

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

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



Réf :.....

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

MASTER

Thème

**Optimisation des paramètres de la
production d'antibiotiques par une souche
d'actinomycète en utilisant un plan
d'expérience**

Présenté par :

M^{elle} BEN MAHREZ Salima & M^{elle} IKHLEF Nasrine

Soutenu le : **15 Juin 2015**

Devant le jury composé de :

Mme. BOUCHERBA N	MCA	Présidente
Mme. BOUDRIES SOUAGUI S	MAA	Promotrice
Melle. BELHAMICHE N	MAA	Examinatrice
Mme. ARKOUB DJOUDI W	MCB	Co-promotrice

Année universitaire : 2014 / 2015

Remerciements

En premier lieu nous remercions Allah le tout puissant pour toute la volonté et le courage qu'il nous a donné pour l'achèvement de ce travail.

Nous tenons à exprimer notre très grande gratitude et nos profonds respects à notre généreuse promotrice M^{me} BOUDRIES SAMIHA et M^{me} ARKOUB WARDA pour leur enthousiasme, gentillesse et leur simplicité. Nous saluons aussi leur disponibilité et leur qualité d'encadrement.

Nos vifs remerciements s'adressent également à notre chère enseignante (la présidente du jury) M^{me} BOUCHERBA NAWEL qui nous a fait l'honneur de présider le jury et à l'examinatrice M^{me} BELHAMICHE NABILA d'avoir bien voulu juger notre travail.

Nous tenons à remercier M^{lle} DJINNI qui nous a fait partager ses expériences pratiques et qui a répondu gracieusement à toutes nos questions.

Notre gratitude va également aux enseignants du département de microbiologie qui ont contribué à notre formation et à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de notre mémoire.

salima et Nesrine

Dédicaces

Tout au début, je tiens à remercier le bon Dieu de m'avoir donné du courage et de patience afin de réaliser ce modeste travail que je dédie à :

Mes chers parents (Madjid et Naima) et ma tante Ourida,et Abderazakqui ont été toujours un exemple pour moi, et qui ont veillés à ma réussite en déployant tous les efforts nécessaires.

Mes très chères sœurs (Malia, Achoik et Lydia).

Mes chers grands-parents paternels (Saleh et Rbiha)

Mes chers grands-parents maternels (Mohamed et Rabia)

Mes tantes (Souhila, Loubna).

Ma tante Dieu la protégé Naima et ces filles.

Mes amis(es) :Walida, Samah, Louiza,Alia,Widade et Nasimax2.

Mes copines de chambre E 301: Katia et Toukfa.

Ma binôme Salima et toute sa famille.

Toute la promotion de M2 en biotechnologie microbienne

A tous ceux qui m'ont soutenu et aidé pour la réalisation de ce modeste travail et tous ceux qui me sont chers.

Nesrine

Dédicaces

Tout au début, je tiens à remercier le bon Dieu de m'avoir donné du courage et de patience afin de réaliser ce modeste travail que je dédie à :

Mes chers parents (abd lkrim et djahida) qui ont été toujours un exemple pour moi, et qui ont veillés à ma réussite en déployant tous les efforts nécessaires.

Mon cher frère unique(Naim) et sa femme (Ismahane) et leurs enfants (Rayan, Aya, Jiji, Zizou).

Mes très chères sœurs (Yasmina, Aldja et son mari et leur future fille, Hanane et son mari et leur fille lolwa hayati).

Mes chers grands-parents paternels (Bachir et Yamina)

Mes chers grands-parents maternels (Lataman et Razkia)

Mes tentes (Nassima, Naima, Karima, Bahia) et mes ancles (Boussaad, Djamel, Mstapha , Aziz, Azdin) et leurs familles.

Khwali (Mhand, Kamel, Samir) et Khwalti(Noura, Saida, Lynda, Djamila, Farida) et leurs familles .

Mes amis(es) : Omar, Hasina, Sabrina, Farida.

Mes copines de chambre A 108: Imane, Mounia

Ma binôme Nesrine et toute sa famille.

Toute la promotion de M2 en biotechnologie microbienne

A tous ceux qui m'ont soutenu et aidé pour la réalisation de ce modeste travail et tous ceux qui me sont chers.

Salima

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I. Les actinomycètes : caractéristiques, écologie, taxonomie et intérêt 3

1. Principales caractéristiques des actinomycètes 3

2. Ecologie des actinomycètes..... 3

3. Taxonomie des actinomycètes..... 4

4. Intérêt des actinomycètes 5

II. Les métabolites secondaires des actinomycètes 5

III. Régulation de la biosynthèse des métabolites secondaires..... 6

1. Influence des sources nutritionnelles sur la production des antibiotiques par les actinomycètes 6

1.1 Effet de la source de carbone 7

1.2 Effet de la source d'azote..... 7

1.3 Effet de la source de phosphate 7

2. Influence des conditions de culture sur la production des antibiotiques .. 8

IV. Plan d'expérience 8

1. Définition..... 8

2. Objectifs du plan d'expérience 9

3. La modélisation 9

4. Model polynomial de premier degré 10

4.1 Plan factoriel à deux niveaux avec interaction $2k$ 10

4-2 Variables centrés réduite 11

4-3 Calcul des coefficients du modèle..... 11

Chapitre II : Matériel et méthodes

I. Matériel

- 1. Matériel analytique..... 12
- 2. Matériel biologique 12

II. Méthodes

- 1. Isolement de la souche SRC₃..... 12
- 2. Choix du meilleur milieu de production d'antibiotiques..... 12
- 3. Détermination des paramètres influent la production d'antibiotiques (plan de Plackett-Burman)..... 14
- 4. Modélisation de la production d'antibiotiques par le plan factoriel complet avec interaction 14
- 5. Caractérisation morphologique 15
- 6. Caractérisation physiologique 15

Chapitre III : Résultats et discussion

- I. Choix du meilleur milieu de production d'antibiotiques 17**
- II. Détermination des paramètres influents la production d'antibiotiques 18**
- III. Modélisation de la production d'antibiotiques par un plan composite centré (CCD)..... 19**
 - 1. Elaboration du model de premier degré..... 19
 - 2. Elaboration du modèle de second degré 24
- Conclusion..... 35**

Références bibliographiques

Annexes

Sommaire

Liste des abréviations

- MA : Mycélium aérien
- MS : Mycélium de substrat
- MH : Muller-Hinton
- UFC/ml : Unité formant colonie par millilitre
- P-B : Plackett-Burman
- SCA : Startch-Casein-Agar
- *S-typhi* : *Salmonella typhi*
- *E.coli* : *Escherichia coli*
- *V. cholerae* : *Vibrio cholerae*
- *S. aureus* : *Staphylococcus aureus*
- SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthiciline
- *C.albicans* : *Candida albicans*
- SRC₃ : Sédiment rivière Czapeck 3
- CCD : central composite design
- GC% : pourcentage Guanine-Cytosine
- NA : Nutrient Agar
- GN : Gélose nutritif

Liste des figures

Numéros	Titre	Pages
1	Domaine de variation du facteur	9
2	Domaine d'étude pour deux facteurs	9
3	Mise en évidence de l'activité antibiotique de l'isolat d'actinomycète sur milieu Mueller-Hinton par la méthode des cylindres d'agar	13
4	L'activité antimicrobienne de SRC ₃ cultivée sur les différents milieux testés.	17
5	Photographie représente les zones d'inhibition donnés par le milieu Czapeck	18
6	Tracé représentatif des facteurs influents la production des antibiotiques.	19
7	Courbe isoréponse (b) et surface de réponse (a) pour $x_2=0$ et $x_4=0.92$	29
8	photographie illustrant la micromorphologie de la souche SRC3 sur ISP ₁	32

Liste des tableaux

Numéro	Titre des tableaux	Pages
I	Quelques métabolites secondaires produits par les actinomycètes	6
II	Les valeurs extrêmes des différents paramètres opératoires du meilleur milieu de production d'antibiotiques.	14
III	Matrice des expériences de Plackett-Burman.	AnnexeII
IV	Matrice d'expériences pour k = 4 et N= 16.	AnnexeII
V	valeurs extrêmes des paramètres opératoires étudiés	20
VI	Valeurs des zones d'inhibitions au centre du domaine.	20
VII	Valeurs des coefficients du modèle	21
VIII	Valeurs des t _j calculées	22
IX	Valeurs des paramètres du plan en étoile.	25
X	Matrice des expériences du plan en étoile.	25
XI	valeurs des coefficients du modèle	26
XII	Matrice de dispersion $[X^T.X]^{-1}$	27
XIII	Valeurs des S ² _{bj} .	27
XIV	Résultats des aspects morphologiques de la souche SRC3 cultivée sur les milieux ISP après 3 ^{ème} , 7 ^{ème} , 14 ^{ème} et 21 ^{ème} jours d'incubation.	30
XV	Caractères morphologique de la souche SRC ₃ au 3 ^{ème} , 7 ^{ème} , 14 ^{ème} , 21 ^{ème} jours de croissance sur les différents milieux ISP à 28°C.	Annexe III
XVI	Résultats de dégradation des différents composés organiques.	32
XVII	Résultats de dégradation des sels métalliques par la souche S ₃ après 3 ^{ème} , 7 ^{ème} et 14 ^{ème} jours d'incubation.	33

Introduction

Près d'un quart des décès dans le monde résultent de maladies infectieuses et un nombre grandissant de ces dernières est provoqué par des bactéries (**Mukhopadhyay *et al.*, 2008**). En effet, les antibiotiques sont, sans doute, la famille des médicaments ayant réussie à améliorer la santé humaine (**Martinez, 2009**). Cependant, leur utilisation massive a conduit à l'apparition des bactéries résistantes aux substances antimicrobiennes qui sont une préoccupation majeure en microbiologie clinique, et la recherche sur la résistance des bactéries à ces substances au cours des cinquante dernières années à été principalement axée sur les bactéries pathogènes (**Davies et Mazel 1994 ; Yala *et al.*, 2001 ; Summers, 2006 ; Wright, 2007 & Tamara *et al.*, 2013**).

Des solutions sont nécessaires pour venir à bout de ce problème, notamment la mise en œuvre de stratégies de recherche de nouvelles molécules, qui sont orientées vers l'isolement de nouvelles souches et espèces de différents écosystèmes particuliers, souvent peu exploités (**Cragg *et al.*, 1997 ; Hegde *et al.*, 2001 & Phoebe *et al.*, 2001**). Parmi les microorganismes, les actinomycètes sont les plus grands producteurs de substances antimicrobiennes (**Sanglier *et al.*, 1993 ; Suzuki *et al.*, 1994 ; Takahashi et Omura, 2003 & Kitouni *et al.*, 2005**). Ils sont responsables de la production d'environ 80% des antibiotiques commercialisés (**Béredy, 2005**).

La production des antibiotiques est influencée par divers facteurs environnementaux, y compris les éléments nutritifs (source de carbone, d'azote et phosphore), les conditions de culture (T°, pH, taux d'oxygène et la lumière) et le taux de croissance ; en outre la production des métabolites secondaires par les actinomycètes diffère qualitativement et quantitativement en fonction de la souche utilisée (**Oskay, 2011**). Par conséquence, l'optimisation des paramètres de cultures pour une meilleure production de ces molécules est d'une très grande importance. Cependant, les procédés classiques de celle-ci ont été fréquemment utilisés, mais ces derniers sont lents et souvent ne parviennent pas à identifier l'optimum des facteurs car les interactions entre les différents facteurs sont négligées, pour cela des méthodes statistiques ont été utilisées (**Baoxin *et al.*, 2011**).

Dans notre étude, nous nous sommes fixés comme objectif l'optimisation de la production d'antibiotiques, par une souche d'actinomycète en utilisant des plans d'expériences.

Introduction

La première partie de ce travail est consacrée à une synthèse bibliographique sur les actinomycètes en général ainsi que sur l'écologie, l'importance et la systématique de ces microorganismes. Un aperçu sur leurs métabolites secondaires synthétisés et des notions fondamentales relatives aux plans d'expériences sont présentées.

La deuxième partie est expérimentale et concerne, la mise en évidence de l'activité antimicrobienne de la souche d'actinomycète étudiée, permettant le choix du meilleur milieu de production d'antibiotique. Il s'en est suivi la réalisation de la modélisation de la production d'antibiotiques par le biais d'un plan factoriel complet avec interactions dans le but de déterminer les conditions optimales des variables choisies. Enfin une étude morphologique de la souche étudiée sur différents milieux de culture ainsi que sa capacité de dégradation de certains composés sont réalisées.

