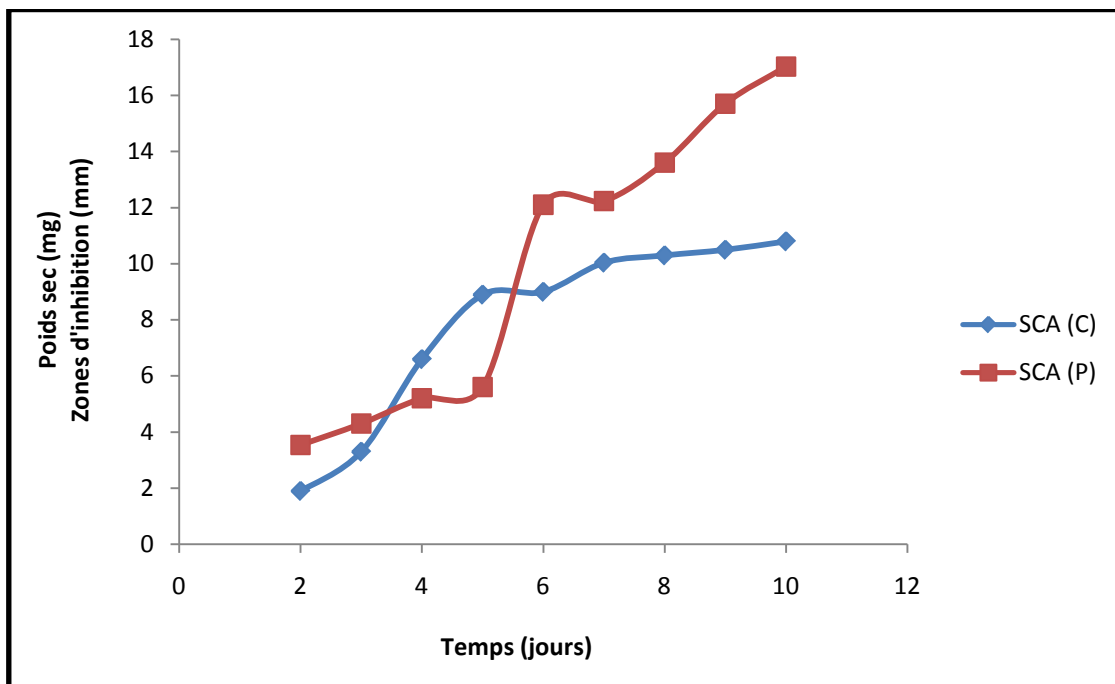
Ces paramètres ont été suivis à partir du 2^{ème} jour jusqu'au 10^{ème} jour de culture.

2.1. Evolution des cinétiques de croissances et des cinétiques de productions

2.1.1. Suivi de la croissance et de la production sur milieu SCA

a. Croissance

La phase de latence est inexistante, cela est probablement dû à la présence de préculture dans le même milieu, favorisant l'adaptation des cellules, et la synthèse des enzymes nécessaires à la dégradation de ce substrat (figure 9).



C : Croissance (mg) P : Production (mm)

Figure 9 : Evolution de la cinétique de croissance et de production sur milieu SCA.

b. Production

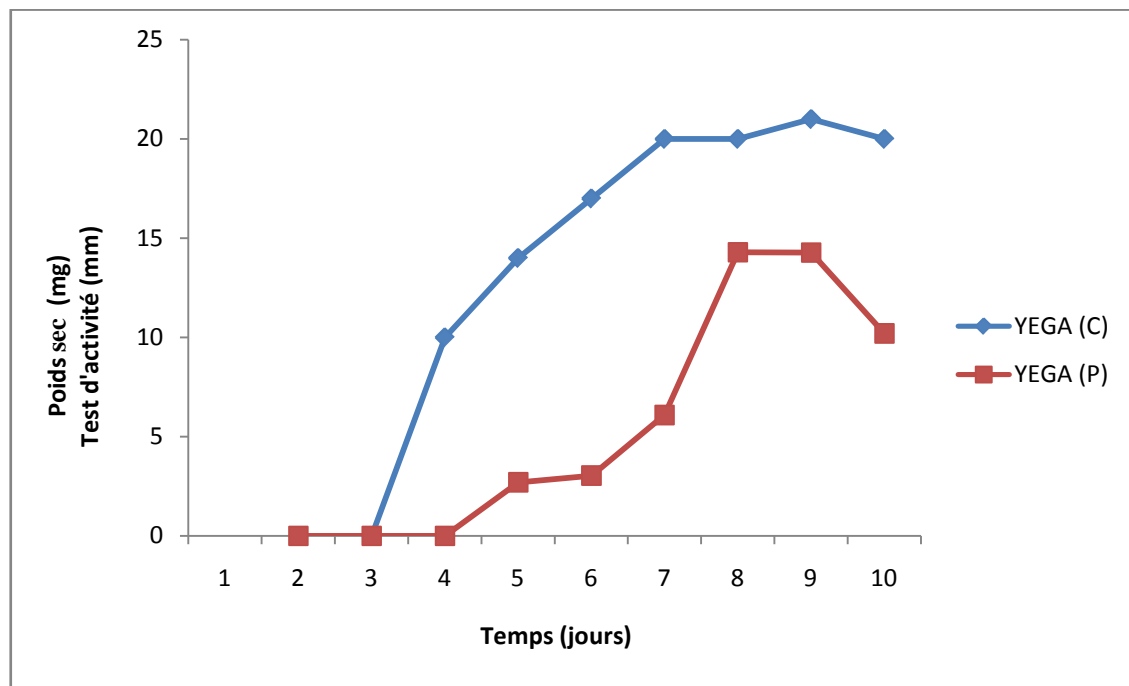
La production d'antifongiques débute à partir du 2^{ème} jour de culture (zone d'inhibition de 3.54 mm). Cette production augmente proportionnellement à la croissance.

Au bout du 10^{ème} jour de culture, la croissance ralentie et la production d'antifongique augmente (phase stationnaire) et atteint (au bout du 10^{ème} jour de culture) une zone d'inhibition de 17,02 mm (Figure 9).

2.1.2. Suivi de la croissance et de la production d'antifongique sur milieu YEGA

a. Croissance

La croissance rapide s'explique par le fait que la source de carbone qui est le glucose est facilement assimilable par la souche ce qui entraîne une augmentation rapide de la croissance, celle-ci commence à ralentir à partir du 7^{ème} jour ce qui correspond au début de la phase stationnaire (Figure 10).



C : Croissance P : Production

Figure 10: Evolution de la cinétique de croissance et de production sur milieu YEGA

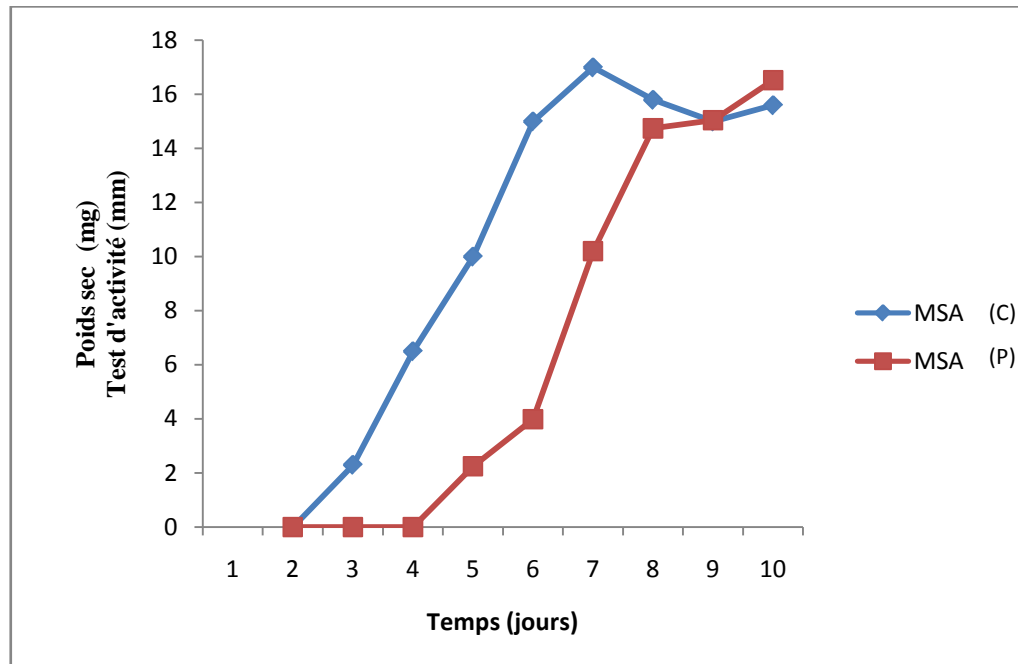
b. Production

La production d'antifongique débute par contre dès le 5^{ème} jour, (zone d'inhibition de l'ordre de 2,7 mm). Cette production augmente proportionnellement à celle de la croissance pour atteindre une zone d'inhibition maximale de 14,29 mm et ce au bout du 9^{ème} jour de culture. Après quoi, elle diminue pour atteindre une zone d'inhibition de 10,20 mm au 10^{ème} jour de culture (Figure 10).

2.1.3. Suivi de la croissance et de la production du milieu MSA

a. Croissance

La croissance évolue rapidement dans le cas de l'utilisation d'un substrat carboné complexe (amidon), la préculture aurait permis à la souche de s'adapter et de synthétiser les enzymes nécessaires à la dégradation de ce substrat (Figure 11).



C : Croissance P : Production

Figure 11: Evolution de la cinétique de croissance et de production sur milieu MSA.

b. Production

La production débute au 5^{ème} jour (zone d'inhibition de 2,25 mm), l'augmentation de la production est proportionnelle à l'augmentation de la croissance jusqu'à donner une zone maximale d'inhibition de 16,52 mm au bout du 10^{ème} jour de culture.