I- Les actinomycètes : caractéristiques, écologie, taxonomie et intérêt

1- Principales caractéristiques des actinomycètes

Les actinomycètes sont des eubactéries chimio-organotrophes appartenant à l'ordre des Actinomycetales. Cet ordre regroupe des bactéries à Gram positif ayant un pourcentage en "guanine + cytosine" relativement élevé dans leur ADN ($G + C > 55\%$), généralement compris entre 60 et 70 % (Ensign, 1979 ; Larpent et Sanglier, 1989 ; Mariat et Sebald, 1990 ; Manuel de Bergey, 1994 & Chun *et al.*, 1997). Les actinomycètes sont des bactéries dont la croissance donne lieu à des colonies circulaires (Eunice et Prosser, 1983) constituées généralement d'hyphes (c'est -à-dire des filaments ramifiés de 0,5-1,0 μm de diamètre) qui irradient ; par croissance centrifuge ; tout le tour du germe qui leur a donné naissance (Gottlieb, 1973 ; Lechevalier et Lechevalier, 1981 & Eunice et Prosser, 1983). Cela explique leur dénomination «Actinomycètes » du Grec « aktino : rayons, mycetes : champignons » ou (champignons à rayons) (Gottlieb, 1973). Caractérisée par une croissance lente et une production maximale des antibiotiques, et plusieurs d'entre eux produisent des spores non mobiles (Locci et Sharples, 1984). Préférant un pH neutre ou peu alcalin, ils sont généralement mésophiles, d'autres sont thermophiles tolérant des températures avoisinant les 50°C et pouvant même aller jusqu'à 60°C (Omura, 1992).

Ces microorganismes produisent une pléthore de molécules, ayant de nombreuses applications dans divers domaines (antibactériens, antifongiques, insecticides, herbicides, antiparasites, acaricides, antiviraux, anti tumoraux, antimétabolites, anti allergénique, ...etc.) et de ce fait, présentant un fort intérêt pour les industriels. Par ailleurs, les actinomycètes ont un rôle écologique car ils possèdent la capacité de dégrader des molécules complexes non dégradées par les champignons ou les autres bactéries, contribuant ainsi à la fertilisation des sols (Lechevalier, 1981; Goodfellow et Williams, 1983 & Lacey, 1997). Cependant, quelques uns sont pathogènes pour l'Homme et les animaux provoquant des actinomycetomes, des nocardioses (*Nocardia*) (Goodfellow *et al.*, 1993) ainsi que la tuberculose causé par *Mycobacterium tuberculosis* (Leclerc *et al.*, 1983).

2- Ecologie des actinomycètes

Les actinomycètes sont universellement répandus, on les trouve dans différentes niches écologiques telles que : sols, air, fumier, composts, foin, débris végétaux, résidus fibreux de cannes à sucre, pollen des plantes, sédiments marins, lacs, rivières, mers et océans, glaciers,

déserts, sols pollués, lacs alcalins, algues marines et les milieux salins (Lechevalier, 1981 ; Goodfellow et Williams, 1983; Lacey, 1997 & Djinni *et al.*, 2013). Par ailleurs, certaines espèces d'actinomycètes semblent préférer certains habitats à d'autres par exemple, les *Thermoactinomyces* et les *Faenia* se trouvent dans les composts, les foins en fermentation et les condenseurs de réfrigérateurs et de climatiseurs, les *Micromonospora* au fond des lacs et des réservoirs ; les *Streptosporangium* à la surfaces des sols forestiers et les *Streptomyces* qui sont nombreux se rencontrent presque partout (Xu, 1996 ; Lacey, 1997). Une majorité d'actinomycètes sont saprophytes, mais il existe des formes parasites et symbiotiques des plantes ou des animaux (Goodfellow et Williams, 1983).

3- Taxonomie des actinomycètes

Les actinomycètes ont longtemps été considérés comme des champignons primitifs, du fait de leur mycélium, souvent à la fois aérien et pénétrant dans le substrat nutritif, du fait également de la fructification par sporanges libérant des spores chez nombreux d'entre eux (Hasley et Leclerc, 1993 ; Horinouchi, 2002).

Leurs propriétés chimiques, physiologiques, et immunologiques les rangent parmi les procaryotes. Leur paroi cellulaire ne renferme ni chitine ni cellulose mais une glycoprotéine contenant de la lysine ou de l'acide diaminopimélique (DAP) (qui peut également être remplacé par le DAB : acide diaminobutilique), et leur cytologie est celle des bactéries (Mariat et Sebald, 1990). Ces caractères s'ajoutant à d'autres (leur parasitisme par des bactériophages, leur sensibilité aux antibiotiques) ne permettent pas de les classer parmi les mycètes (Hasley et Leclerc, 1993). Dans le *Bergey's Manual* (2007), les actinomycètes sont rattachés au phylum des *Actinobacteria*, à la classe des *Actinobacteria*, à la sous classe des *Actinobacteridae*, et l'ordre des *Actinomycetales* créé par Buchanan en 1917. La classe des *Actinobacteria* est subdivisée en 5 sous classes, 6 ordres, 13 sous ordres (dont 9 appartiennent à l'ordre des *Actinomycetales*), 41 familles, 193 genres et près de 1711 espèces. *Streptomyces* est le genre le plus large avec 562 espèces valides jusqu'à 2009 (Ningthongjam *et al.*, 2009). Selon le *Bergey's Manual* (2012), ces microorganismes sont classés dans le règne des *Prokaryotae*, le phylum des *Actinobacteria* et la classe des *Actinobacteria* également. Cependant, l'ordre des *Actinomycetales* a été subdivisé en plusieurs ordres (*Actinomycetales*, *Streptomycetales*, *Streptosporangiales*, *Micromonosporales*, *Micrococcales*, ... etc). L'ordre des *Actinomycetales* est actuellement un petit ordre représenté par peu de genres, dont *Actinomyces*, anaérobie stricte et pathogène pour l'Homme. Les *Actinobacteria* sont classés,

depuis 2012, dans 15 ordres, 43 familles et 203 genres (**Goodfellow et al., in Bergey's Manual, 2012**).

4- Intérêt des actinomycètes

Les actinomycètes suscitent un grand intérêt dans diverses applications dues à leurs capacité de synthétiser de nombreux métabolites secondaires biologiquement actifs (les antibiotiques, herbicides, pesticides, antiparasitaires) et des enzymes (**Oskay et al., 2004**). Ils exercent une influence sur la croissance des plantes, et protègent les racines contre les invasions des champignons (**Yilma et al., 2008**). La majorité des antibiotiques naturels est d'origine microbienne et près de la moitié est synthétisée par les actinomycètes, en particulier, par *Streptomyces* (**Badji et al., 2005**).

Après les antibiotiques, les enzymes représentent le second grand groupe de produits d'intérêt industriel synthétisés par les actinomycètes. Certaines sont utilisées en industrie agroalimentaire, (**Vandamme, 1985**), encore en industrie chimique comme les protéases ajoutées au détergents (cité par **Bakour ,2006**) ainsi que les cellulases et les xylanases utilisées dans le traitement des déchets (**Saadoun et al., 2007**).

Certains genres d'actinomycètes comme *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium* et *Corynebacterium* se révèlent être d'une grande importance dans la dégradation des hydrocarbures (**Lacey, 1997**).

II- Les métabolites secondaires des actinomycètes

Le métabolisme des actinomycètes peut être divisé en deux parties : le métabolisme primaire et secondaire. Ces bactéries sont connues par la richesse de leur métabolisme secondaire, elles ont la capacité de produire une large variété de molécules bioactives entre autres des antibiotiques, des insecticides, des herbicides, des enzymes extracellulaires, des antitumoraux, des antiparasitaires et des antiviraux comme le montre le tableau I.

Tableau I : Quelques métabolites secondaires produits par les actinomycètes

Métabolites secondaires	Actinomycète	Références
Antibiotiques	Antibactérien : Clostomycine	<i>Micromonospora sp.</i> Takahashi et al., 2003
	Antifongique : Amphotéricine B	<i>Streptomyces nodosus.</i> Carle et al., 2003
Molécules Bioactives non antibiotiques	Bioinsecticides : Spinosad	<i>Saccharopolyspora spinosa.</i> Williamson et al., 2006
	Bioherbicides : Herbimycine	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> Omura et al., 2006
	Antiparasitaires : Trioxacarcine	<i>Streptomyces sp.</i> Maskey et al., 2004
	Anti viraux : Panosialie	<i>Streptomyces sp.</i> Aoyagi et al., 2006
	Anti-tumoraux : Marinomycine	<i>Marinospora sp</i> Kwon et al., 2006
Les enzymes	L-asparaginase	<i>Streptomyces sp.</i> Saleem Basha et al., 2009
	L- glutaminase	<i>Streptomyces olivochromogenes.</i> Balagurunatha et al., 2010.

III- Régulation de la biosynthèse des antibiotiques

La production microbienne de métabolites secondaires est généralement influencée et est fortement liée au métabolisme primaire de la souche productrice. Les métabolites intermédiaires issus du métabolisme primaire servent de précurseurs pour la synthèse des métabolites secondaires bioactifs. La régulation du métabolisme secondaire est influencée par de nombreux paramètres, entre autres nutritionnelles et physicochimiques (Strub, 2008).

1- Influence des sources nutritionnelles sur la production des antibiotiques par les actinomycètes

La nature et la concentration de certains composés dans le milieu de culture ont un effet éminent sur la production des métabolites secondaires, biologiquement actifs, par les microorganismes entre autres chez les actinomycètes (Strub, 2008).

1-1 Effet de la source de carbone

Le choix de la source de carbone influence fortement le métabolisme secondaire et par conséquent la production d'antibiotiques (**Demain et Martin, 1980, Doull et Vining, 1990, Spizek et Tichy, 1995**). Les sources de carbone lentement assimilées permettraient de meilleurs rendements de production d'antibiotiques (**Lounès 1995ab**). Cependant la source de carbone rapidement métabolisable est utilisée pour produire des cellules mais peu ou pas de métabolites secondaires (**Sanchez et al., 2002**), comme le glucose qui provoque une répression de la formation de plusieurs antibiotiques amino-glycosidiques produits par les actinomycètes (streptomycine, kanamycine, istamycine et néomycine) par une répression des enzymes de leurs biosynthèse (**Demain, 1989; Piepersberg et Distler, 1997**), ou par l'acidification due à l'accumulation des acides organiques dans le milieu (**Solé et al., 2000**)

1-2 Effet de la source d'azote

Beaucoup d'antibiotiques possèdent un atome d'azote dans leur structure. La forme sous laquelle l'azote est apporté aux cultures productrices d'antibiotiques influe et contrôle fortement les rendements de production (**Lebrihi et al., 1992 ; Marwick et al ., 1999**). De même que pour la source de carbone, la biosynthèse de la plupart des métabolites secondaires peut être réprimée par les sources d'azote rapidement assimilables, en particulier par l'ammonium (**Aharonowitz, 1980; Okanishi et Hotta, 1980; Demain, 1982; Piret et Demain, 1988**). En 1995 certains auteurs comme **Islas, Obregon, Escalante et Sanchez** ont montré que l'addition d'ammonium au milieu de culture augmente la production de certains antibiotiques tels que la streptomycine, la néomycine et la gentamicine (aminosides). Cet effet positif est dû à la conversion de l'ammonium en glutamine utilisée dans la formation des précurseurs indispensables à la biosynthèse d'antibiotiques. (**Gonzalez et al., 1995**).

1-3 Effet de la source de phosphate

La production des métabolites secondaires est soumise à une régulation par le phosphate inorganique chez plusieurs espèces de bactéries (**Weinberg, 1973; Martín, 1977; Weinberg, 1978 ; Liras et al ; 1990; Spížek et Tichy, 1995 ; Lounès et al., 1995b**), et inhibe la synthèse des antibiotiques, chez les actinomycètes grâce à sa capacité d'inhiber et/ou de réprimer les phosphatases qui interviennent dans certaines voies de biosynthèses des antibiotiques (**Gersh et al., 1978 ; Dekleva et al .; 1985**).

2- Influence des conditions de culture sur la production des antibiotiques

Les conditions de culture comme le pH, la température et le temps d'incubation affectent énormément la production des métabolites secondaires (James *et al*, 1991). Par exemple, un choc thermique de 1h induit la production de la jadomycine B chez *S. venezualae* (Doull *et al.*, 1993), alors que aux conditions de culture normale cette dernière produit la chloromycétine (chloramphénicol) utilisée pour traiter la typhoïde (Chater, 2006).

L'influence du pH sur la production de plusieurs métabolites organiques du métabolisme secondaire a été démontrée depuis longtemps, par exemple chez *Streptomyces aureofaciens*, le changement de pH pendant le procédé de fermentation peut induire des modifications de l'équilibre entre la production du chlorotétracycline (CTC) et de la tétracycline (TC) dans le milieu de culture. En effet, un pH acide favorise la production du CTC tandis qu'un pH basique favorise la sécrétion de TC (Asanza-Teruel *et al.* , 1997).

Le temps d'incubation est un facteur qui affecte la synthèse des métabolites secondaires des actinomycètes par exemple pour la souche de *Streptomyces* TN 58, la production de biomolécules commence après 60 heures d'incubation pour atteindre un maximum après 72 heures. Cette production reste stable jusqu'à 80 heures puis elle décroît progressivement pour disparaître à partir de 120 heures (Mellouli *et al.*, 2004).

IV- Plan d'expérience

1- Définition

Un plan d'expérience n'est pas une série d'essais au hasard ni sélectionnés par la seule intuition, mais une stratégie optimale permettant de prédire le maximum de précision une réponse à partir d'un nombre minimal d'essais et en utilisant un modèle postulé. (Ozil, 1997). De manière générale, la méthode des plans d'expériences cherche à déterminer et à établir les liens existants entre deux types de variables :

-La réponse : grandeur de sortie ou grandeur étudiée.

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

-Espace expérimental : La réponse dépend donc de un ou de plusieurs facteurs. Le premier facteur peut être représenté par un axe gradué et orienté (Figure 1). La valeur donnée à un facteur pour réaliser un essai est appelée *niveau*. Lorsqu'on étudie l'influence d'un facteur, en général, on limite ses variations entre deux bornes.

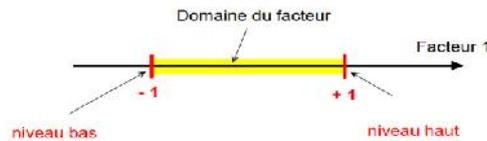


Figure 1 : Le domaine de variation du facteur

S'il y a un second facteur, il est représenté, lui aussi, par un axe gradué et orienté. On définit, comme pour le premier facteur, son niveau haut, son niveau bas et son domaine de variation. Ce second axe est disposé orthogonalement au premier. On obtient ainsi un repère cartésien qui définit un espace euclidien à deux dimensions. Cet espace est appelé **l'espace expérimental** (Figure2) (Goupy,2006).

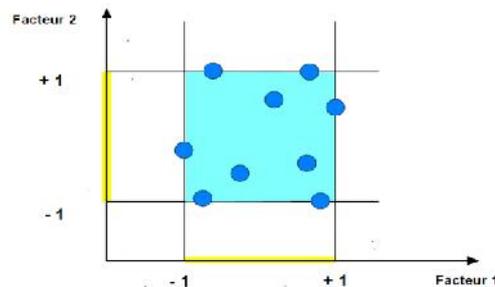


Figure 2 : Domaine d'étude pour deux facteurs

2- Objectifs du plan d'expérience

Les plans d'expériences sont utilisés dans le but de :

- diminuer le nombre d'essais ;
- connaître les effets des paramètres ;
- évaluer les effets des interactions entre les paramètres ;
- donner une meilleure précision des résultats ;
- modéliser mathématiquement l'expérience ;
- prédire et optimiser.

3-La modélisation

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

Toute réponse expérimentale peut être écrite sous la forme suivante :

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

Réponse	Facteurs	Erreur
expérimentale	contrôlés	expérimentale

Où f est une fonction inconnue (modèle théorique) des facteurs influents contrôlés (Z₁, Z₂, Z₃,... , Z_k).

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

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

Où X_j sont des coordonnées des facteurs Z_j exprimées en variables centrées réduites, (j=1,...k).

\hat{y}_i est l'estimé (valeur prédit par le modèle) de y(valeur expérimentale). Chaque valeur expérimentale y_i est sujette aux erreurs aléatoires ε_i à distribution normale telle que :

$$y_i = \hat{y}_i + \varepsilon_i \dots\dots\dots(3) \quad \text{(Benoit *et al.*,1994 ;Goupy,1999).$$

On appelle les coefficients :

- **b₀** : Terme constant de l'équation de régressions.
- **b_j** : effets linéaires.
- **b_{uj}** : effets d'interactions
- **b_{jj}** : effets quadratiques

4-Model polynomial de premier degré

4-1 Plan factoriel à deux niveaux avec interaction 2^k

Les plans factoriels à deux niveaux sont basés sur le principe que dans bien des cas, on admet que la réponse est linéaire quand un facteur passe d'un niveau minimal à un niveau maximal. Il suffit alors d'étudier seulement ce qui se passe aux bords du domaine de variation du facteur. (Benoit *et al.*, 1994 ; Goupy, 1999 ; Antony, 2003).

Le nombre d'expérience (N) à réaliser est en fonction du nombre (k) des facteurs :

$$N=2^k$$

4-2 Variables centrées réduite

La notion de YATE permet une combinaison simple des niveaux et permet un calcul aisé des effets et interactions. Les niveaux sont représentés par les signes (+) et (-) symbolisent respectivement la valeur haute et basse d'un facteur.

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

$$x_j = \frac{Z_j - Z_j^0}{Z_j}, \quad j = 1, 2, \dots, k \quad \dots \dots (4)$$

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

x_j est la variable centrée réduite correspondant à la variable naturelle Z_j . le point de coordonnées $(Z_1^0, Z_2^0, \dots, Z_k^0)$ est dénommé centre du plan ; Z_j est l'unité ou intervalle de variation suivant l'axe des Z_j . Z_{jmin} et Z_{jmax} sont les niveaux inférieur et supérieure des facteurs qui constituent les frontières du domaine d'étude.

4-3 Calcul des coefficients du modèle :

On calcule pour chaque coefficient, le produit scalaire de la colonne y par la colonne x_j Correspondante, divisé par le nombre d'essais N . Ainsi pour les effets linéaires, les valeurs des coefficients sont déterminées par :

$$b_j = \sum_{i=1}^N x_{ji} y_i \dots \dots \dots (5) \text{ avec } , j = 0, 1, \dots, k, \frac{1}{N}$$

et celle des coefficients d'interactions par :

$$b_{uj} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_{ui} x_{ji}) y_i \quad , \quad j = 1, \dots, k \quad , u = 1, \dots, k_j \neq u_{bujf}$$

$$= \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_{ui} x_{ji} x_{fi}) y_i \dots \dots \dots (6).$$

Plus la valeur absolue d'un coefficient au sein de l'équation d'un modèle est grande plus l'influence du facteur correspondant sur la réponse est forte. Le signe (+) d'un coefficient du modèle signifie que la réponse augmente quand le facteur correspondant passe du niveau (-1) au niveau (+1) (Antony, 2003 ; Sado et Sado, 1991).

I. Matériel

1. Matériel analytique (voire annexe I).

2. Matériel biologique

2.1. Microorganisme test « souche d'actinomycète SRC₃ ».

La souche d'actinomycète dénommée SCR₃ isolée par D^r DJINNI à partir d'un échantillon de sédiment de rivière, de la wilaya de Jijel (Ziama Mensouria) en Janvier 2015, à fait l'objet d'une optimisation et d'une modélisation des paramètres de production d'antibiotiques.

2.2. Germes cibles

➤ **Bacteries à Gram négatif :**

-*Escherichia coli* ATCC 29523

-*Salmonella typhi* ATCC 14028.

-*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

-*Vibrio cholerae* ATCC 14035

➤ **Bacteries à Gram positif :**

-*Staphylococcus aureus* ATCC 29522

-*Staphylococcus aureus* résistant à la méthiciline (SARM) ATCC 43300,

➤ **Levure :**

-*Candida albicans* ATCC10231

II. Méthodes

1. Isolement de la souche SRC₃

La souche SRC₃ est isolée sur le milieu Czapeck ; additionné d'un antifongique (K₂Cr₂O₇ à 50µg / ml) pour inhiber les champignons filamenteux. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 30 jours.

2. Choix du meilleur milieu de production d'antibiotiques

Dans le but de déterminer le meilleur milieu de production d'antibiotiques, la SRC₃ est repiquée sur trois milieux différents : SCA (Startch-Casein-Agar), Czapeck et Gausse, dont la composition est mentionnée dans l'annexe I. Après sept jours d'incubation à 28°C un test d'activité antimicrobienne est réalisé par la méthode des cylindres d'agar vis-à-vis des germes cibles préalablement cités.

Le milieu de culture ayant permis l'obtention des diamètres de zones d'inhibitions les plus importants est sélectionné comme milieu de base pour l'étude d'optimisation de la production d'antibiotiques.

➤ **Test d'activité antimicrobienne (Test des cylindres d'agar).**

L'activité antimicrobienne de la SRC₃ est évaluée par la méthode des cylindres d'agar sur le milieu Mueller Hinton (MH), qui consiste à ensemencer la souche SRC₃ sur les différents milieux étudiés et incubé pendant 7 jours à 28°C.

Après incubation, des cylindres de gélose des milieux testés ayant 6 mm de diamètres sont découpés stérilement (à l'aide d'une pipette Pasteur) et sont déposés à la surface du milieu Mueller Hinton préalablement ensemencé, par écouvillonnage, avec les germes cibles dont la charge d'inoculum est de 10⁷ UFC/ml (**Bastide et al., 1986**) (figure 3). Les boîtes ensemencées sont ainsi maintenues à 4°C pendant 2h avant d'être incubées pour permettre la diffusion des substances actives éventuellement produites. Les zones d'inhibition sont mesurées en (mm) après 24h d'incubation à 37°C.

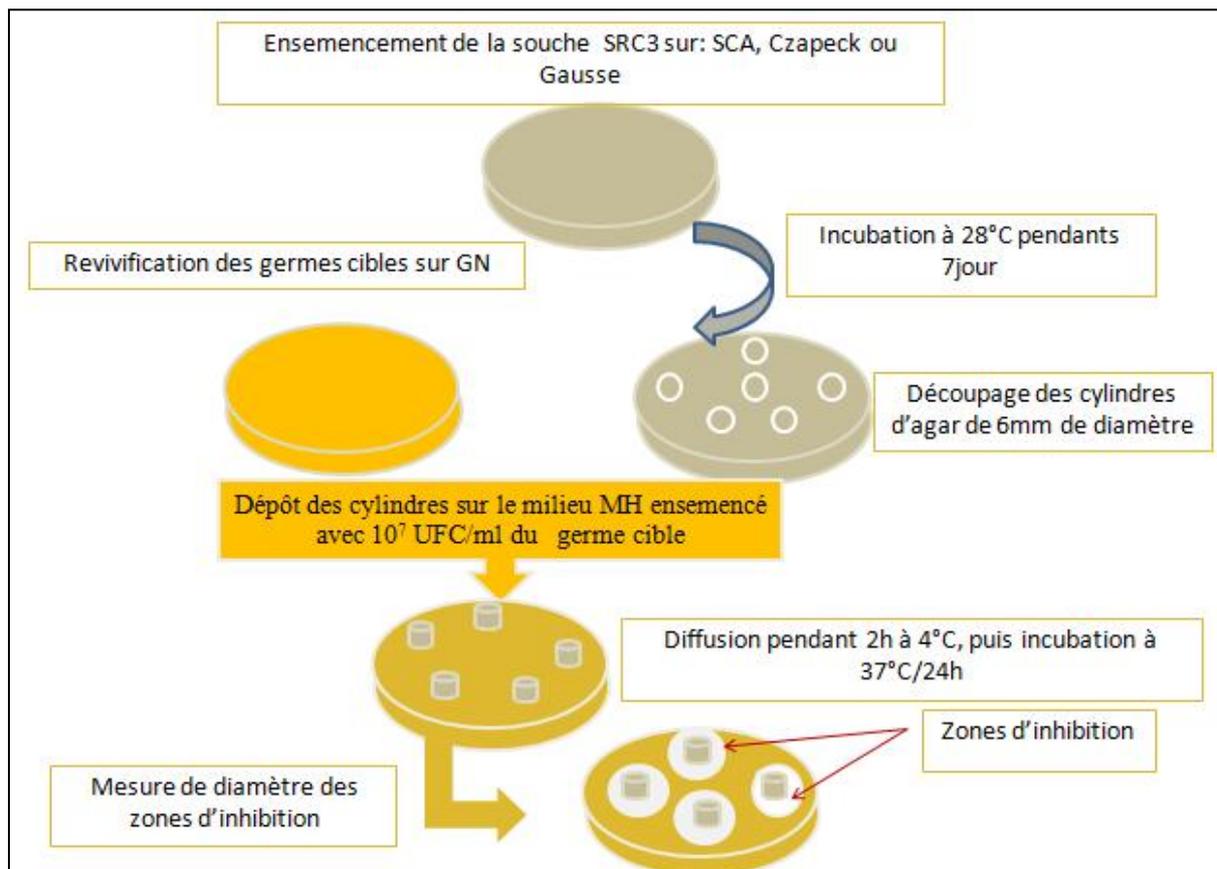


Figure 3: Mise en évidence de l'activité antibiotique de l'isolat d'actinomycète sur milieu Mueller-Hinton par la méthode des cylindres d'agar (**Bastide et al., 1986**).

3. Détermination des paramètres influent la production d'antibiotiques (plan de Plackett-Burman)

Dans le but de déterminer les paramètres les plus influents sur la production d'antibiotiques par la souche SRC₃ à savoir la concentration en : amidon, KCl, K₂HPO₄, MgSO₄·7H₂O, NaNO₃, pH et temps d'incubation, une modélisation des résultats expérimentaux est réalisée en utilisant le plan d'expérience de Plackett et Burman à l'aide d'un logiciel (Minitab 16.0). Les valeurs extrêmes choisies des différents paramètres opératoires étudiés du meilleur milieu de production d'antibiotiques, préalablement sélectionné, sont résumés dans le tableau II :

Tableau II : Les valeurs extrêmes des différents paramètres opératoires du meilleur milieu de production d'antibiotiques.

Paramètres opératoires	Niveau bas (-1)	Centre (0)	Niveau haut (+1)
X ₁ (g/l)	6	10	14
X ₂ (g/l)	0,3	0,5	0,7
X ₃ (g/l)	0,6	1	1,4
X ₄ (g/l)	1	3	5
X ₅ (g/l)	0,3	0,5	0,7
X ₆	5,2	7,2	9,2
X ₇	4	7	10

X₁ : (Amidon) ; X₂ : (KCl) ; X₃ : (K₂HPO₄) ; X₄ : (NaNO₃) ; X₅ : (MgSO₄) ; X₆ : pH ; X₇ : temps (jours).