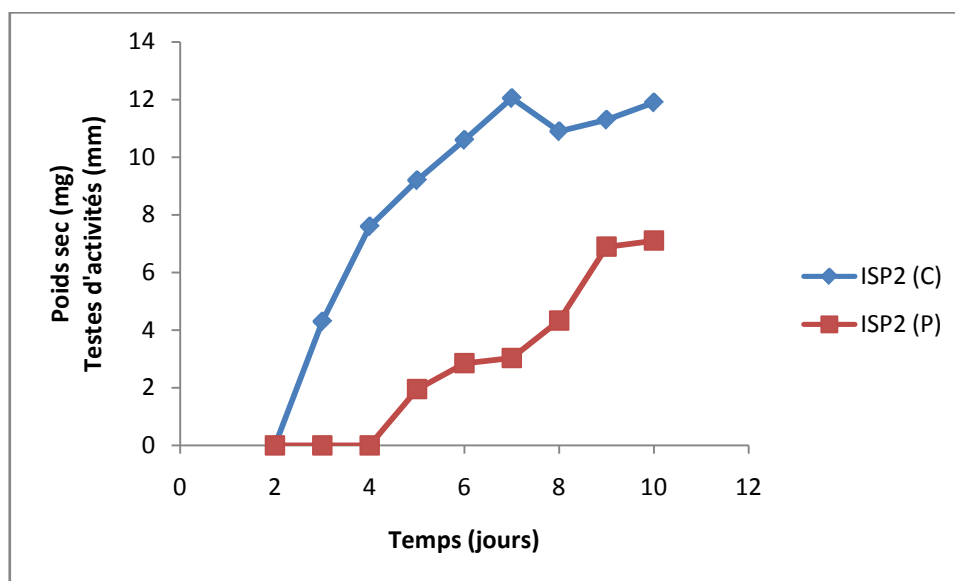
Sur ce milieu, la croissance est meilleure que la production (Figure 11).

2.1.4. Suivi de la croissance et de la production sur milieu ISP₂

a. Croissance

Le poids sec cellulaire augmente rapidement dès les premiers jours de fermentation, et plus lentement à partir du 4^{ème} jour de fermentation pour atteindre son maximum au 7^{ème} jour

(phase exponentielle), puis celle-ci évolue jusqu'au 10^{ème} jour de culture (phase stationnaire). Cette croissance rapide au début s'expliquerait par la présence d'une source de carbone facilement assimilable : le glucose (Figure 12).



C : Croissance P : Production

Figure 12: Evolution de la cinétique de croissance et de production sur milieu ISP₂.

b. Production

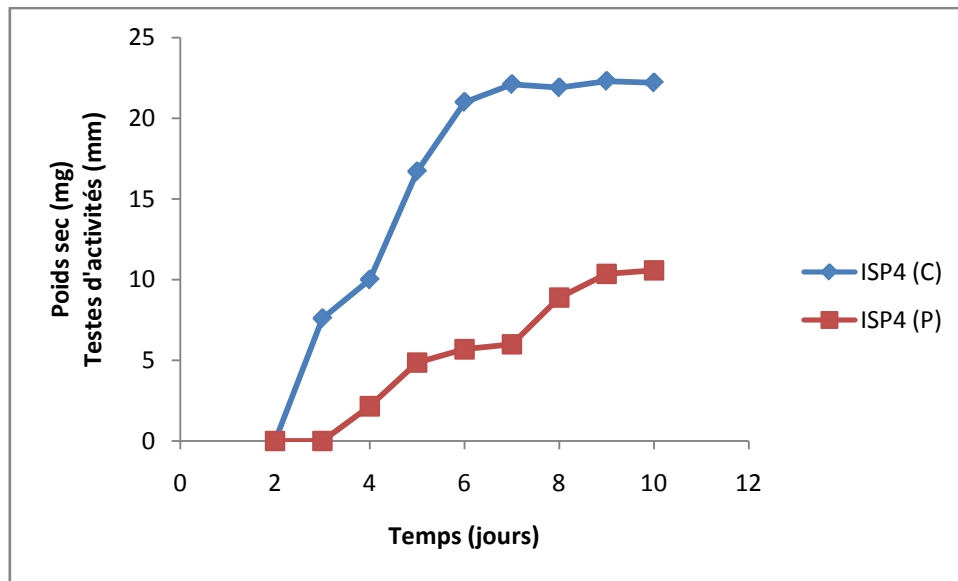
Sur ce milieu la production débute au 5^{ème} jour (zone d'inhibition de 2,15 mm) cette production est proportionnelle à la croissance, et atteint un maximum le 9^{ème} (zone d'inhibition de 10,56 mm) (Figure 12).

Comme pour les milieux YEGA et MSA, le milieu ISP₂ favorise plutôt la croissance que la production de substances bioactives.

2.1.5. Suivre de la croissance et de la production sur milieu ISP₄

a. Croissance

La croissance débute rapidement au bout du 3^{ème} jour de culture puis évolue progressivement pour atteindre son maximum au 7^{ème} jour (phase exponentielle), avant de se stabiliser (phase stationnaire) (Figure 13).



C : Croissance P : Production

Figure 13: Evolution de la cinétique de croissance et de production sur milieu ISP₅.

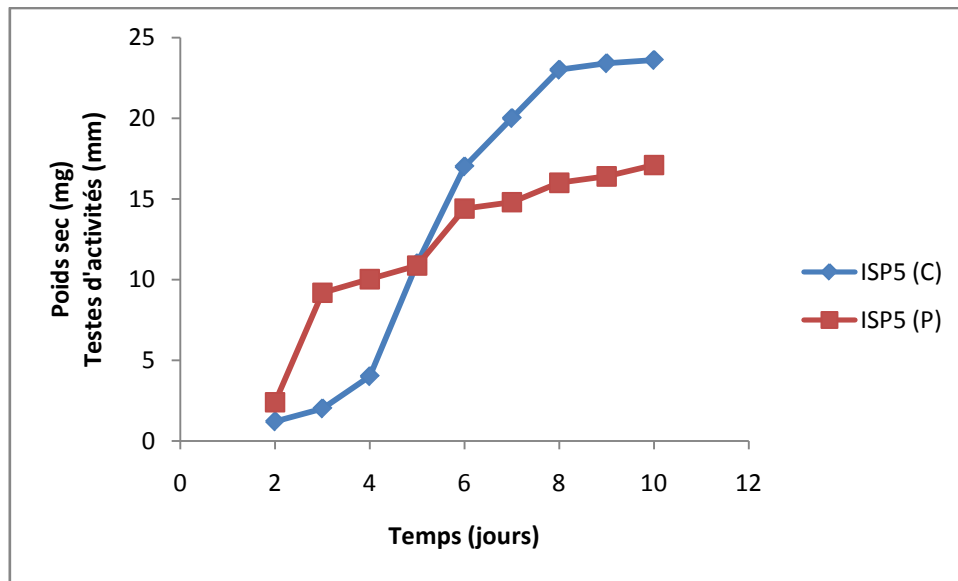
b. Production

Pat contre, la production débute au 4^{ème} jour de culture et augmente proportionnellement à la croissance pour atteindre une zone d'inhibition maximale de 10,56 au bout du 9^{ème} jour (Figure 13).

2.1.6. Suivre de la croissance et de la production du milieu ISP₅

a. Croissance

Présence d'une phase de latence puis la croissance début rapidement au bout du 4^{ème} jour de culture comme pour le milieu SCA. Cela serait due a la présence d'une source de carbone facilement assimilable qui est le glycérol, cette croissance évolue jusqu'à atteindre une zone maximale au bout du 8^{ème} jour de culture (phase exponentielle) puis débute la phase stationnaire (Figure 14).



C : Croissance P : Production

Figure 14: Evolution de la cinétique de croissance et de production sur milieu ISP₅.

b. Production

La production est précoce et commence à partir du 2^{ème} jour de culture avec une (zone d'inhibition de 2,4 mm). Jusqu'au 5^{ème} jour de culture, la production évolue d'une manière exponentielle, et elle est maximale au bout du 10^{ème} jour de culture avec une zone d'inhibition de 17,1 mm.



N° 1 : milieu SCA, N° 2 : YEGA, N° 3 : MSA, N° 4 : ISP₂, N° 8 : ISP₄, N° 10 : ISP₅

Figure 15 : Les activités des six milieux au 10^{ème} jour de culture.

2.2. Comparaison des cinétiques de croissances de la souche T₁KJ sur les six milieux

Cette figure récapitulative montre les différentes cinétiques de croissances des six milieux. La croissance maximale à la phase stationnaire est observé pour le milieu ISP₅, suivi de près par les milieux ISP₄, puis le YEGA, le MSA, le ISP₂ et enfin le milieu SCA (Figure 16).