Treize milieux, dénommés de (C₁ à C₁₃), de compositions différentes sont préparés selon la matrice des expériences (donnée par le logiciel : Minitab 16.0) du plan de Plackett-Burman choisis pour la détermination des facteurs influents l'activité antibiotique de SRC₃, évaluée par la méthode des cylindres d'agar vis-à-vis des germes cibles testés. La matrice des expériences donnée par le plan de P-B est présentée dans le tableau III (annexe II).

4. Modélisation de la production d'antibiotiques par le plan factoriel complet avec interaction.

Dans le but de déterminer les concentrations optimales des paramètres permettant une meilleure production d'antimicrobiens par la souche SRC₃, un plan factoriel avec interaction est appliqué dans cette étude afin de déterminer l'influence de chaque paramètre sur la

réponse étudiée (activité antimicrobienne) d'une part et d'évaluer les effets d'interaction de ces derniers d'autre part.

La matrice d'expériences donnée par le plan factoriel ayant permis la préparation des milieux d'optimisation, auxquels s'ajoutent trois essais au centre, est mentionnée dans le tableau IV (annexe II). L'activité antimicrobienne de la souche SRC₃ cultivée dans les conditions expérimentales déterminées par ce plan est évaluée par la méthode des cylindres d'agar et le diamètre des zones d'inhibition (en mm) est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse électronique.

5. Caractérisation morphologique

➤ Macromorphologie

Il s'agit de déterminer la forme et la taille des colonies ; la couleur des mycéliums aériens (MA) et de substrat (MS), la production ainsi que la couleur des pigments solubles produits sur les différents milieux de culture préconisés par « l'International *Streptomyces* Project » ou ISP (Shirling et Gottlieb, 1966), il s'agit de l'ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ISP6. La composition de ces derniers est donnée en annexe I. La SRC₃ est ensemencée sur ces différents milieux et incubée à 28°C et les lectures sont réalisées le 3^{ème}, 7^{ème}, 14^{ème} et le 21^{ème} jour de culture.

➤ Micromorphologie

Les colonies d'actinomycètes obtenus sur les milieux cités précédemment sont observées directement sur boîte de Pétri sous microscope optique en utilisant le grossissement (10x40). Cette étude consiste à voir les structures et la fragmentation ou non du mycélium du substrat (MS) et du mycélium aérien, ainsi que la sporulation.

6. Caractérisation physiologique

Certains tests physiologiques sont réalisés pour la différenciation entre les espèces d'actinomycètes. Il s'agit de la dégradation de certains composés organiques et la résistance à cinq métaux lourds. L'ensemble de ces tests effectués sont cités ci-dessous et la composition des milieux de culture utilisés sont détaillés en annexe I.

➤ Dégradation de divers composés organiques.

Ce test est réalisé sur des milieux de gélose nutritive additionnée du composant à tester à savoir :

- l'amidon (Marchal et Bourdon, 1973) ;
- la caséine du lait (Gourdon *et al.*, 1974) ;
- la gélatine (Marchal et Bourdon, 1973) ;

- la tyrosine (**Gourdon *et al.*, 1974**) ;
- 3 sels de sodium: Acétate; Citrate et Oxalate (**Gourdon *et al.*, 1974**).
- et 11 glucides à raison de 1% (glucose, lactose, mannitol, mannose, ramnose, sucrose, fructose, cellulose, tryptose, agarose et le xylose). Le milieu de base utilisé est l'ISP₉ préconisé par **Pridham et Gottlieb (1968)**. Ce dernier est utilisé comme témoin.

➤ **Résistance à certains sels métalliques :**

Dans le but de tester la résistance de la SRC3 à cinq métaux lourds différents (ZnSO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, $\text{Cd}_3\text{N}_2\text{O}_6$, $4\text{H}_2\text{O}$, FeN_3O_9 , $9\text{H}_2\text{O}$) ainsi que leur mélange, 50mg /l de ces derniers sont additionnés au milieu nutritif gélosé (NA : Nutrient Agar) (**Daboor *et al.*, 2014**). Après incubation à 28°C, des lectures sont réalisées le 3^{ème}, 7^{ème} et le 14^{ème} jours.

Dans cette partie, les résultats de la modélisation de la production d'antimicrobiens par la souche SRC₃ seront présentés, en premier lieu par le biais d'un plan d'expériences de Plackett- Burman afin de déterminer les paramètres opératoires qui ont plus d'influence sur l'activité antimicrobienne, et en deuxième lieu les étapes d'élaboration du modèle mathématique décrivant la variation de l'activité antimicrobienne en fonction des conditions opératoires seront décrites en utilisant un plan factoriel complet avec interactions. En fin une étude morphologique et quelques caractères physiologiques de la souche étudiée seront illustrés.

I. Choix du meilleur milieu de production d'antibiotiques

Dans le but de sélectionner le meilleur milieu de culture permettant une production maximale d'antibiotiques par la souche SRC₃, trois milieux de culture sont testés à savoir SCA (Startch-Casein-Agar), Gausse et Czapeck, sur sept germes cibles par la méthode des cylindres d'agar. Le milieu pour lequel la souche a présenté une production maximale d'antibiotiques est sélectionné pour la suite du travail et les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 4, ainsi que les zones d'inhibition donnée par ce milieu sont présentés dans la figure 5.

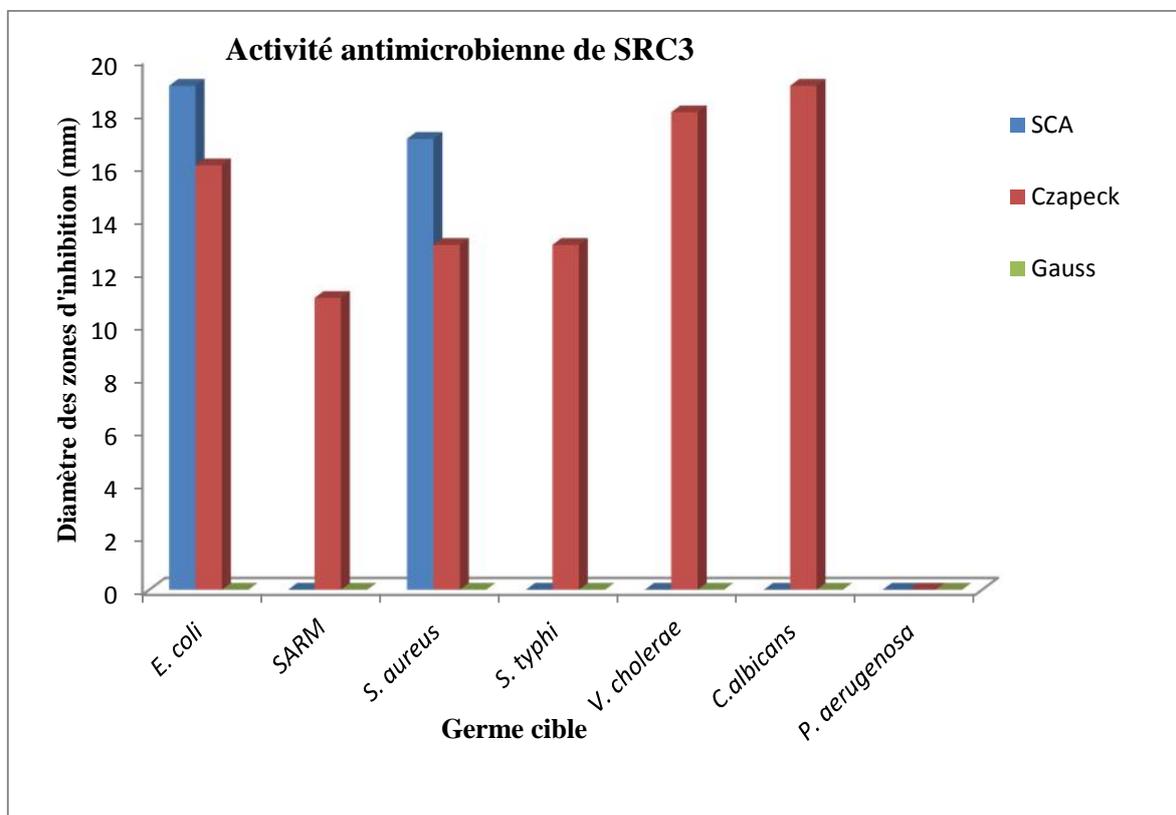


Figure 4 : Activité antimicrobienne de SRC₃ cultivée sur les différents milieux testés.

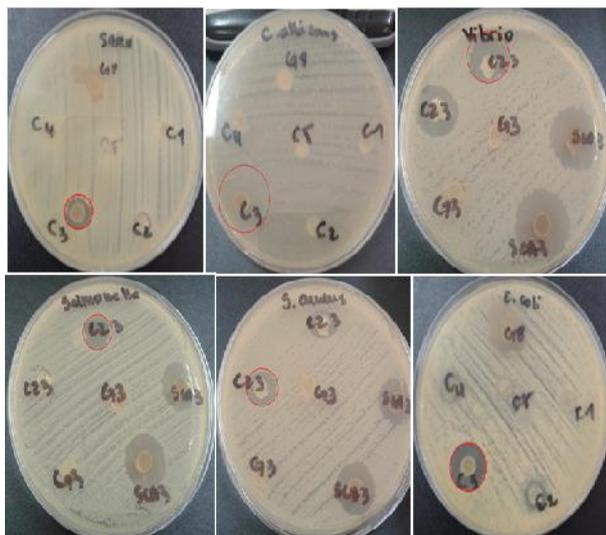


Figure 5 : Photographie des zones d'inhibition sur le milieu Czapeck

D'après les résultats représentés dans la figure 4 (et illustrés dans la figure 5), une activité à la fois antibactérienne qu'antifongique (avec un diamètre de zone d'inhibition à l'égard de *Candida albicans* de 19 mm) est notée en utilisant le milieu Czapeck alors qu'une activité exclusivement antibactérienne (vis-à-vis *E. coli*, *S. aureus*) est marquée sur le milieu SCA tandis qu'aucune activité n'est enregistrée sur le milieu Gauss. En effet, le milieu Czapeck est choisi comme étant le meilleur parmi ceux testés, permettant la production d'antimicrobiens. Il est ainsi sélectionné pour l'optimisation des paramètres de cette production.

D'après **Aharonowitz et Demain (1978)** ; **Omura et Tanaka (1986)** ; **Cheng *et al.*, (1995)** ; **Sanchez et Demain (2002)**, la nature et la concentration des composants du milieu de culture ont un effet remarquable sur la quantité d'antibiotiques produits par le microorganisme en question.

II. Détermination des paramètres influents la production d'antibiotiques

Les paramètres opératoires ($Z_1, Z_2, Z_3, \dots, Z_7$) pris en considération pour modéliser l'activité antibactérienne de la souche S3 vis-à-vis *Salmonella typhi* sont respectivement : amidon, KCl, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $NaNO_3$, pH et temps d'incubation. La matrice d'expériences de Plackett et Burman et les résultats de l'activité antibactérienne (y) sont regroupés dans le tableau III (annexe II). Les résultats obtenus par le logiciel Minitab16.0 sont représentés sur la figure 6.

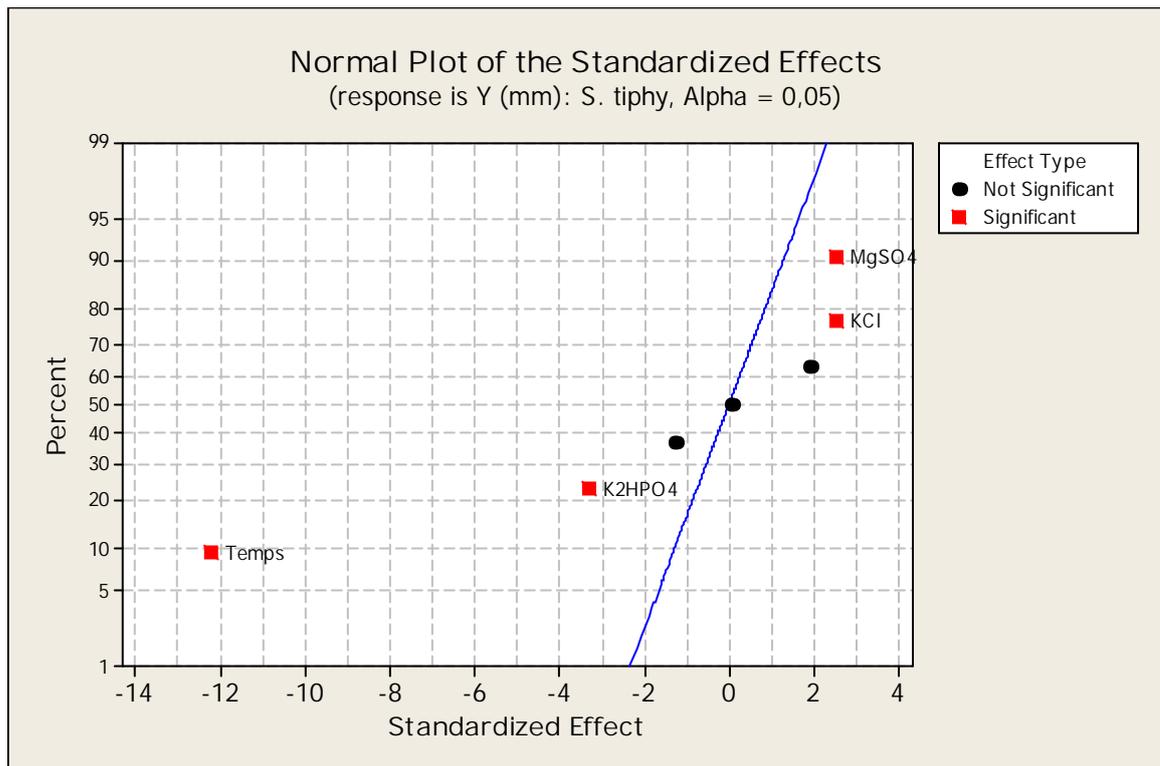


Figure 6 : Tracé représentatif des facteurs influents la production des antibiotiques.