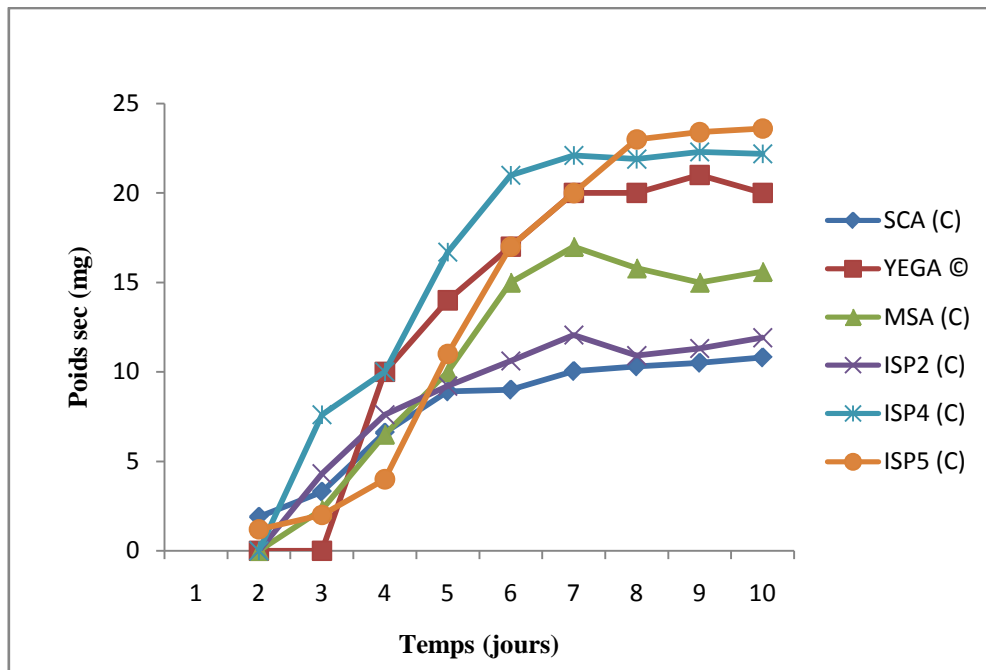


Figure 16: Effet du milieu de culture sur la croissance de la souche T₁KJ.

2.3. Effet du milieu de culture sur la production de la souche T₁KJ

Les milieux SCA et ISP₅ sont les seuls milieux qui présentent une production dès le 2^{ème} jour de culture avec des zones d'inhibitions respectives de 3,54 mm et de 2,4 mm. Au bout du 10^{ème} jour, la meilleur production est observé également pour ces deux milieux avec 17,02 mm pour le milieu SCA et 17,1 mm pour le milieu ISP₅. Les résultats des cinétiques de production de T₁KJ sur les six milieux testés sont représentés dans la figure 17.

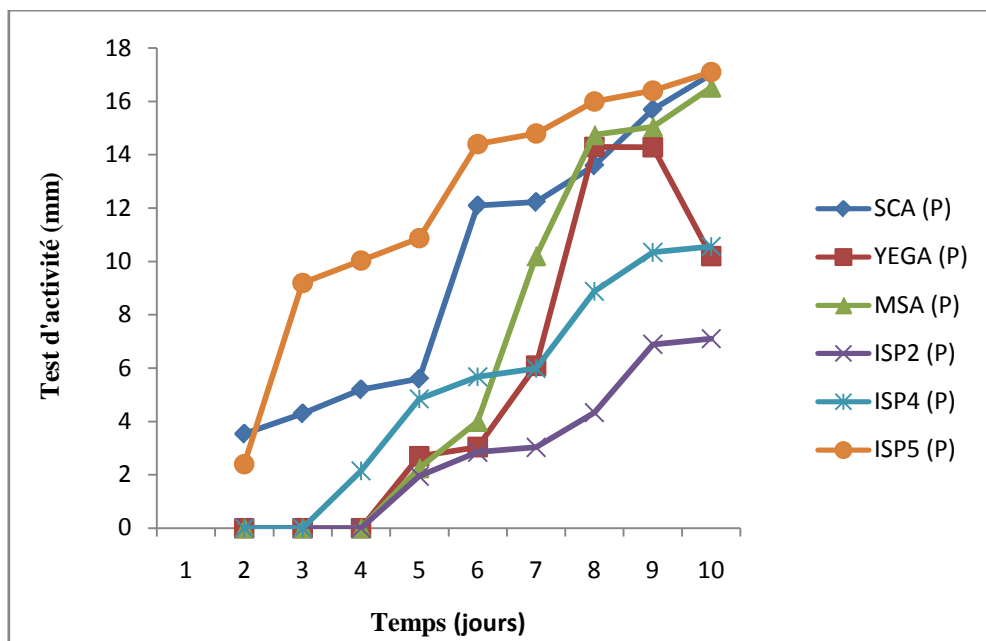


Figure 17: Effet du milieu de culture sur la production de la souche T₁KJ.

Les deux milieux qui se distinguent par la bonne production sont le SCA et l'ISP₅ ce résultat est représenté dans la figure 18.. Afin d'en retenir qu'un, une extraction de cette activité antifongique est nécessaire.

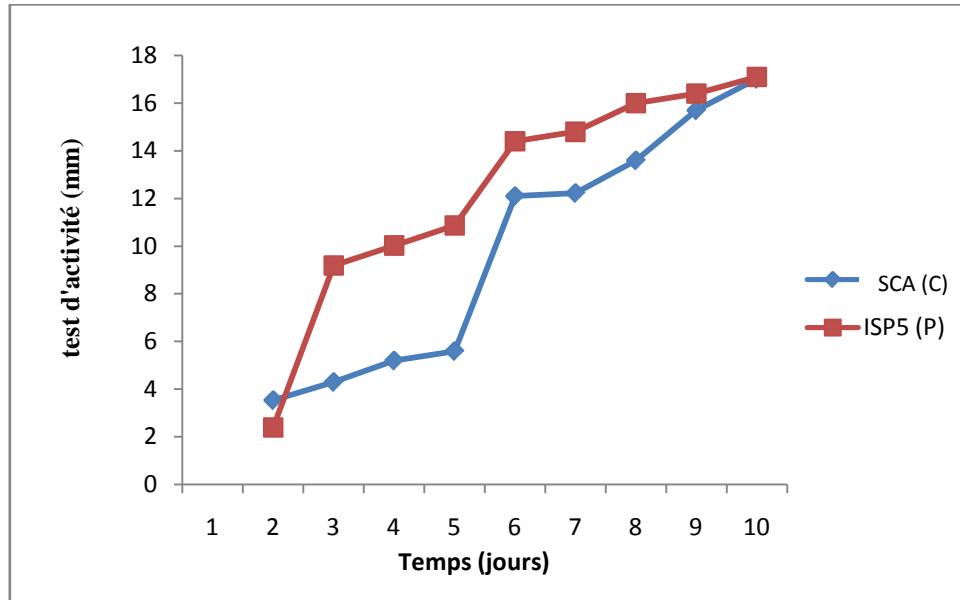


Figure 18: Comparaison entre la cinétique de production d'antifongiques sur milieu SCA et ISP₅.

2.4. Extraction des antifongiques

2.4.1. Extraction à partir du filtrat de culture

L'extraction au butanol a permis d'obtenir de bonnes activités antifongiques. Les extraits butanoliques ayant donné les meilleures zones d'inhibitions étaient ceux des phases organique des surnageant du milieu SCA (26,46 mm), suivi du milieu ISP₅ (avec 24,36 mm). De ce fait, la suite du travail a été réalisée sur milieu : **SCA**.

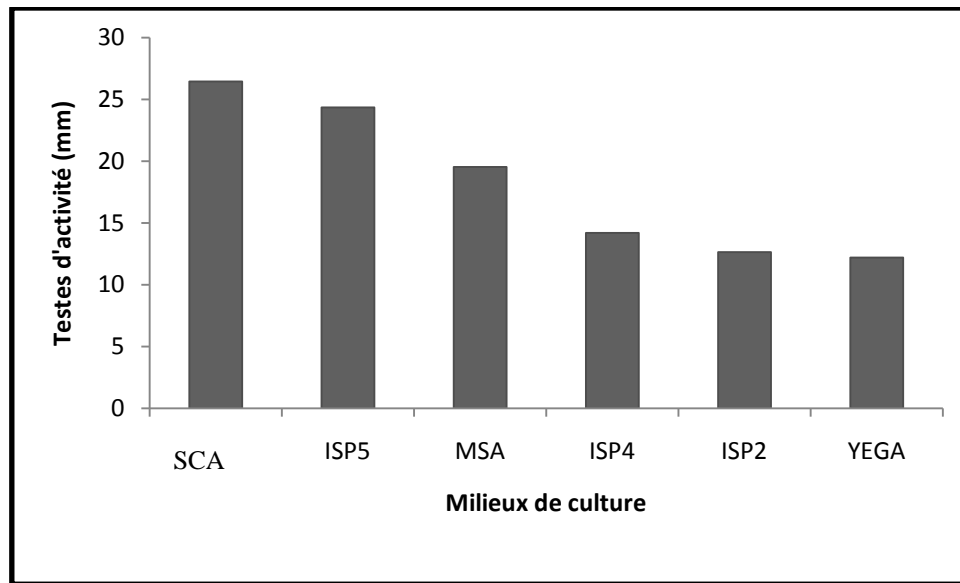


Figure 19: Extraction au butanol des substances bioactives des filtrats de six milieux de cultures différents.

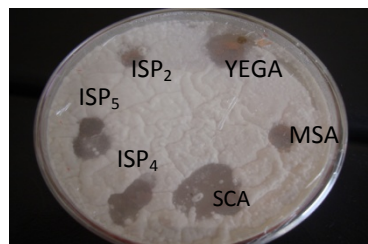


Figure 20 : Tests d'activité des phases organiques des six milieux de culture

2.4.2. Extraction à partir du mycélium

Les tests d'activité réalisés sur les extraits du mycélium n'ont donné aucun résultat, ce qui suggère que les substances bioactives sont secrétées dans le milieu extracellulaire.

En se basant sur les résultats obtenus nous pouvons déduire que les milieux ayant du glucose comme source de carbone (ISP₂, YEGA), présentaient une croissance rapide durant les premiers jours de culture, cela est probablement dû à cette source de carbone rapidement assimilable (Boughachich *et al.*, (2005). Il est à noter que chez beaucoup de microorganismes, le glucose provoque une répression de la formation de plusieurs antibiotiques amino-

glycosidique produits par les actinomycètes (Streptomycine) par une inhibition des enzymes de biosynthèse (Tripathi *et al.*, (2004).

Considérant que ces deux milieux (ISP₂ et YEGA) ont la même source de carbone, on pourrait supposer qu'ils pourraient permettre approximativement la même production d'antifongique, hors, cela n'est pas le cas, en effet le milieu YEGA présente une meilleure production au bout de 10 jours de culture par rapport à l'ISP₂, ce qui montre que d'autres paramètres culturels, notamment la source d'azote peuvent influencer cette production, Sen and Chattopadhyay cité par (Saira *et al.*, 2010). Le milieu YEGA possède, en plus de l'extrait de levure et de l'extrait de viande, de la peptone, ces différentes sources d'azote ont probablement influencé positivement la production d'antifongique. Ainsi la production maximale de *Streptomyces rochei* G164 a été observée avec une source de carbone qui est le saccharose et une source d'azote qui est la peptone (Sing *et al.*, 2010). Il est à noter que la production d'antifongiques par *Streptomyces tanashiensis* A2D est importante lorsque le glucose à 1% est additionné au milieu (Singh *et al.*, 2009).

Pour les milieux ayant l'amidon comme source de carbone (SCA, ISP₄, MSA), une bonne production ainsi qu'une bonne croissance sont observés. Avec une meilleure production sur le SCA. D'après Lounés *et al.*, (1995), la production d'antibiotiques est meilleure sur une source de carbone complexe (amidon, dextrine) lentement assimilable.

Pour le milieu ISP₅ ayant le glycérol comme source de carbone, une bonne production est aussi observée. Les expériences rapportées par Sing *et al.*, (2010), confirment le fait que le glycérol est une bonne source de carbone pour la production de métabolites antibiotiques par les actinomycètes. À l'opposé, Lounés *et al.*, (1995), rapportent que le glycérol a un effet négatif sur la production de la Spiramycine par *Streptomyces ambofaciens*. D'autres auteurs rapportent que le tryptone et le glycérol sont des simulateurs de la production de métabolites antifongiques (Banga *et al.*, (2008).

2. Optimisation de la production d'antifongique sur milieu SCA

Les résultats de “ Response Surface Methodology **RSM** ” pour l'étude de trois variables : amidon (X_1), caséine (X_2), NaCl (X_3), sont présentés dans le tableau ci dessous avec les moyennes observées (zones d'inhibition) et les moyennes prédites par le logiciel.

Les moyennes prédites par le logiciel pour les trois centres de point (000) (sans modification c'est-à-dire 2g Amidon, 0,3g Caseine, 2g NaCl) et qui se trouvent en position 2, 14 et 15 ont les mêmes valeurs de zones d'inhibitions.

La zone d'inhibition **maximale** qui représente un maximum de production a été observé en position 5 ayant **15 g d'amidon, 0,3g de caséine et 3,5 g de NaCl**. La zone d'inhibition **minimale** est observée en position 10 avec **5 g d'amidon, 0,3 g de caséine et 3.5 g de NaCl** (Tableau VII).

Tableau V : Modele expérimental et résultats du RSM pour la production d'antifongique par la souche T₁KJ sur le milieu SCA.

	Model	Valeurs codes			Valeurs réels (g)			Y Obtenue (mm)	Y Prédit (mm)	Y Résiduel (mm)
		X1	X2	X3	X1	X2	X3			
1	0++	0	1	1	10	0,5	3,5	3,04	3,833	-0,793
2	000	0	0	0	10	0,3	2	12,03	11,813	0,216
3	-+0	-1	1	0	5	0,5	2	2,1	1,018	1,081
4	--0	-1	-1	0	5	0,1	2	8,08	6,598	1,481
5	+0+	1	0	1	15	0,3	3,5	14,6	11,785	2,275
6	+0-	1	0	-1	15	0,3	0,5	5,81	5,522	0,287
7	0+-	0	1	-1	10	0,5	0,5	4,06	2,866	1,493
8	++0	1	1	0	15	0,5	2	3,9	5,381	-1,481
9	0--	0	-1	-1	10	0,1	0,5	9,88	9,086	0,793
10	-0+	-1	0	1	5	0,3	3,5	1,2	1,487	-0,287
11	0-+	0	-1	1	10	0,1	3,5	8,22	9,413	-1,193
12	-0-	-1	0	-1	5	0,3	0,5	4,18	6,455	-2,275
13	+0	1	-1	0	15	0,1	2	10,52	11,601	-1,081
14	000	0	0	0	10	0,3	2	11,86	11,813	0,046
15	000	0	0	0	10	0,3	2	11,55	11,813	0,216

L'équation polynomiale de second degré suivante peut expliquer les résultats obtenue (Tableau VI).

$$Y = 11,81 + 2,34 X_1 - 2,95 X_2 + 0,32 X_3 - 2,82 X_1^2 - 2,83 X_2^2 - 2,67 X_3^2 - 0,16 X_1 * X_2 + 2,80 X_1 * X_3 + 0,16 X_2 * X_3$$

Dans notre expérience, Y est le niveau de production d'antifongique traduit par des zones d'inhibitions.

X₁, X₂, X₃ représente l'amidon, la caséine et NaCl respectivement.

Tableau VI : Estimation des constantes des trois facteurs (Amidon, Caséine et NaCl) optimisé par le logiciel.

Variables	Estimation	Erreur standard	t Ratio	Prob> t
Constante	11,81	1,19	9,87	0,0002
X1	2,34	0,73	3,2	0,02
X2	-2,95	0,73	-4,03	0,01
X3	0,32	0,73	0,44	0,67
X1*X2	-0,16	1,03	-0,15	0,88
X1*X3	2,80	1,03	2,71	0,04
X2*X3	0,16	1,03	0,15	0,88
X1*X1	-2,82	1,07	-2,62	0,04
X2*X2	-2,83	1,07	-2,63	0,04
X3*X3	-2,67	1,07	-2,48	0,05

X1*X2, X1*X3, X2*X3 : Interaction entre les variables.

X1*X1, X2*X2, X3*X3 : Effet quadratique entre les variables

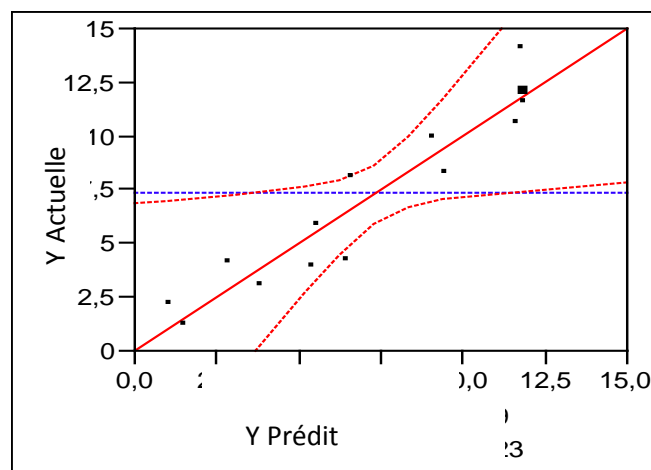


Figure 21 : Régression linéaire entre les résultats prévus par le logiciel et ceux obtenus avec les tests d'activité.

La qualité de l'ajustement se manifeste par un coefficient de corrélation $R^2 = 0,96$ ce qui signifie que **96 %** de la variabilité dans la réponse pourraient être estimés par ce modèle. Donc les paramètres X_1 (Amidon), X_2 (caséine), X_3 (NaCl) ont un effet significatif sur la production d'antifongiques.

3.1. Détermination des interactions entre les variables

Les interactions entre les facteurs permettent de déterminer la plage (zone) des meilleurs résultats entre deux facteurs.

3.1.1. Interaction entre X_1 (Amidon) et X_2 (Caséine)

Les interactions entre les deux variables : source de carbone (X_1) et source d'azote (X_2) sont représentés par le contour plot.

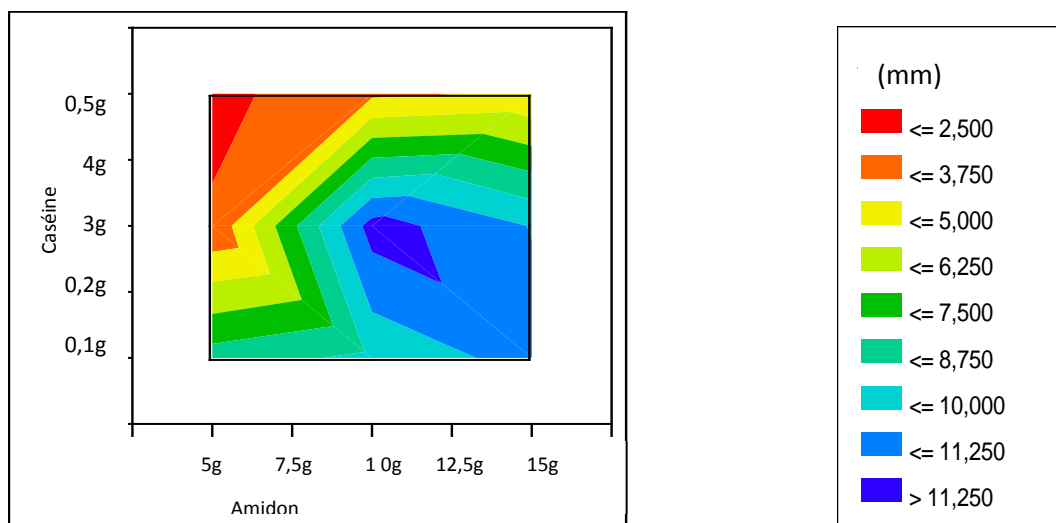


Figure 22 : Contour plot définissant l'interaction entre X_1 et X_2 .

Cette figure montre les différentes plages de production qui se traduisent par des zones d'inhibitions.

La plage **en rouge** représente l'intervalle de concentrations entre X_1 et X_2 où l'on retrouve la zone d'inhibition la plus petite ($< 2,5$ mm) et donc une production moins importante. Cet intervalle se situe entre (5g – 6,5g) pour l'amidon, et entre (0,38g - 0,5g) pour la caséine.