D'après ces résultats obtenus, les facteurs qui ont plus d'influence sur l'activité antibactérienne sont respectivement: la concentration en KCl (x_1), en K_2HPO_4 (x_2), en $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, (x_3) et le temps d'incubation (x_4).

III. Modélisation de la production d'antibiotiques par un plan composite centré (CCD)

1. Elaboration du model de premier degré

Après avoir déterminé les facteurs influents la production antibactériennes par la souche SRC₃ vis-à-vis de *Salmonella typhi*, les quatre facteurs opératoires considérés (Z_1 , Z_2 , Z_3 , Z_4) sont respectivement : la concentration initiale en KCl, en K_2HPO_4 , en $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ et le temps d'incubation, dont leurs valeurs extrêmes sont présentées dans le tableau V.

Tableau V : valeurs extrêmes des paramètres opératoires étudiés

Paramètres opératoires	Notation	Niveau minimal (-1)	Le centre (0)	Niveau maximal (+1)
La concentration en KCl(g/l)	Z ₁	0,3	0,5	0,7
La concentration en K ₂ HPO ₄ (g/l)	Z ₂	0,6	1	1,4
La concentration en MgSO ₄ (g/l)	Z ₃	0,3	0,5	0,7
Le temps d'incubation (jours)	Z ₄	4	7	10

En premier lieu, un plan factoriel avec interaction est appliqué dans cette étude pour déterminer l'influence de chaque paramètre sur la réponse étudiée (activité anti-*S. typhi*) d'une part et évaluer les effets d'interaction de ces derniers d'autre part. Le nombre d'essais $N=2^k$ dans ce cas $k=4$ (facteurs) est donc seize milieux Czapeck, numérotés de 1 à 16 et de composition variée. Ils sont préparés selon la matrice donnée par ce plan.

Le diamètre de la zone d'inhibition (y) obtenue pour chaque expérience est la moyenne des trois répétitions réalisées pour chaque milieu. La matrice des expériences effectuées ainsi que la réponse (y) notée pour chacune sont mentionnées dans le tableau IV (annexe II).

La moyenne des zones d'inhibitions (réponses) des seize milieux à l'égard de *S. typhi* est de $\bar{y} = 10,09$ mm. Le nombre (n_0) d'expériences au centre du domaine expérimental ($[KCl]=0.5g/l$, $[K_2HPO_4]=1g/l$, $[MgSO_4]=0.5g/l$, temps=7 jours) est 3 et les diamètres des zones d'inhibitions ainsi obtenues sont rassemblés dans le tableau VI.

Tableau VI : Valeurs des zones d'inhibitions au centre du domaine.

n_0	y_0 (mm)
1	13,2
2	12,9
3	11,5

Moyenne (\bar{y}_0)	12,53
-------------------------	-------

1.1 Calcul des coefficients du modèle

Les coefficients b_j de l'équation de régression sont obtenus par le produit scalaire de la colonne y par les colonnes x_j correspondantes qu'on divise par le nombre d'essais N . Les valeurs de ces coefficients sont regroupées dans le tableau VII.

Tableau VII: Valeurs des coefficients du modèle

Terme constant	Effets linéaires			
b_0	b_1	b_2	b_3	b_4
10,09	0,41	1,23	- 0,005	- 0,32

Effets d'interactions										
b_{12}	b_{13}	b_{14}	b_{23}	b_{24}	b_{34}	b_{123}	b_{124}	b_{134}	b_{234}	b_{1234}
-0,6	2,99	-0,56	1,31	-1,32	0,75	0,06	0,78	-0,76	-1,67	-0,40

1.2. Analyse statistique de l'équation de régression

1.2.1. Vérification de la signification des coefficients

Le test de Student permet de déterminer si parmi les coefficients du modèle, il existe des coefficients non significatifs, lesquels seront éliminés de l'équation de régression car leur influence sur l'activité antibactérienne est négligeable. La procédure de calcul consiste à déterminer :

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

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

y_i : Valeur du diamètre de la zone d'inhibition de l'essai i au centre.

\bar{y}_0 : Moyenne des 3 essais au centre ; $\bar{y}_0 = 12,53$ mm

en aura alors: $S_{\text{rep}}^2 = 0,82$

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

$$\text{de } t_j \text{ pour chaque coefficient : } t_j = \frac{|b_j|}{S_{b_j}}$$

Avec : S_{b_j} est l'écart quadratique moyen défini par : $S_{b_j} = \frac{S_{\text{rep}}}{\sqrt{N}} = 0,227$

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

Tableau VIII: Valeurs des t_j calculées

Terme constant	Effets linéaires			
t_0	t_1	t_2	t_3	t_4
44,48	1,83	5,43	0,021	1,43

Effets d'interactions										
t_{12}	t_{13}	t_{14}	t_{23}	t_{24}	t_{34}	t_{123}	t_{124}	t_{134}	t_{234}	t_{1234}
2,68	13,16	2,45	5,78	5,84	3,32	0,28	3,44	3,37	7,34	1,75

En utilisant la table de Student relative à un test bilatéral (Annexe IV), la valeur t (f) pour un degré de liberté $f = n_0 - 1 = 2$ et pour un niveau de signification $\alpha = 5\%$, est égale à 4,3. D'après les résultats des tableaux précédents, nous remarquons que les valeurs de t_1 , t_3 , t_4 , t_{12} , t_{14} , t_{34} , t_{123} , t_{124} , t_{134} , t_{1234} sont inférieures à la valeur tabulée (4,3), alors les coefficients correspondant ne sont pas significatifs, et ils seront donc éliminés de l'équation de régression du modèle qui s'écrit sous la forme suivante:

$$= 10,09 + 1,23 x_2 + 2,99 x_1 x_3 + 1,31 x_2 x_3 - 1,32 x_2 x_4 - 1,67 x_2 x_3 x_4$$

D'après ce modèle, nous remarquons que la concentration en K_2HPO_4 (x_2) a un effet linéaire dont son influence est positive. Le signe positif nous indique que l'augmentation de la concentration en K_2HPO_4 de sa valeur minimale (1g/l) à sa valeur maximale (1,8g/l) fait augmenter l'activité de la souche SRC₃. Ces résultats sont similaires à ceux de **Ripa et al** en 2009, sur la souche *Streptomyces* et ceux de **Kavitha et Vijayalakshmi** en 2009 sur la souche *Nocardia levis*.

Nos résultats sont opposés à ceux de **Lebrihi et al** en **1992** dont des concentrations élevées en source de phosphate empêche la synthèse de l'enzyme de prolongation essentielle pour la production de céphalosporine, et à ceux de **JIN Zhihua et al** en **2006** qui ont trouvé qu'une forte concentration en phosphate inhibe la croissance et empêche la synthèse de spinosad.

Nous remarquons d'après le model de premier degré l'existence de quatre interactions qui sont :

- Celle entre le KCl (x_1) et le $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (x_3) avec un effet de (+ 2,99) ; et celle entre le K_2HPO_4 (x_2) et le $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (x_3) avec un effet de (+1,31) qui influents positivement sur la production d'antibiotiques. **Ripa et Collaborateur** en (2009), ont montrés que la concentration en $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ a un effet positif sur la production d'antibiotiques par *Streptomyces sp* avec un optimum à 0.05%. Dans l'étude réalisée par **El-Sersy et Abou- elela** en (2006), le $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ à une concentration de 0.5% est le facteur qui affecte la production des agents bioactifs par la souche *Nocardia brasiliensis* dont la gamme testée est de 0,25 à 1,5 g/l.
- Celle entre le K_2HPO_4 (x_2) et le temps d'incubation (x_4) avec un effet de (-1,32) ; et celle entre le K_2HPO_4 (x_2) et le $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (x_3) ainsi que le temps (x_4) avec un effet de (-1,67) qui influents négativement sur la production d'antibiotiques.

1.2.2. Test de validation de l'équation du modèle

➤ Recherche de biais

Avant de valider le modèle postulé, nous devons vérifier l'absence du biais, pour cela, on calcul la variance résiduelle qu'on va comparer à celle de reproductibilité par le test de

Fisher Snedecor : $F = \frac{S_{rés}^2}{S_{rep}^2}$, dont la variance résiduelle est donnée par la relation suivante :

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

y_i : valeur du diamètre de la zone d'inhibition pour chaque milieu donné par le modèle.

Pour $N=16$ et $\ell=6$ (ℓ est le nombre de coefficients significatifs) on trouve $S_{rés}^2=6,311$

Donc : $F= 6,311/ 0,82 = 7,665$

La valeur tabulée du test du Fisher pour $f_1=10$ et $f_2=2$ est égal à 19,45. Comme cette valeur est supérieure à celle calculée, alors le modèle est sans biais, ce qui signifie que tous les paramètres influençant la réponse sont pris en considération par le modèle.

➤ Test de signification de la régression

Pour vérifier la signification de la régression on effectue le test de Fisher donné par la relation

suivante : $F = S^2_{\text{régr}} / S^2_{\text{rés}}$, donc :

$$F = \frac{\sum_{i=1}^N (\hat{y}_i - \bar{y})^2 / \ell - 1}{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2 / N - \ell} = 8,62$$

Où : $\bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^N y_i}{N} = 12,53.$

La valeur tabulée du test Fisher pour $f_1= 6-1=5$ et $f_2=16-6=10$ est égale à 3,33. Comme la valeur calculée est supérieur aux valeurs tabulées alors le modèle est valide à 95%.

➤ Validation par le point au centre

Dans cette étape, on compare la valeur de la zone d'inhibition déterminée par le model au centre $y_0(0,0,0,0)=10,09\text{mm}$ à la moyenne des expériences au centre $\bar{y}_0= 12,53 \text{ mm}$, par le calcul d'erreur relative entre ces deux valeurs, tell que :

$$\text{Erreur relative} = (\bar{y}_0 - y_0) / y_0 = 0,2421$$

2. Elaboration du modèle de second degré

Comme l'erreur relative entre la valeur expérimentale et théorique est de 24,21% qui est supérieure à 5% alors le modèle de premier degré ne simule pas bien l'expérience. A cet effet, on élabore un modèle du second degré, toute on conservons les résultats des essais du plan factoriel complet avec interactions y compris les résultats des essais effectués au centre du domaine d'étude. Les valeurs des paramètres des essais complémentaires sont regroupées dans le tableau IX.

Tableau IX: Valeurs des paramètres du plan en étoile.

Paramètres opératoires	Niveau (-) = -2	Niveau (+) = +2
KCl (g/l)	0,1	0,9
K ₂ HPO ₄ (g/l)	0,2	1,8
MgSO ₄ (g/l)	0,1	0,9
Temps (jours)	1	13

La matrice des expériences du model du second degré, ainsi que le diamètre de la zone d'inhibition (y) obtenue pour chaque expérience est la moyenne des trois répétitions réalisées pour chaque milieu sont mentionnées dans le tableau X.

Tableau X : Matrice des expériences du plan en étoile.

Milieux Czapeck	Z ₁	Z ₂	Z ₃	Z ₄	X ₀	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Y(mm)
C ₁	0,3	0,6	0,3	4	+1	-1	-1	-1	-1	11
C ₂	0,7	0,6	0,3	4	+1	+1	-1	-1	-1	12,18
C ₃	0,3	1,4	0,3	4	+1	-1	+1	-1	-1	13,86
C ₄	0,7	1,4	0,3	4	+1	+1	+1	-1	-1	7,65
C ₅	0,3	0,6	0,7	4	+1	-1	-1	+1	-1	0
C ₆	0,7	0,6	0,7	4	+1	+1	-1	+1	-1	8,25
C ₇	0,3	1,4	0,7	4	+1	-1	+1	+1	-1	12,92
C ₈	0,7	1,4	0,7	4	+1	+1	+1	+1	-1	17,46
C ₉	0,3	0,6	0,3	10	+1	-1	-1	-1	+1	10,1
C ₁₀	0,7	0,6	0,3	10	+1	+1	-1	-1	+1	7,41
C ₁₁	0,3	1,4	0,3	10	+1	-1	+1	-1	+1	9,62
C ₁₂	0,7	1,4	0,3	10	+1	+1	+1	-1	+1	8,94
C ₁₃	0,3	0,6	0,7	10	+1	-1	-1	+1	+1	10,24
C ₁₄	0,7	0,6	0,7	10	+1	+1	-1	+1	+1	11,68
C ₁₅	0,3	1,4	0,7	10	+1	-1	+1	+1	+1	9,67
C ₁₆	0,7	1,4	0,7	10	+1	+1	+1	+1	+1	10,47
C ₁₇	0,5	1	0,5	7	+1	0	0	0	0	13,2
C ₁₈	0,5	1	0,5	7	+1	0	0	0	0	12,9
C ₁₉	0,5	1	0,5	7	+1	0	0	0	0	11,5
C ₂₀	0,1	1	0,5	7	+1	-2	0	0	0	11,67
C ₂₁	0,9	1	0,5	7	+1	+2	0	0	0	11,77
C ₂₂	0,5	0,2	0,5	7	+1	0	-2	0	0	12,96
C ₂₃	0,5	1,8	0,5	7	+1	0	+2	0	0	17,75

C ₂₄	0,5	1	0,1	7	+1	0	0	-2	0	10,85
C ₂₅	0,5	1	0,9	7	+1	0	0	+2	0	10,97
C ₂₆	0,5	1	0,5	1	+1	0	0	0	-2	10,6
C ₂₇	0,5	1	0,5	13	+1	0	0	0	+2	19,78

2.1 Calcul des coefficients du modèle

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

$$B = [X^T.X]^{-1} . [X]^T . [Y]$$

Les résultats de ce calcul sont rassemblés dans le tableau XI.