La plage **bleue** représente l'intervalle de concentration entre X_1 et X_2 où l'on retrouve la zone d'inhibition la plus importante ($>11,25$ mm) ce qui signifie une bonne production. Cet intervalle se situe entre (10g – 12,5g) pour l'amidon et (0,21g - 0,31g) pour la source d'azote.

3.1.2. Interaction entre X_1 (Amidon) et (NaCl) X_3

Les interactions entre les deux variables : source de carbone (X_1) et [NaCl] (X_3) sont représentées par le contour plot.

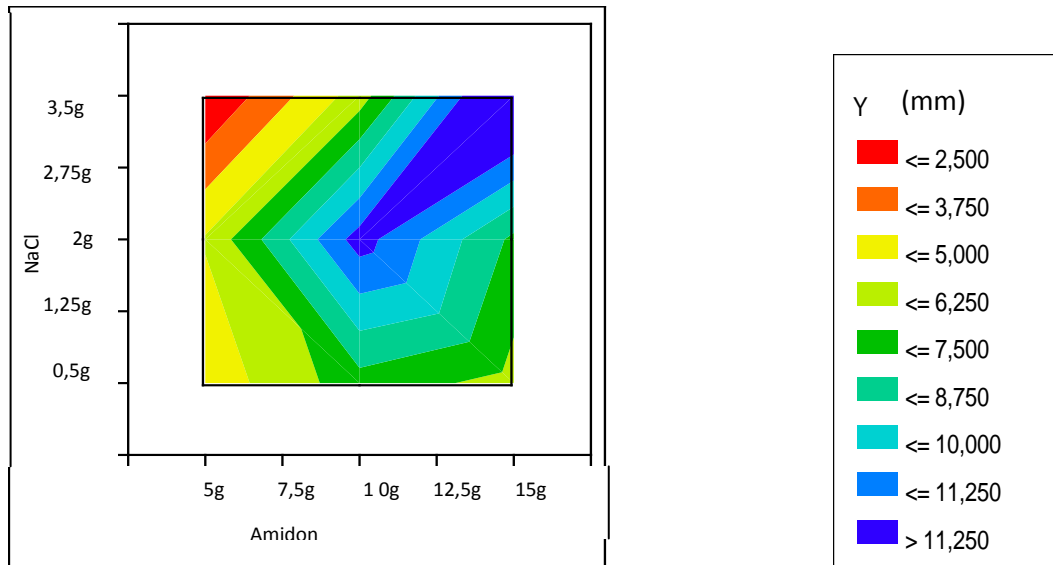


Figure 23 : Contour plot définissant l'interaction entre X_1 et X_3 .

La plage en **rouge** représente l'intervalle de concentrations entre X_1 et X_3 où l'on retrouve la zone d'inhibition la plus petite ($< 2,5$ mm). Cet intervalle se situe entre (5 - 6,5g) pour l'amidon, et entre (2,9 – 3,5g) pour la [NaCl].

La plage **bleue** représente l'intervalle de concentration entre X_1 et X_2 où l'on retrouve la zone d'inhibition la plus importante ($>11,25$ mm). Cet intervalle se situe entre (9,25 - 15g) pour l'amidon et (1,85 - 3,5g) pour la [NaCl].

3.1.3. Interaction entre X_2 (Caséine) et X_3 (NaCl)

Les interactions entre ces deux variables source d'azote et la [NaCl] sont représentées à travers le contour plot suivant.

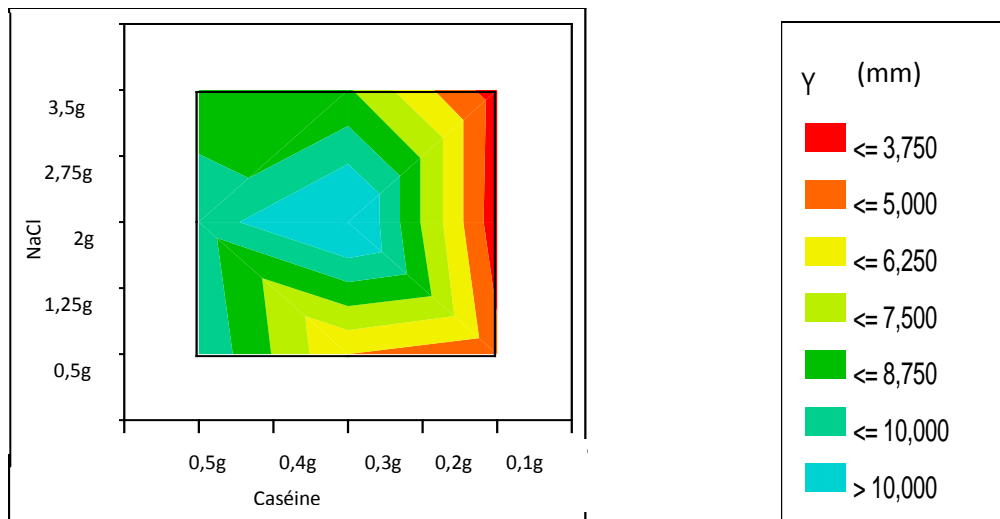


Figure 24 : Contour plot définissant l’interaction entre X_2 et X_3 .

La plage en **rouge** représente l’intervalle de concentrations entre X_2 et X_3 où l’on retrouve la zone d’inhibition la plus petite ($> 3,7$ mm). Cet intervalle se situe entre (0,48-0,5g) pour la caséine, et entre (1,4 - 3,5g) pour la [NaCl].

La plage **bleue** représente l’intervalle de concentration entre X_2 et X_3 où l’on retrouve la zone d’inhibition la plus importante ($>11,25$ mm). Cet intervalle se situe entre (0,16 – 0,35g) pour la caséine et (1,55 - 2,6g) pour la [NaCl].

3.2. Détermination des concentrations optimales des variables X_1 , X_2 et X_3

Les concentrations optimales sont déduites à partir du tableau VII suivant.

Les valeurs présentées dans ce tableau vont être multipliées aux unités respectives de chaque source, puis ajoutées ou soustraites à la valeur moyenne.

Tableau VII : Valeurs critiques des variables X_1 , X_2 et X_3 .

Variable	Valeurs critiques
X_1	0,61
X_2	- 0,52
X_3	0,36

a. La détermination de la concentration optimale de X_1' : Amidon

D'après le tableau ci-dessus, $X_1 = 0,61$ et $X_1 * 5 = 3,05$, cette valeur sera ajoutée à la valeur de la concentration moyenne de carbone qui est 10g/l. Donc $X_1' = 13,05$ g/l. Cette concentration est **l'optimale** de la source de carbone du milieu SCA.

b. La détermination de la concentration optimale de X_2' : Caséine

D'après le tableau ci-dessus, $X_2 = - 0,52$ et $X_2 * 0,2 = - 0,1$. Cette valeur sera soustraite de la valeur de la concentration moyenne de caséine qui est 0,3g/l. Donc $X_2' = 0,2$ g/l. Cette concentration est **l'optimale** de la source de caséine du milieu SCA.

c. La détermination de la concentration optimale de X_3' : NaCl

D'après le tableau ci-dessus, $X_3 = 0,36$. L'unité et $X_3 * 1,5 = 0,54$. Cette valeur sera ajoutée à la valeur de la concentration moyenne de caséine qui est 2g/l. Donc $X_3' = 2,54$ g/l. Cette concentration est l'optimale de la source de NaCl du milieu SCA.

3.3. Confirmation du model obtenu

A fin de vérifier la validité du modèle, les conditions optimales du milieu SCA ($X_1' = 13,05$ g/l, $X_2' = 0,2$ g/l et $X_3' = 2,54$ g/l) ont été appliquées. Une zone d'inhibition de 16,13 mm à été obtenue. Celle-ci se situe dans l'intervalle fixé par le logiciel [10 ,29 – 16,43 mm]. De se fait le modèle réalisé au cour de cette optimisation est confirmé (figure 25).



Figure 25 : Test d'activité obtenu après application des conditions optimales.

Dans cette étude, les sources nutritives sélectionnées jouent un rôle important dans la production d'antifongique. Les concentrations optimales montrent que, pour améliorer la production d'antifongiques, la concentration en source de carbone doit être supérieure à la concentration moyenne (13,05g/l au lieu de 10g/l). Différentes sources de carbones ont une influence positive sur la production de métabolites secondaires. En effet la souche *Streptomyces tanashiensis* a une bonne production d'antimicrobien en présence de glucose (Singh *et al.*, 2009), aussi la production d'antifongique augmente avec l'augmentation de la source de carbone pour la souche *Streptomyces chattanoogensis* (Gupte et Kulkarni., 2002). A l'inverse, il n'y a pas de production d'antimicrobiens par *Nocardiosis* sp. MAD08 quand le milieu est supplémenté de différentes sources de carbones (Selvin *et al.*, 2009).

La valeur des concentrations de la source d'azote doit être inférieure à la concentration moyenne pour améliorer la production d'antifongique (0,2 g/l au lieu de 0,3 g/l) en effet des sources d'azotes convenables peuvent inhiber la production de métabolites secondaire, alors que des acides aminées spécifiques peuvent dans certains cas augmenté la production d'antibiotiques. Phénylalanine, isoleucine, méthionine et tyrosine sont les acides aminées les plus souhaitable pour la production de métabolites antifongiques, par contre l'addition d'arginine, glycine et de valine provoque une répression de la synthèse d'antifongiques (Sing *et al.*, 2008).

La concentration en source de NaCl permettant l'amélioration de la production d'antifongique doit être supérieure à la valeur moyenne (2,54 g/l au lieu de 2g/l). Saha *et al.*, (2005) rapportent que le potentiel de la production d'antifongiques est maximale avec 5 % (W/V) NaCl. Yang *et al.*, (2006), tous comme le MgSO₄, le MgCl₂, le KNO₃ et le (Nh₄)₂SO₄ le NaCl favorise la production d'antimicrobiens par *Xenorhabdus* ssp (Wang *et al.*, 2010).

Les nutriments jouent un rôle important dans le déclenchement et l'intensité de la production des métabolites secondaires, limiter l'approvisionnement en aliment essentiel est l'un des moyens permettant de limiter la croissance du microorganisme, cela peut aussi avoir des effets sur la production de métabolites (Wan *et al.*, 2010).

Conclusion

Conclusion

Cette étude avait pour objectif principal, l'optimisation de la production de substances actives par une souche d'actinomycète (T₁KJ).

Après avoir procédé à la purification de cette souche, on a réalisé un suivi des cinétiques de croissance et de production sur six milieux qui diffèrent par la source de carbone ou la source d'azote ou par les sels minéraux. Ainsi le milieu SCA (Starch Casein Agar) c'est avéré être le meilleur au regard des zones d'inhibitions (26,46mm) obtenues après extraction butanolique du filtrat de culture.

Une modélisation statistique et mathématique en vue d'optimiser certains paramètres de ce milieu cultures c'est avérée indispensable, afin d'optimiser la production d'antifongiques, trois facteurs ont été choisis comme variables : source de carbone, d'azote et la [NaCl]. Les concentrations optimales de ces dernières ont pu être déterminées : Amidon (13,02 g/l au lieu de 10g/l), Caséine (0,2g/l au lieu de 0,3 g/l), NaCl (2,54 au lieu de 2g/l).

Le modèle statistique a pu être confirmé avec les concentrations optimales et cela après obtention d'une zone d'inhibition de (16,13mm) supérieure à celle obtenue avant optimisation et qui se situe dans l'intervalle fixé par ce logiciel [10 ,29 – 16,43 mm].

A travers ces résultats, il ressort l'intérêt de poursuivre les investigations autour des axes suivants :

- Optimiser tous les paramètres nutritionnelles de cultures sur milieu SCA (en même temps) vu qu'un bon résultat a été obtenu avec les trois variables étudiées (Amidon, Caséine et NaCl) ;
- Déterminer les interactions existantes entre tous les facteurs de ce milieu afin de comprendre leur influence dans la production ;

- Tester une large gamme de milieux de culture afin d'optimiser éventuellement ceux sur lesquelles on obtiendrait une meilleure production que sur SCA.
- Optimisation d'autres paramètres cultureux à savoir : la quantité de l'inoculum, l'agitation, le pH, la température etc.

*Références
bibliographiques*

Références Bibliographiques

- Amanulah A., Justen P., Davies A., Paul G.C., Nienow A. W. et Thomas C.R. (2000).** Agitation induced mycelial fragmentation of *Aspergillus oryzae* and *Penicillium chrysogenum*. *Biochem. Eng. J.*, **5** (2): 109-114.
- Athalye M., Goodfellow M., Lacey J. et White R.P. (1985).** Numerical classification of *Actinomadura* and *Nocardiopsis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **35**: 86-98.
- Athalye M., Lacey J. et Goodfellow M., (1981).** Selective isolation and enumeration of actinomycetes using rifampicin. *J. Appl. Bacter.*, **51**:289-297.
- Augustine S.K., Bhavsar S.P. et Kapadnis B.P. (2005).** A non-polyene antifungal antibiotic from *Streptomyces albidoflavus* PU 23. *J. Biosci.*, **30** (2): 201-211.
- Badji B. (2006).** Etude de la taxonomie et des antibiotiques antifongiques de trois souches d'actinomycètes d'origine saharienne appartenant au genre *Actinomadura et Nonomuraea*. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. Algerie, p. 6 - 17.
- Badji B., Zitouni A., Lebrihi A., Le Faou A et Sabaou N. (2009).** Molécules bioactives sécrétées par *Nonomuraea sp.*NM94 (*Actinomycetales*) d'origine saharienne. *Microbiol. Ind. San et Environn*, p. 25-36.
- Banga J., Praveen V., Singh V., Tripathi C.K.M., Bihari V. (2008).** Studies on medium optimization for the production of antifungal and antibacterial antibiotics from a bioactive soil actinomyces. *Medical Chemistry Research.*, **17**: 425-436.
- Bastide A., Demeo M., Andriaiantsoa M., Laget M. et Dumenil G. (1986).** Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques de structure non polyénique. *Mircen J.*, **2**: 453-466.
- Becker B., Lechevalier M.P. and Lechevalier H.A. (1965).** Chemical composition of cellwall preparations from strain of various form genera of aerobic actinomycetes. *Appl. Microbiol.*, **13**, 236-242.
- Berdy J., Aaszalos A. et Mc Nitt K.L. (1987).** CRC Handbook of antibiotic compounds. Vol. XIII. Microbial metabolites. part 1,2,3. Florida. USA. CRC Press, Boca Raton.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1989).** Vol. 4. Williams S.T., Sharpe M.E. and Holt J.G. (Eds.). Williams and Wilkins Co., Baltimore, p. 2648 .
- Bergey's Manual, (2004).** Systematic of bacteriology, Taxonomic outline of the prokaryotes. Second edition. Garrity. G.M; Bell. J.A; Lilburn. T.G, Springer, New York Berlin Heidelberg.
- Bergey's Manuel, (2007).** Garrity. G.M.; Lilburn. T.G; Cole. J.R; Harrison. S.H., Euzéby. J; and Tindall. B.J. *In*: Part 10 : Taxonomic Outline of the Bacteria and Archeae. Coyright, Michigan State University Board of Trustees.

- Bordes J. (2009).** Critères de diagnostics des infections fongiques. DES Anesthésie- réanimation. Séminaire d'infectiologie, CHU Saint-Etienne, 8 juin 2009
- Boudemagh A. (2007).** Isolement, à partir des sols Sahariens, de bactéries actinomycètes productrices de molécules antifongiques, identification moléculaire des souches actives. Thèse de Doctorat. Université de Constantine. Algérie.
- Boughachiche F., Reghioua S., Zerizer H., Oulmi L., Boudemagh A., Kitouni M., Boulahrouf A. (2005).** Production et caractérisation préliminaire des antibiotiques isolés d'une Actinomycetale isolée de sebka de Ain Mlila (Algérie). *Antibiotiques*. **7**: 234-238.
- Carle S. (2003).** Les antifongiques dans le traitement des infections invasives. *Pharmactuel* **36** (1) : 25-41.
- Carrillo-Muñoz, A. J., G. Giusiano, P. A. Ezkurra, et Quindós G. (2006).** Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Rev. Esp. Quimioter*, **19**:130-139.
- Chater K.F. et Merrick M.J. (1979).** *Streptomyces*. Developpement biology of procaryotes. Edition Parish J. H., Université de Californi, p. 93-114.
- Cheraiti N. et Gacemi Kirane D. (2012).** Isolement des souches d'actinomycètes productrices de nouvelles molécules antifongiques. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.*, **6** (1): 18-34.
- Couturaud F. (2004).** Aspergillus et poumon. *Rev Fr Allergol Immunol clin.*, **44**: 83-8.
- Cox G. et Perfect J. (1993).** Fungal infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, **6**: 422-426.
- Dekleva M.L., Titus J.A. et Strohl W.R. (1985).** Nutrient effects on anthracycline production by *Streptomyces peuceticus* in a defined medium. *Canadian Journal of Microbiology*, **31**: 287-294.
- Feng J., Zhang W., Han L., Zhang X. (2011).** Statistical optimization of medium components to improve the antibiotic activity of *Streptomyces*. 19G-317. *African journal of Agricultural Research.*, **6**(19): 4424-4431.
- Gazenko S.V., Reponen T.K., Grinshpun S.A. et Willeke K. (1998).** Analysis of airborne actinomycetes spores with fluorogenic substrates. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**(11): 4410-4415
- Gesheva V., Ivanova V. et Gesheva R. (2005).** Effects of nutrients on the production of AK-111-81 macrolide antibiotic by *Streptomyces hygroscopicus*. *Microbiol. Res.*, **160**: 243-248.
- Goodfellow M. (1971).** Numerical taxonomy of some nocardioform bacteria. *J. Gen Microbiol.*, **69**: 33-90.
- Gupte M.D., Kulkarni P.R. (2002).** A study of antibiotic production by *Streptomyces chattanoogensis* MTCC 3423 using full factorial design. *Letters in applied Microbiology.*, **35**(1): 22-26.
- Hamoir T., Goret M., Mignon B. et Gustin P. (2001).** Actualité sur les antifongiques enregistrés en Belgique dans le cadre du traitement des dématophytes chez les carnivores domestiques. *Ann. Méd. Vét.*, **145** : 226-232.