Tableau XI: valeurs des coefficients du modèle

Terme constant	Effets linéaires			
b ₀	b ₁	b ₂	b ₃	b ₄
12,53	0,28	1,22	0,007	0,55

Effets d'interactions et quadratiques									
b ₁₂	b ₁₃	b ₁₄	b ₂₃	b ₂₄	b ₃₄	b ₁₁	b ₂₂	b ₃₃	b ₄₄
-0,61	1,46	-0,56	1,31	-1,32	0,75	-0,74	0,17	-0,94	0,13

2.2. Analyse statistique de l'équation de régression

2.2.1 Vérification de la signification des coefficients

La valeur de la variance de reproductibilité S^2_{rep} est la même que celle calculée pour le plan factoriel, $S^2_{rep} = 0,82$. Pour déterminer la variance des coefficients du modèle, il suffit de multiplier les éléments C_{jj} de la diagonale de la matrice de dispersion $[X^T.X]^{-1}$ (tableau XII)

par cette variance : $S^2_{bj} = C_{jj} . S^2_{rep}$

Tableau XII : Matrice de dispersion $[X^T.X]^{-1}$

0,33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-0,083	-0,083	-0,083	-0,083
0	0,042	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0,042	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0,042	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0,042	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0,063	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0,063	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0,063	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0,063	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,063	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,063	0	0	0	0
-0,083	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,047	0,016	0,016	0,016
-0,083	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,016	0,047	0,016	0,016
-0,083	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,016	0,016	0,047	0,016
-0,083	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,016	0,016	0,016	0,047

Les valeurs des S^2_{bj} calculés sont groupées dans le tableau XIII ci-dessous.

Tableau XIII : Valeurs des S^2_{bj} .

S^2_{bj}	Valeurs de t_j		Effets linéaire
0,27	23,92	t_0	
0,034	1,54	t_1	
0,034	6,59	t_2	
0,034	0,035	t_3	
0,034	2,96	t_4	
0,052	2,68	t_{12}	Effets d'interactions et quadratiques
0,052	6,45	t_{13}	
0,052	2,45	t_{14}	
0,052	5,78	t_{23}	
0,052	5,84	t_{24}	
0,052	3,32	t_{34}	
0,039	3,75	t_{11}	
0,039	0,87	t_{22}	
0,039	4,79	t_{33}	
0,039	0,66	t_{44}	

La valeur tabulée du test de Student pour $f=2$ à 5% égale à 4,3 ; on a les valeurs de t_1 , t_3 , t_{12} , t_4 , t_{14} , t_{34} , t_{11} , t_{22} , t_{44} sont inférieurs à cette dernière, alors les coefficients correspondants sont non significatifs et ils seront éliminés de l'équation du modèle.

2.2.2 Test de validation de l'équation de régression

➤ Recherche du biais

La valeur calculée de la variance résiduelle pour $N=27$ et $l=6$ est donnée par : $S^2_{res}=10,04$ ce qui donne $F=10,04/0,82=12,19$.

La valeur tabulée du test de Fisher pour le niveau de signification = 5% et les nombre des degrés de liberté $f_1 = 21$ et $f_2 = 2$ varie entre 19,4 et 19,5 cette valeur est supérieure à celle calculée alors le modèle est sans biais.

➤ Test de la signification de la régression

La valeur calculée du test de Fisher est égale à : $F= 3,05$ alors que la valeur tabulée pour le niveau de signification = 5% et les nombres des degrés de liberté $f_1=5$ et $f_2= 21$ est égal à 2,68 comme la valeur calculée est supérieure à celle tabulée, l'équation de régression est adéquate et le modèle est valide à 95%. L'équation retenue pour le modèle s'écrit donc :

$$= 12,53 + 1,22 x_2 + 1,46x_1x_3 + 1,31x_2x_3 - 1,32x_2x_4 - 0,94 x_3^2$$

3. Calcul de l'optimum

Rappelons l'équation de régression donnant le diamètre de la zone d'inhibition () en fonction de la concentration en KCl, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ et le temps d'incubation correspondant respectivement aux variables codées x_1 , x_2 , x_3 et x_4 :

$$= 12,53 + 1,22 x_2 + 1,46x_1x_3 + 1,31x_2x_3 - 1,32x_2x_4 - 0,94 x_3^2$$

A partir de ce modèle, nous sommes maintenant en mesure de calculer les valeurs optimales des paramètres opératoires conduisant à une activité antibactérienne maximale vis-à-vis *Salmonella typhi*. Il suffit pour cela, de résoudre le système d'équations ci-dessous, obtenu en dérivant le modèle prédictif par rapport à chacune des variables x_1 , x_2 , x_3 et x_4 :

$$\frac{d\hat{y}}{dx_1} = 1,46 x_3 = 0 \quad x_3 = 0$$

$$\frac{d\hat{y}}{dx_2} = 1,22 + 1,31 x_3 - 1,32 x_4 = 0 \quad x_4 = 0,92$$

$$\frac{d\hat{y}}{dx_3} = 1,46 x_1 + 1,31 x_2 - 1,88 x_3 = 0 \quad x_1 = 0$$

$$\frac{dy}{dx_4} = -1,32 x_2 = 0 \quad x_2 = 0$$

La résolution du système d'équations conduit à :

$x_1 = 0$, correspondant à une concentration de KCl égale à 0,5 g/L

$x_2 = 0$, correspondant à une concentration de K_2HPO_4 égale à 1 g/L

$x_3 = 0$, correspondant à une concentration de $MgSO_4, 7H_2O$ égale à 0,5 g/L

$x_4 = 0,92$; correspondant à un temps d'incubation égale à 9 jours et 18 heures et 14 minutes et 24 secondes.

L'activité antibactérienne théorique optimale obtenue en remplaçant les variables par ces valeurs dans le modèle postulé est de 12,53 mm.

L'objectif de ce travail étant d'obtenir une zone d'inhibition maximale, par conséquent on cherche la région du domaine d'étude où cette condition est respectée. Le nombre de facteurs étant élevé (4), les étudier tous en même temps n'est pas une chose facile. Pour simplifier l'étude, nous sommes amenées à réaliser des coupes en fixant deux variables à leurs valeurs optimales ($x_2 = 0$ et $x_4 = 0,92$), et en traçant les courbes isoréponses dans le plan $= f(x_1, x_3)$ qui correspond à l'interaction la plus importante.

$$\text{Alors : } = 12,53 + 1,46x_1x_3 - 0,94x_3^2$$

La surface de réponse (a) et la courbe isoréponse (b) tracées à l'aide du logiciel MATLAB 7.0 sont présentées par la figure 7.

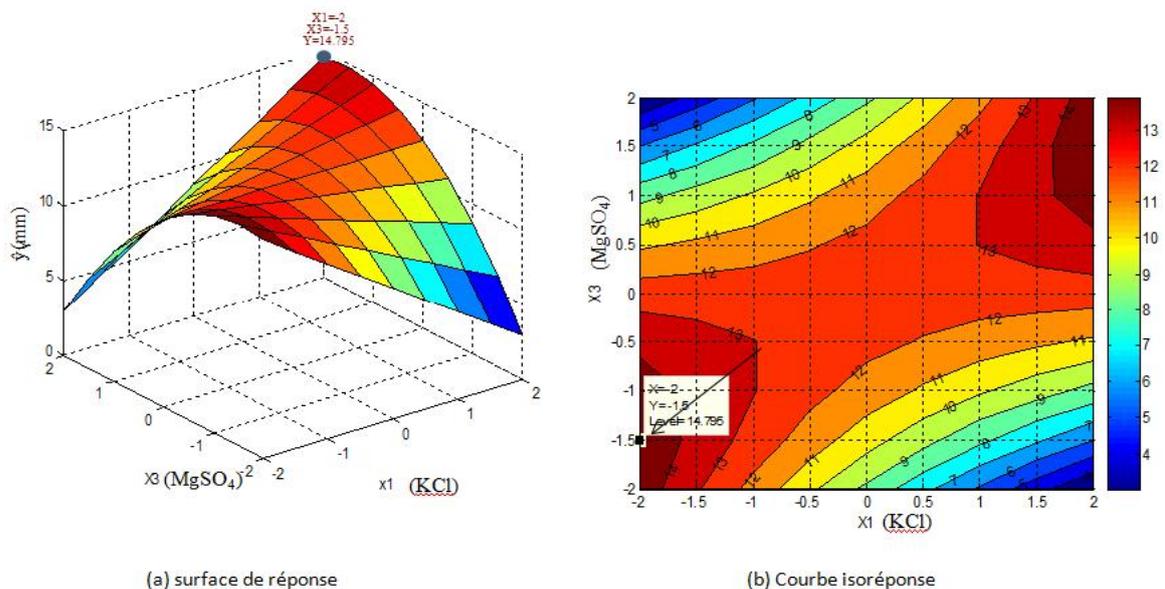


Figure 7 : Surface de réponse (a) et courbe isoréponse (b) pour $x_2 = 0$ et $x_4 = 0,92$

Selon le sens de la flèche indiquée sur la courbe isoréponse, l'activité anti-*S. typhi* augmente dans le sens de diminution des concentrations de KCl ($X=x_1$) et de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ($Y=x_3$). Ces deux courbes nous ont permis de localiser un optimum de l'activité de 14,795 mm obtenu pour une concentration en KCl= 0,1g/l ($x_1= - 2$) et une concentration en $MgSO_4 \cdot 7H_2O = 0,2g/l$ ($x_3= -1.5$). De point de vu économique il est intéressant de travailler avec ces concentrations pour avoir un optimum plus élevée. Ces concentrations sont plus faibles comparant avec celle de l'optimum déterminées par le modèle.

IV. Caractérisation morphologique de la souche

1. Macromorphologie

La souche SRC3 estensemencée sur les milieux ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ISP6 et l'ISP9, après incubation à 28°C, des observations sont effectuées le 3^{ème}, 7^{ème}, 14^{ème} et 21^{ème} jours. La croissance, l'aspect des colonies, la couleur du MS, MA et de pigment diffusible sont notés dans le tableau XIV ci dessous et XV (annexe III).

Tableau XIV : Résultats des aspects morphologiques de la souche SRC₃ cultivée sur les milieux ISP après 3^{ème}, 7^{ème}, 14^{ème} et 21^{ème} jours d'incubation.

Milieux Durée	Les milieux				
	ISP ₁	ISP ₂	ISP ₃	ISP ₄	ISP ₄
3 ^{ème} jour					
• MA	(-)	(+/-)	Blanc avec teinte grisâtre	(-)	(-)
• MS	Beige	Beige Jaunâtre	Gris claire	Jaune claire	Beige
• Croissance	+++	+++	+++	++	++
• Colonies	Rugueuse	Moyennes, rugueuses, craquelés	Petits ,poudreuses	Petits, bombés, lisses	Petits , légèrement bombés, rugueuses
• Pigments difusibles	(-)	(-)	(-)	(-)	Violet foncée
7 ^{ème} jour					
• MA	(-)	(+/-)	Blanc	(-)	(-)
• MS	Beige	Jaune	Gris claire	Jaune claire	Beige
• Croissance	+++	+++	+++	++	++
• Colonies	Beige Rugueuses sec	Moyennes, rugueuses, craquelés	Petits ,poudreuses	Petits, bombés a un centre rugueux jaunâtre	Petits , légèrement bombés, rugueuses
• Pigments difusibles	(-)	(-)	(-)	(-)	Violet foncée

14 ^{ème} jour	<ul style="list-style-type: none"> • MA • MS • Croissance • Colonies • Pigments diffusibles 	(+/-) Jaune claire	+/- Marron claire +++	Gris foncée Vert	(+/-) Jaune	Blanc Blanc
		+++	Craquelés rugueuses	++++	+++	+++++
		Rugueuses sec		Poudreuses	Rugueuse	Moyennes rugueuses
		(-)	(-)	(-)	(-)	Violet foncée
21 ^{ème} jour	<ul style="list-style-type: none"> • MA • MS • Croissance • Colonies • Pigments diffusibles 	Blanc Jaune ++++	Blanc Jaune ++++	Noire Noire ++++	Blanc Jaune ++++	Gris claire Blanc ++++
		Rugueuses sec	Craquelés	Rugueuses	Moyennes rugueuse	Rugueuses
		(-)	(-)	(-)	(-)	Violet foncée

D'après ces résultats nous pouvons déduire que : la souche SRC₃ présente une croissance importante sur ISP1, ISP2, ISP3, et ISP6. Les pigments diffusibles ne sont pas produits par cet isolat sur la majorité des milieux à l'exception du milieu ISP6, il est de couleur violette foncée, et ce, à partir du 3^{ème} jour de son incubation à 28°C. Après 21 jours d'incubation, la production de MA est observée sur tous ces milieux, il est de couleur blanche sur ISP1, ISP2 et ISP4. Cependant, il est noir sur ISP3 et gris-claire avec une teinte blanchâtre sur l'ISP6.