- Jongrungruangchok S., Tanasupawat S., Kitakoop P., Bavovada R., Kobayashi H., Kudo T. (2006).** Identification of Streptomyces and Kitasatospora strains from Thai soils with geldanamycin production strain. *Actinomycetologica.*, **20**: 10-14.
- Kumar A., Gupta R., Shrivastava B., Pal Khasa Y., Chander Kuhad. (2012).** Xylanase production from alkalophilic actinomycete isolate Streptomyces sp. RCK-2010, its characterization and application in saccharification of second generation biomass. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.*, **74**: 170-177.
- Lamari L. (2006).** Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. Algérie.
- Larpent J. P. et Larpent-Gourgaud M. (1990).** Mémento Technique de Microbiologie. TEC & Doc-Lavoisier. France, p. 66.
- Larpent J.P. et Sanglier J.J. (1989).** Biotechnologie des antibiotiques. Edition: Masson. Paris, p. 481.
- Lebrihi A., Lefebvre G. et Germain P. (1988).** Carbon catabolite regulation of cephamycin C and expandase biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **28**: 44-51.
- Lechevalier M.P. et Gerber N. (1970).** The identity of madurose with 3-O-methyl-D galactose. *Carbohyd. Res.*, **13**: 451-454.
- Lechevalier M.P. et Lechevalier H.A. (1970a).** Composition of whole cell hydrolysates as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes in: The Actinomycetales. Prauser. H; Fisher Verlag. G; Jena, 311-316.
- Lechevalier H.A. and Lechevalier M.P. (1970b).** A critical evaluation of genera of aerobic actinomycetes. In: The Actinomycetales. Prauser H. (Eds.). G. Fisher Verlag, Jena, 393-405.
- Lechevalier M.P., De Bievre C. et Lechevalier H.A. (1977).** Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochem. Syst. Ecol.*, **5**: 249-260.
- Leminor L., Veron M., (1989).** Bacteriologie médicale. Edition: Flammarion Médecine-Sciences. Paris, p. 335-349.
- Lemke A., Kiderlen A.F. et Kayser O. (2005).** Amphotericin B. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **68**: 151-162.
- Loria A. (1986).** The national institute of health quality control program. III. Fllox-up studies (phase 3). *Rev. Invest. Clin.*, **38**: 435-440.
- Loucif K. (2011).** Recherche de substances antibactérienne à partir d'une collection de souches d'actinomycètes caractérisation préliminaire de molécules bioactives. Thèse de Magistère en microbiologie appliquée et biotechnologie microbienne. Université de Mentouri. Constantine, p 21.

- Lounès A., Lebrihi A., Benslimane C., Lefebvre G. et Germain P. (1995).** Glycerol effect on spiramycin production and valine catabolism in *Streptomyces ambofaciens*. *Current Microbiology*, **31**: 304-311.
- Martin J.F. (1979).** Polyene macrolide antibiotics. In: "Economic Microbiology" Rose A.F., Ed. :Academic Press, London, **3** : 355-387.
- Masayuki H. (2008).** Studies on the isolation and distribution of rare actinomycetes in soil. Division of applied biological sciences, interdisciplinary graduate school of Medicine and Engineering. These de doctorat. University of Yamanashi, Takeda.Japan , p 27.
- Miao L., Kwong T. F. N. et Qian P. Y. (2006).** Effect of culture conditions on mycelia growth, antibacterial activity and metabolite profiles of the marine-derived fungus *Arthrinium* c.f. *saccharicola*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **72**: 1063-1073.
- Mimoz O. (2000).** Traitements antifongiques. *Mapar*, pp : 733-742.
- Misato T. (1982).** Present status and future prospect of agricultural antibiotics. *J. Pest. Sci.*, **7** : 301-30.
- Mustin M. (1987).** Le Compost, gestion de la matière organique. Edition : François Dubusc. Paris, p. 954 .
- Niladevi K.N., Rajeev K., Sukumaran, Nicemol J., Anisha G.S., Prema P. (2009).** Optimization of laccase production from a novel strain-*Streptomyces psammoticus* using response surface methodology. *Microbiological Research.*, **164**: 105-113.
- Oskay M., A. Tamer. et Azeri C. (2004).** Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *Afr J Biotechnol.*, **3**(9): 441-446.
- Ouhdouch Y. (2003).** Actinomycetes. Laboratoire de microbiologie, Faculté des Sciences Semlalia. Marrakech. Premier atelier national du réseau Nafrinet. Maroc. Institut Scientifique. pp 33-41.
- Pallasch T. (2002).** Antifungal and antiviral chemotherapy. *Periodontology*. **28** : 240-255.
- Papagianni M. (2004).** Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelia processes. *Biotechnol. Adv.* **22** (3): 189-259.
- Perry J.J., Staley J.T. et Lory S. (2004).** Microbiologie. Edition: Dunod. Paris, p 33.
- Pizzul L. (2006).** Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Actinomycetes. Thèse de Doctorat. Université d'Uppsala. Suède, p. 39.
- Saffory S. (2006).** Etude du métabolisme carboné chez *Streptomyces pristinaespiralis*. Thèse de doctorat en procédés biotechnologiques et Alimentaires. Ecole superieur d'Agronomie et des Industries Alimentaires. Nancy .France, p. 102.
- Saira A., Subhan M., Durrani F., Sultan M., Hidayatullah K., Abdul H. (2010).** Biosynthesis of antibiotic through metabolism of actinomycetes strain MH-9 through shake flask fermentation. *Sarhad J. Agric.*, **26**: 7-18.

- Selvin J., Shanmughapriya S., Gandhimathi R., Seghal Kiran G., Rajeetha Ravji T., Natarajaseenivasan K., Hema T.A. (2009).** Optimization and production of novel antimicrobial agents from sponge associated marine actinomycetes *Nocardioopsis dassonvillei* MAD08. *Appl Microbiol Biotechnol.*, **83**: 435-455.
- Singh L.S., Mazumder S., Bora T.C. (2009).** Optimisation de la croissance et de la production de métabolite bioactive par *Streptomyces tanashiensis* souche A2D, un actinomycète alcaliphile et tolérant au sel. *Journal de Mycologie Médicale.*, **19**: 225-233.
- Siva Kumar K. (2001).** Actinomycetes of an Indian Mangrove (Pichavaram) environment: An Inventory. Thèse de Doctorat. Université d'Annamalai. India, p. 91.
- Smaoui S. (2010).** Purification et caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse doctorat de l'université de Toulouse. France, p. 125
- Srividya S., Adarshana T., Deepika V.B., Kajingailu G et Nilanjan D. (2012).** *Streptomyces* sp. 9p as effective biocontrol against chilli soilborne fungal phytopathogènes. *European Journal of Experimental Biology.*, **2** (1): 163-173.
- Strub C. (2008).** Modélisation et Optimisation de la production de thiolutine chez *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de doctorat. Université Toulouse. France, p 52.
- Thakur D., Yadav A., Gogoi B.K., et Bora T.S. (2007).** Isolation and screening *Streptomyces* in soil from areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. *J. Microbiol. Médi.*, **17** : 242-249.
- Tripathi C.K.M., Praveen V., Singh V., Bihari V. (2004).** Production of antibacterial and antifungal metabolites by *Streptomyces violaceusniger* and media optimization studies for the maximum metabolite production. *Medical Chemistry Research.*, **13** (8): 790-799.
- Van Bambeke F. (2008).** Antibiotiques antifongiques. Thèse de Doctorat. Université de Louvain. Belgique, p. 94 .
- Vandamme E.J. (1985).** Biotechnology of industrial antibiotics. Drugs and pharmaceutical sciences. Vol. 22. Edition: Marcel Dekker. New-York, p. 808.
- Vandeputte V. (2008).** Mécanismes moléculaires de la résistance aux antifongiques chez *Candida glabrata*. Thèse de Doctorat. Université d'Angers. France, p.168.
- Vijayakumar R., Panneerselvam K., Muthukumar C., Thajuddin N., Panneerselvam A., Saravanamuthu R. (2010).** Optimization of Antimicrobial Production by a Marine Actinomycete *Streptomyces afghaniensis* VPTS3-1 Isolated From Palk Strait, East Coast of India. *Indian J Microbiol.*
- Wang X., Huang L., Kang Z., Buchenauer H., Gao X. (2010).** Optimization of the Fermentation Process of Actinomycete Strain Hhs.015^T. *Journal of biomedicine and biotechnology.* **10**: 1-10
- Watave M.G., Tickoo R., Jog M.M. et Bhole B.D. (2001).** How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*. *Arch. Microbiol.*, **176**: 386-390.

Xiaoyong Z., Jinyan Z., Wen F., Zhidong L., Juan Z., Jie Y., Liang X., Hong T. (2010). Response surface methodology used for statistical optimization of jian-peptide production by *Bacillus subtilis*. *Electronic journal of Biotechnology*. **13**(4) : 1-7

Yu J., Liu Q., Liu Q., Liu X., Sun Q., Yan J., Qi X. et Fan S. (2008). Effect of liquid culture requirements on antifungal antibiotic production by *Streptomyces rimosus* MY02. *Bioresource Technol.*, **99**: 2087-2091.

Zermane F. (2007). Etude des caractéristiques culturales des Actinomycètes impliquées dans la biodégradation de la cellulose des substances pectiques et des composés organiques de synthèse. Magistère en Microbiologie Appliquée, Option : Biotechnologies microbiennes. Université Mentouri. Constantine, p. 108.

Zitouni A. (2006). Etude taxonomique et des propriétés antagonistes des *Nocardiothrix* et des *Saccharothrix* des sols sahariens et production de nouveaux antibiotiques par *Saccharothrix* sp. Thèse de Doctorat. Université Toulouse. France, p 103 et p 230.

Annexe

-Annexe I-

Tableau : Clé d'identification des principaux genres d'actinomycètes basée sur les critères chimiques et morphologiques

caractéristiques chimiques						caractéristiques morphologiques	genres
DAP	glycine	sucres	acides mycoliques	Phospho-lipides (P)	ménaquinones (MK)		
LL	+	NC	-	PII	MK9 (H6,H8)	chaînes de spores sur MA	<i>Streptomyces</i>
LL	+	NC	-	PI	MK8 (H4)	MA et MS fragmentés	<i>Nocardioides</i>
LL	+	NC	-	PIII	MK9 (H4)	MA (-), sporanges sur MS avec une spore	<i>Kineosporia</i>
DL	+	xyl.-arab.	-	PII	MK9 (H4), 10(H4)	MA (-), spores isolées sur MS	<i>Micromonospora</i>
DL	+	" "	-	PII	MK9 (H4), 10(H8)	MA (-), chaînes de spores sur MS	<i>Catellatospora</i>
DL	+	" "	-	PII	MK9 (H4), 10(H4)	MA (-), sporange globuleux avec nombreuses spores mobiles	<i>Actinoplanes</i>
DL	+	" "	-	PII	MK9 (H4,H6,H8)	MA (-), sporange en masse avec peu de spores mobiles	<i>Dactylosporangium</i>
DL	+	" "	-	PI	MK9 (H4), 10(H4)	MA (-), chaînes de spores non mobiles	<i>Glycomyces</i>
DL	-	maduros	-	PI	MK9 (H6)	MA (+), 2 à 15 spores par chaîne sur MA	<i>Actinomadura</i>
DL	-	e	-	PIV	MK9 (H2,H4,H6)	MA (+), spores agencées par 2 sur MA	<i>Microbispora</i>
DL	-	"	-	PIV	MK9 (H0,H2,H4)	MA (+), 2 à 15 spores par chaîne sur MA	<i>Microtetraspora</i>
DL	-	"	-	PIV	MK10 (H4)	MA (-), 10 à 30 spores par chaîne au dessus du MS	<i>Herbidospora</i>
DL	-	"	-	PIV	MK9 (H2)	MA (+), sporanges avec une spore mobile sur MA	<i>Planomospora</i>
DL	-	"	-	PIV	MK9 (H2,H4)	MA (+), sporanges avec deux spores mobiles sur MA	<i>Planobispora</i>
DL	-	"	-	PIV	MK9 (H2,H4)	MA (+), sporange avec nombreuses spores non mobiles sur MA	<i>Streptosporangium</i>
DL	-	"	-	PI, PII	MK9 (H4,H6)	MA (+), sporange avec nombreuses spores mobiles sur MA	<i>Spirillospora</i>
DL	-	Arab.-gal.	+	PII	MK8 (H4),9(H2)	MA(+), MA et MS fragmentés	<i>Nocardia</i>
DL	-	" "	+	PII	MK8 (H4),9(H2)	MA(-), cycle mycélium-batonnet-cocci	<i>Rhodococcus</i>
DL	-	" "	-	PII	MK9 (H2,H4)	MA (+), MA et MS fragmentés	<i>Amycolatopsi</i>
DL	-	" "	-	PII	MK9 (H4)	MA (+), spores isolées sur MA	<i>Saccharomonosporas</i>
DL	-	" "	-	PIII	MK9 (H4)	MA (+), chaînes de spores sur MA	<i>Saccharopolyspora</i>
DL	-	Rham.-gal.	-	PII, PIV	MK9 (H'), 10(H4)	MA (+), chaînes de spores sur MA fragmenté	<i>Saccharothrix</i>
DL	-	NC	-	PIII	MK10 (H2,H4,H6)	MA (+), chaînes de spores sur MA fragmenté	<i>Nocardioipsis</i>
DL	-	NC	-	PII, PIV	MK9 (H2,H4), 10(H4,H6)	MA (+), spores isolées sur MA	<i>Thermomonospora</i>
DL	-	NC	-	ND	MK7 et MK9	MA (+), endospores isolées sur MA et MS	<i>Thermoactinomyces</i>

Note: DAP, acide diaminopimélique; NC, non caractéristique; ND, non déterminé; arab., arabinose; gala., galactose; xyl., xylose; MA, mycélium aérien; MS, mycélium du substrat. Phospholipides: PI, pas de phospholipides azotés; PII, présence de phosphatidyléthanolamine (PE); PIII, présence de phosphatidylcholine; PIV, présence de PE et de phospholipide avec glucosamine (PG); PV, PG avec phosphatidylglycérol. Ménaquinones prédominants (=MK): exemple MK9 (H4) = ménaquinone à 9 unités isoprènes possédant 4 sites d'hydrogénation (2 unités isoprènes saturées par atomes d'hydrogène).

- Annexe II-

Matériel utilisé

- ✓ Spatule
- ✓ Vortex
- ✓ Autoclave
- ✓ Autoclave
- ✓ Bain marie
- ✓ Balance
- ✓ Four pasteur
- ✓ Bec bunsen
- ✓ Loupe binoculaire
- ✓ Etuve
- ✓ Microroseringues
- ✓ Ampoule a décanté
- ✓ Microscope optique (*Optika*)
- ✓ Rota vapeur BÜCHI ROTAVAPOR R-114
- ✓ Spectrophotomètre Shimadzu UVmini. 1240
- ✓ Logiciel : Box Behenken
- ✓ Centrifugeuse « Sigma »

-Annexe III-

Milieux de culture

Milieu WILLIAMS (Williams et Kuster,1964) (SCA)

Amidon : 10g; caséine : 0,3g; KNO₃ : 2g; K₂HPO₄ : 2g; MgSO₄, 7H₂O : 0,05g; CaCO₃ : 0,02g; FeSO₄, 7H₂O : 0,01g ; Eau distillée : 1000 ml. pH 7,2.

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

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

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

Milieu ISP1 : Tryptone : 5g ; extrait de levure : 3g ; agar : 15g ; eau distillée q.s.p :1000 ml. pH = 7,2

Milieu ISP2 : Glucose: 4 g ; extrait de levure: 4 g ; extrait de malt: 10 g ; au distillée q.s.p. 1000 ml ; agar: 20 g. pH 7,2.

Milieu ISP3 : Farine d'avoine : 20 g ; solution saline standard : 1 mL ; agar: 20 g ; eau distillée q.s.p. 1000 ml. pH 7,2. Solution saline standard: FeSO₄, 7H₂O: 0,1 g ; MnCl₂, 4H₂O: 0,1 g ; ZnSO₄, 7H₂O: 0.1 g ; eau distillée q.s.p. 100 ml.

Milieu ISP4 : Amidon: 10 g ; K₂HPO₄: 1 g ; MgSO₄, 7H₂O: 1 g ; NaCl: 1 g ; (NH₄)₂SO₄: 2 g ; CaCO₃: 2 g ; Solution saline standard (voir ISP3) : 1 ml ; agar : 20 g ; eau distillée q.s.p. 1000 ml. pH 7,2.

Milieu ISP5 : Glycérol : 15g ; asparagine : 1g ; solution saline (voir ISP3) : 1ml ; Agar : 20g ; eau distillée q.s.p. 1000 ml. pH 7,2.

MSA : Amidon 5g ; Extrait de levure : 3g ; MgSO₄ : 0.2g ; KH₂PO₄ : 0.5g ; K₂HPO₄ : 1g ; NaCl : 2g ; CaCO₃ : 2g ; eau distillée q.s.p. 1000 ml. pH 7,2 (Zitouni, 2005).

Résumé

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'optimisation de la production d'antifongique d'une souche d'actinomyète T₁KJ. Cinq milieux complexes : SCA, ISP₂, ISP₄, ISP₅, YEGA et un milieu synthétique le MSA ont été testés. Après culture sur milieu liquide, des cinétiques de croissances et de production ont été réalisés dans le but de déterminer le milieu présentant à la fois une meilleure activité et une bonne croissance.

Le SCA (Starch Casein Agar) s'est avéré être le meilleur, avec une zone d'inhibition de 26,46 mm après extraction butanolique (phase organique).

Ce milieu sélectionné a subi une optimisation statistique pour trois facteurs : source de carbone, d'azote et d'NaCl. Les concentrations optimales de ces trois paramètres ont été déterminées ; Amidon - 13,05g/l, Caséine - 0,2 g/l, NaCl - 2,54g/l en employant « Response Surface Methodology ». Le rendement de la production d'antifongique a été augmenté avec cette optimisation.

Mots clés : *Antifongiques, Actinomyètes, Optimisation, Méthodologie de Surface Réponse, Cinétique de croissance et de production.*

Abstract

In this study, we have focused on the optimization of some cultural parameters on fungal activities production by actinomycetes strain (T1KJ). On first stage, we used five complex media : SCA, ISP2, ISP4, ISP5, YEGA and one synthetic medium MSA .

A pre-culture on liquid medium was realized, subsequently, a growth and production kinetics were carried out to determine the environment which presents an improved activity and good growth. The SCA environment allowed to obtain the higher inhibition zone (26.46mm) after butanolic extraction .

The selected environment has undergone a statistical optimization of three factors which are : Carbon source, Nitrogen source and NaCl concentration. The optimum concentrations values of these parameters were determined as : starch (13.02 g / l), casein (0.2 g / l), NaCl (2.54 g / l), by using the response surface methodology. Therefore, we noticed that, the yield of the antifungal production was increased after this optimization.

Keywords: *Antifungal, Actinomycete, Optimization, Surface Response Methodology, Production and growth kinetics.*

المخلص :

في هذه الدراسة، نهتم بتطوير إنتاج مضاد حيوي ضد الفطريات من قبل بكتيريا أكتينو ميسات T₁KJ. التجارب أجريت على خمسة أنواع من أوساط زرع معقدة: SCA، ISP₂، ISP₄، ISP₅، YEGA و وسط صناعي MSA. بهدف معرفة الوسط المثالي الذي يسمح بنمو جيد للبكتيريا و أفضل فعالية للمركب الحيوي في أن واحد، قمنا بتتبع منحنيات النمو و الإنتاج خلال النمو على الأوساط السائلة. بعد القيام بتجارب الفعالية ضد الفطريات و قياس أقطار مساحات التثبيط، لوحظ أن أعلى فعالية (26,46 مم) راجعة لمستخلص البيتانول . انطلاقاً من النتيجة، تم الاستنتاج أن أفضل وسط زرع هو: SCA. هذا الأخير تلقى تحسين عن طريق تغيير تركيز ثلاث عوامل: مصدر الكربون، مصدر الأزوت و ملح الطعام NaCl. بعد التجارب تم تعيين التراكيز المثالية لهذه المكونات بالاعتماد على طريقة إحصائية (surface réponse). سمح لنا هذا التعديل بزيادة مردودية المضاد الحيوي.

مفاتيح الكلمات: مضاد الفطريات، أكتينومييسات، تحسين، طريقة surface repose، منحنى النمو و الإنتاج.