Le MS est d'une couleur jaune sur (ISP1, ISP2 et ISP4), noir sur ISP3 et blanche sur ISP6. Les colonies présentent un aspect rugueux à partir du 7^{ème} jours sur les (ISP1, ISP2, ISP4, ISP6) et avec un aspect poudreux sur ISP3. La taille de celles-ci varie d'un milieu à un autre, elles sont toutes incrustées dans la gélose.

Cette variation d'aspect, de couleurs, de taille et de croissance peut être due aux différents composants des milieux (Shirling et Gottlieb, 1966).

2. Micromorphologie

Cette étude a pour but la détermination de la morphologie, la fragmentation des mycéliums ainsi que le type de spores de la souche SRC₃. Les colonies obtenues sur les différents milieux utilisés pour l'étude de la macromorphologie (l'ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, l'ISP6), sont directement observées sur boîtes de Pétri sous microscope optique à l'objectif x40. Les résultats obtenus indiquent que le mycélium du substrat (MS) de la souche SRC₃ est fragmenté, non cloisonnés portant des chaînes de spores (immobiles) de type *S* (*S*= *Spira*). Ce type de mycélium est caractéristique du genre *Streptomyces*. L'aspect et le type de MS ainsi que les chaînes de spores sont représentés dans la **figure 8**.



Figure 8: Photographie illustrant la micromorphologie de la souche SRC3 sur ISP₁.

V. Caractérisation physiologique

L'étude physiologique effectuée sur la souche SRC₃, nous a permis de déterminer sa capacité d'utilisation et de dégradation de certains composés organiques ainsi que cinq métaux lourds.

1. Dégradation de divers composés organiques.

Les composés organiques testés sont : la caséine de lait, les glucides, la gélatine, la tyrosine et les sels de sodium (Acétate; Citrate et Oxalate).Le tableau (XVI) illustre les résultats des tests de leur dégradation par la souche SRC₃.

Tableau XVI: Résultats de dégradation des différents composés organiques.

Test effectués	Résultats des tests.
Dégradation de	
2. Caseine du lait	(-)
3. Gélatine	(+++)
• Tyrosine	(+)
Sels de sodium:	
• Acétate	(+++)
• Oxalate	(+++)
• Citrate	(+++)

Assimilation des sucres :	
• Agarose	
• Rannose	(-)
• Xylose	(++)
• Mannose	(-)
• Tryptose	(+)
• Lactose	(++)
• Arabinose	(-)
• Glucose	(-)
• Fructose	(+)
• Cellulose	(-)
• Mannitol	(+)
• ISP ₉	(++)
	(-)

(+): Développement moyen, (++) : Bon développement, (+++) : Très bon développement, (-) : pas de développement.

D'après ce tableau la majorité des composés organiques sont dégradés par la souche SRC₃ à l'exception de la caséine de lait, agarose, xylose, lactose, arabinose et le fructose.

La souche SRC₃ ne pousse pas sur l'ISP₉ tandis qu'elle pousse sur ce dernier additionné des sucres tel que : le rannose, mannose, tryptose, glucose, cellulose et mannitol, donc elle exige une de ces sucres comme source de carbone pour croitre.

2. Dégradation des sels métalliques :

Les métaux lourds testés sont : (ZnSO₄), (CuSO₄), (K₂Cr₂O₇), (Cd₃N₂O₆, 4H₂O), (FeN₃O₉, 9H₂O). Le tableau (XVII) montre les résultats des tests de leurs dégradation ou pas par la souche SRC₃.

Tableau XVII: Résultats de dégradation des sels métalliques par la souche SRC₃ après 3^{ème}, 7^{ème} et 14^{ème} jours d'incubation.

Sels Temps (jours)	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	CuSO ₄ , 5H ₂ O	K ₂ Cr ₂ O ₇	Cd ₃ N ₂ O ₆ , 4H ₂ O	FeN ₃ O ₉ , 9H ₂ O	Mélange des sels
3 ^{ème}	+	+	++	+ /-	+	-
7 ^{ème}	++	+	++	+	+	-
14 ^{ème}	++	++	++	+	+	-

(+) : Développement moyen, (++) : Bon développement, (+/-) : Développement du mycélium du substrat (MS) uniquement, (-) : pas de développement.

D'après ce tableau la souche SRC₃ a la capacité de dégrader les métaux testés (à 50 mg/l), mais elle est incapable de dégrader le mélange de ces derniers. Cette capacité de dégradation de ces métaux est une caractéristique importante de certains actinomycètes pouvant être utilisés dans la dépollution des écosystèmes pollués par ces métaux. Une étude menée par **Daboor *et al*, (2014)** a permis l'isolement de 67 actinomycètes à partir d'échantillons d'eau et de sédiment de la rivière du Nile dont seulement 5 (7,5%) Streptomycètes ont la capacité de dégrader ces mêmes métaux lourds.

L'ensemble des tests physiologiques nécessite d'être complétés par d'autres telle que : la croissance sur d'autres milieux utilisées pour les actinomycètes à différentes température et pH, et en présence d'autres agents chimiques (antibiotiques, tellurites de potassium, phénols,...est). Il serait aussi plus intéressant de coupler cette étude morphologique à une autre chimiotaxonomique et moléculaire car l'identification des espèces des actinomycètes repose sur des méthodes phénotypiques mais aussi par des critères chimiques et des critères moléculaires qui s'avèrent essentiels et indispensables.

Conclusion

Cette étude avait pour principal objectif l'optimisation de la production d'antibiotiques par une souche d'actinomycète dénommée SRC₃, en utilisant le plan composite centré.

Suite aux tests d'antagonisme de la souche, cultivée sur trois milieux de culture différents vis-à-vis de certaines bactériennes cibles et *C. albicans*, le milieu Czapeck est sélectionné comme étant le meilleur milieu ayant présenté des activités à la fois antibactérienne qu'antifongique.

Dans le but de déterminer les facteurs qui influents sur la production d'antibiotiques par la souche SRC₃, une modélisation par le plan Plackett et Burman est appliquée, cette dernière a montré que les facteurs les plus influençant sur l'activité anti- *S. typhi* sont le : KCl, K₂HPO₄, MgSO₄ ; 7H₂O, et le temps d'incubation.

La modélisation par le biais d'un plan composite centré est appliquée, en premier lieu, un plan factoriel avec interaction est élaboré afin d'étudier les effets linéaires et d'interactions entre les différents paramètres considérés. En deuxième lieu, un modèle du second degré a été développé afin de tracer la courbe isoréponse et la surface de réponse.

Les résultats obtenus montrent que le facteur le plus influençant sur l'activité anti- *S. typhi* de la souche SRC₃ est la source de phosphate(K₂HPO₄), toutefois l'interaction la plus importante est marquée pour le couple [KCl]-[MgSO₄; 7H₂O].

Les concentrations optimales de ces dernières sont calculées à partir du modèle de second degré et leurs valeurs sont les suivantes : [KCl] = 0,5 g/L, [K₂HPO₄] = 1 g/L, [MgSO₄, 7H₂O] = 0,5 g/L, le temps d'incubation égale à 9 jours, 18 heures, 14 minutes et 24 secondes, avec une activité de 12,53 mm qui est égale à celle obtenue au centre du domaine expérimentale.

La courbe isoréponse nous a montré qu'on peut obtenir une activité de 14,795 mm supérieure à celle obtenue au centre 12,53 mm avec des concentrations en [KCl] = 0,1 g/L et en [MgSO₄ ; 7H₂O] = 0,2 g/L. Un test de confirmation de ce résultat serait indispensable à réaliser. Cependant suite à certaines contraintes (manque de temps et la disponibilité de la paillasse), ce dernier n'a pas été effectué.

Conclusion

L'ensemble des résultats obtenus ont montrés que sur milieu Czapeck et à 28°C, seulement quatre paramètres (KCl, K₂HPO₄, MgSO₄ · 7H₂O et la durée d'incubation) parmi sept testés ont un effet sur la production d'anti- *S. typhi* par la souche SRC₃.

Ces résultats restent intéressants et méritent d'être complétés par :

- ✓ élargir la gamme de germes cibles ;
- ✓ optimiser tous les paramètres nutritionnels de cultures ;
- ✓ passer du milieu solide au milieu liquide ;
- ✓ vérifier la meilleure activité (14,795 mm) prédite par la courbe isoréponse au laboratoire ;
- ✓ étudier la cinétique de croissance et de production des antibiotiques ;
- ✓ étudier d'autres milieux de culture connus pour leur production d'antibiotiques (l'ISP₂ par exemples) ;
- ✓ essayer d'autres domaines d'études ;
- ✓ compléter l'identification de la souche SRC₃ (ajouter d'autres tests physiologiques, l'étude chimiotaxonomique et l'analyse moléculaire).
- ✓ Identifier les antibiotiques produites par la souche SRC₃.

Références bibliographiques

A

Antony J. (2003). Design of Experiments for Engineers and scientists. Edition: Butterworth-Heinemann. Grande bruta 149p.

Aharonowitz Y, Demain A L. (1978). Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob. Agen. Chemother.* **14**: 159-164p.

Aharonowitz Y. (1980). Nitrogen metabolite regulation of antibiotic biosynthesis. *Annu. Rev. Microbiol.* **34**: 209-233p.

Aoyagi T, Yagisawa , Kumegai M , Hamada M , Okami Y , Takeuchi T.(2006). An enzyme inhibitor, Panostalin produced by *Streptomyces*. *J. Antibiot.* **24** : 860-869p.

Asanza-Teruel M L , Gontier E, Bienaime C, Nava-Saucedo J E. and Barbotin J N. (1997). Response surface analysis of chlortetracycline and tetracycline production with Kcarrageenan immobilized *Streptomyces aureofaciens*. *Enzyme Microb. Technol.* **21**: 314-320p.

B

Badji B, Riba A , Mathieu F, Lebrihi , et Sabaou N. (2005). Antifungal activity of saharan *Actinomadura* strain against various pathogenic and toxigenic fungi. *J.Mycol Med.* **15**: 211-219p.

Bakour L . (2006). Caractérisation chimique de nouvelles mutatumicynes synthétisées par *Saccharothrix* SA103 et influence des sources de carbone et d'azote sur la production .Mémoire de magistère, université A. Mira de Bejaia

Balagurunatha R, Radhakrishnon M, Somasundarom S T. (2010). L-glutaminase Producing Actinomycetes from marine sediments-selective isolation, semi quantitative assay and characterization of potential strain. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences.* **4**: 698-705p.

Références bibliographiques

Baoxin Z, Xiangjing W et Wensheng X. (2011). Optimization of fermentation medium for enhanced production of streptomycin by a mutant of *Streptomyces bingchenggensis* BC-X-1 using response surface methodology. *African Journal of Biotechnology*. **10** : 7225-7235p.

Bastide A , de Méo M , Andriantsoa M, Laget M, and Duménil G. (1986). Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques de structure non-polyéniques. *Mircen. Journal*, **2** : 453-466p.

Benoit D, Tourbier Y, Germain S. (1994). « Plans d'expériences, construction et analyse ». Technique et documentation. Edition LAVOISIER, Paris.

Bérédy J. (2005). Bioactive microbial métabolites. *J. Antibiot.*, **58**, 1-26p.

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.

Box G E P, Hunter W G, Hunter J S. (1978). «Statistics for experimenters ».Edition Wiley Interscience.

Buckingham J. (1997). Dictionary of natural product. Chapman and Hall/ CRC. *England CRC Press.*

C

Carle S , Pharm B .(2003). Les antifongiques dans le traitement des infections invasives. *Pharmactuel*. **36**: 25-41p.

Chater K F. (2006). *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Phil. Trans. R. Soc. B*. **361**: 761–768p.

Chun J, Youn HD, Yim YI, Lee H, kim MY, Hah YC et Kang SO. (1997). *Streptomyces seoulensis* sp. Nov. *Int. J. Syst. Bacterial*. **47**: 492-498p.

Cragg GM, Newman DJ, Whipps JM et Ousley MA. (1997). Natural product in drug discovery and developpement. *J. Nat. Prod*. **60**: 52-60p.

Références bibliographiques

D

Daboor S M, Haroon A M, Neven A E, Hanona S I. (2014). Heavy metal adsorption of *Streptomyces chromofuscus*. *J.C.L.Med.* **2**: 431-437p.

Davies J, and Mazel D. (1994). Comment la résistance vient aux bactéries. *Biofutur.* **170**: 14-17p.

Dekleva M L, Titus J A, and Strohl W R. (1985). Nutrient effects on anthracycline production by *Streptomyces peuceticus* in a defined medium. *C. J. Microbiol.* **31**: 287-294p.

Demain, A L et Martin J F. (1980). Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol Rev.* **44**:230-251p.

Demain A L. (1982). Catabolite regulation in industrial microbiology, *In: Overproduction of microbial products*, (Eds)V. Krumphanzl, B. Sikyta, Z. Vanek,*Academic Press*, New York, 3-20p.

Demain A L. (1989). Carbon source regulation of idiolite biosynthesis in actinomycetes.*In:Regulation of secondary metabolism in actinomycetes. Shapiro, S., editor BocaRaton, FL: CRC Press.* 127-134 p.

Djinni I , Defant A, Kecha M and Mancini I. (2013). Antibacterial Polyketides from the Marine Alga-Derived Endophytic *Streptomyces sundarbansensis*: A Study on Hydroxypyronone Tautomerism. *Mar. Drugs* , **11** :124-135p.

Doull J C et Vining L C. (1990). Physiology of antibiotic production in actinomyces and some control mechanisms. *Biotech Adv.* **8**:141-158p.

Références bibliographiques

Doull J L, Ayer S W, Singh A K, and Thibault P. (1993). Production of a novel polyketide antibiotic, Jadomycin B, by *Streptomyces venezuelae* following heat shock. *J.Antibiot.*, **46**: 869-871p.

E

El-sersy N A and Abou-Elela G M. (2006). Antagonistic effect of Marine *Nocardia brasiliensis* against the fish pathogen *Vibrio damsella*: Application of Plackett-Burman experimental design to evaluate factors affecting the production of the bacterial agent. *Int. J.Ocean. Oceanogr.***1**:141-150p.

Ensign J C. (1979). Formation properties and germination of actinomycetes spores. *Annus. Rev. Microbiol.* **32**: 185-219p.

Eunice JA, Prosser J I. (1983). Mycelial growth and branching of *streptomyces coelicolor* A3 (2) on solid medium. *J. gen. Microbiol.* **129**: 2029-2036p.

G

Gersch D, Roemer W, Bocker H, and Thrum H. (1978). Variations in cyclic adenosine 3',5' monophosphate and cyclic guanosine 3',5'-monophosphate in antibiotic producing strains of *Streptomyces hygroscopicus*. *Federation of European Microbiological Societies. Microbiological Letters.* **3**: 39-41p.

Goodfellow M. (1971). Numerical taxonomy of some nocardioform bacteria. *J. Gen Microbiol.* **69**: 33-90p.

Goodfellow M. and Williams S T. (1983). Ecology of actinomycetes. *Ann.Rev. Micobiol.***37**:189-216p.

Goodfellow M, Schaal KP, Zlotnik H, Sandoval H, Brown JM, Carlotti A, Collon LC, Faibra DT, Guerin V, Gvozdiak OR, kamne-Fotso MV, Kim SB, Panteix G, Tarnok II and Trujillo ME. (1993). Identification of some clinically significant actinomycetes. *Res. Microbiol.* **144**: 647-651p.

Références bibliographiques

Goodfellow M. (2012). Actinobacteria phyl. Nov. In: Whitman WB, Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Ludwig W, Suzuki Ki, Parte A (Eds). Bergey's Manual of systematic Bacteriology. Vol 5: The Actinobacteria. 2^{ème} edition, Springer, New York. P.33.*Microbiol.* **69**:33-90p.

Gonzalez R., Islas L., Obregon A M., Escalante L, and Sanchez S. (1995). Gentamicin formation in *Micromonospora purpurea* : stimulatory effect of ammonium. *J.Antibiot.*, **48** : 715-719p.

Goupy J. (1999). « Plans d'expériences pour surface de réponse ».Edition DUNOD, Paris.

Goupy J.(2005). « Pratiquer les plans d'expériences ».Edition ,DUNOD, Paris.

Gordon RE, Barnet DA, Handarhan JE, and Hor-Nay-Pan C. (1974). *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica* and nocardin strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **24**: 54-63p.

Gottlieb D. (1973). Generale consideration and implication of the *Actinomycetales*. In:*Actinomycetales* characteristics and practical importance Edited by G. Sykes and F.A. Skinner. Academic Press, London, New York.

H

Haslay C, Leclerc H. (1993). Microbiologie des eaux d'alimentation.Lavoisier TEC & DOC.France.

Hegde VR, Silver J, Patel M, Gullo VP, Yarbrough R, Huang E, Das PR., Puar M, Di Domenico BJ, and Loebenberg D.(2001). Novel fungul metabolites and cell wall active antifungals: Fermentation, isolation, physic-chemical properties, structure and biological activity. *J. Antibiot.* **54**: 74-83p.

Horinouchi S. (2002). Antimicrobial hormone, A-factor, as a master switch for morphological differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*.*Frontiers in Biosciences*.**7**: 2045-2057p.

Références bibliographiques

I

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

J

James PD, Edwards C, Dawson M. (1991). The effect of temperature, pH and growth rate on secondary metabolites in *Streptomyces thermoviolaceus* grown in Chemostat. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 1715-20p.

K

Kavitha A, Prabhakar P, Vijayalakshmi M, Venkateswarlu Y. (2009). Production of bioactive metabolites by *Nocardia levis* MKVL_113. *Lett Appl Microbiol.* **49**:484–490p.

Kitouni M, Boudemagh A, Oulmi L, Reghioia S, Boughachiche H, Zerizer H, Hamdiken H, Couble A, Mouniee D, Boulahrouf A, and Boiron P. (2005). Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north-east of Algeria. *J. Myco. Méd.* **15**: 45-51p.

Küster, E, Williams S T. (1964). Selection of media for isolation of Streptomycetes. *Nature*. **202**: 928-929p.

Kwon H C, Kauffman C A, Jensen P R. (2006). Marinomycins a-d, antitumor antibiotics of a new structure class from a marine actinomycete of the recently discovered genus *Marinospora*. *J. A. C. S.* **128**: 1622- 1632p.

L

Lacey J. (1997). Actinomycetes in composts. *Ann Agric Environ Med*, **4**: 113–121p.

Larpent JP et Sanglier JJ. (1989). Biotechnologie des Antibiotiques. Ed. Masson. Paris, 481p.

Références bibliographiques

Lebrihi A, Lamasaif D, Lefebvre G, and Germain P. (1992). Effect of ammonium ions on spiramycin biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37** : 382-387p.

Lechevalier H A, and Lechevalier M P. (1981). Introduction to the order *Actinomycetales*. In: The prokaryotes, Vol. **2** (Starr M. P., H.Stolp, H.G. Truper, A. Ballows and H. G. Schlegel. Eds.), Springer – Verlag , Berlin.1915-1922p.

Lechevalier M P.(1981). Ecological associations involving actinomycetes. *In:Actinomycetes*. Shaal, K.P. & Pulverer, G. (Eds.). *Zbl. Bakt. suppl.* **11**:159-166p.

Leclerc H, Izard D, Husson M O, Wattre P, et Jakubezak E. (1983).Microbiologie générale. Doin, Paris.40p.

Liras P, Asturias J A, and Martín J F. (1990).Phosphate control sequences involved in transcriptional regulation of antibiotic biosynthesis. *Tibtech.* **8**: 184-189p.

Locci R, and Sharples G P. (1984). Morphology. *In: “The biology of Actinomycetes”*. Goodfellow, M., Mordarski, M. & Williams, S.T. (Eds.) Academic Press, London., UK, 165-199p.

Lounès A, Lebrihi A, Benslimane C, Lefebvre G, and Germain P. (1995a). Glycerol effect on spiramycin production and valine catabolism in *Streptomycesambofaciens*. *Curr. Microbiol.* **31**: 304-311p.

Lounès A, Lebrihi A, Benslimane C, Lefebvre G, and Germain P. (1995b).Regulation of spiramycin synthesis in *Streptomyces ambofaciens*: Effect of glucose and inorganic phosphate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45** : 204-211p.

M

Marchal N, and Bourdon J L. (1973). Milieu de culture et identification biochimique des bactéries. Doin (Eds.). Paris.

Références bibliographiques

Mariat F, Sebald M. (1990). Actinomycétales..In:Le Minor. L., Véron M. Bactériologie médicale.Medecine-Sciences.Flammation.France. Deuxième partie : 933-999p.

Mariat F et Sebald M. (1990). Les actinomycètes. In : Bactériologie médicale. Le Minor L et Véron M. 2ème édition. Flammarion. Paris, 935-949p.

Maskey R P, Helmke E, Kayser O, Feibig H H, Maier A, Bushe A et al.,(2004). Anti-cancer and antibacterial trioscacarcins with high anti-malaria activity from a marine streptomycete and their absolute stereochemistry. The *Journal of Antibiotics*. **57**: 771-779p.

Martínez J L. (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic résistance déterminants. Enviromental Pollution. **157**: 2893-2902p.

Martín J F. (1977). Control of antibiotic synthesis by phosphate. *Adv. Biochem. Eng.* **6**: 105-127p.

Marwick Intyre M, Berry D R, and McNeil B. (1999). O₂ limitation response of *Penicillium chrysogenum* to oxygen starvation in glucose- and nitrogen-limited chemostatcultures. *Enzyme Microb. Technol.* **25**: 447-454p.

Mellouli L, Karray-Rebai I, Sioud S, Ben Ameer-Mehdi R, Naili B, Bejar S. (2004). Efficient transformation procedure of a newly isolated *Streptomyces* sp. TN58 strain producing antibacterial activities. *Current Microbiology* . **49**: 400-403p.

Mukhopadhyay J, Das K, Ismai I S, Koppstein D, Jang M, Hudson B, Sarafianos S, Tuske S, Patel J, Jansen R, Irschik H, Arnold E, and Ebright R H. (2008). The RNA polymerase “Switch Region” is a target for inhibitors . *Cell*. **135**: 295-307p.

N

Ningthonjam D, Sanasam S, and Nimaichand S. (2009). *Astreotomyces sindenisstain* 251-128 Exhibiting broad spectrum Antimicrobial Activity. *Researcs. J. of. Boil.Sciens.* **4(10)**: 1085- 1091p.

Références bibliographiques

O

Okanishi M, and Hotta K. (1980). Regulation of antibiotics production in microorganism. *In: Molecular breeding and genetics of applied microorganisms.* (Eds) Sakagushi, K. & Okanishi, M., *Academic Press*, New York, 9-28p.

Omura S. (1992). The search for bioactive compounds from microorganisms. Springer Verlag, New York. Inc. 281-303p.

Omura S, Iwai Y, Takahashi Y, Sadakane N, Nakagawa A, Oiwa H et al., (2006). Herbimycine, a new antibiotics produced by a strain of *Streptomyces*. *The journal of Antibiot.* **32**: 255-261p.

Omura S, Tanaka J. (1986). Biosynthesis of tylosine and its regulation by ammonium and phosphate. *In: Kleinkauf H., Von Dohren. H, Dormaner H., Nesmann G (Eds), Regulation of secondary metabolites.* *VCH Publishers Inc. Berlin.* 306-332p.

Oskay M. (2011). Effects of some Environmental Conditions on Biomass and Antimicrobial Metabolite Production by *Streptomyces sp.* KGG32. *International Journal of Agriculture and Biology.* **13(3)** : 317-324p.

Ozil P. (1997). « Plan d'expériences : Méthode de TAGUCHI ». E.N.S D'Electrochimie et d'Electrometallurgie INPG

P

Phoebe CH, Combie J, Rauert N, Galbraith W et Selitrennikoff CP. (2001). Extremophilic organisms as an unexplored source of antifungal compounds. *J Antibiot.* **54**: 56-65p.

Références bibliographiques

Piepersberg W, and Distler J. (1997). Aminoglycosides and sugar components in other secondary metabolites. In : Products of secondary metabolism, Rehn H-J & Reed G, editors. Vol. 7. Weiheim: VCH, 397-488p.

Piret J M, and Demain A L. (1988). Actinomycetes in biotechnology: an overview, *In: Actinomycetes in biotechnology.* (Eds) Goodfellow, M., Mordarski, M & Williams S.T., Academic Press, London, 461-482p.

Pridham, T.G. and Gottlieb, D.J. (1948). The utilization of carbon compounds by some Actinomycetales as an aid for species determination. *J. Bacteriol.* **56:** 107- 114p.

R

Ripa FA, Nikkon F, Zaman S, Khondkar P. (2009). Optimal Conditions for antimicrobial metabolites production from a new *Streptomyces* sp. RUPA-08PR isolated from Bangladeshi soil. *Mycobiol.*; **37 [3]:** 211-214p.

S

Saadoun I., Rawashdeh R., Dayeh T., Abadneh Q. et Mahasneh A. (2007). Isolation Characterization and Screening for Fiber Hydrolytic Enzyme-Producing Streptomyces of Jordanian Forest Soils. *Biotechnology*, **6(1):**120-128p.

Sado G, Sadou MC. (1991). Les plans d'expériences et l'expérimentation à l'assurance qualité. Edition : AFNOR Technique.

Saleem Basha N, Rekha R, Komala M, Ruby S. (2009). Production of Extracellular Antileukaemic Enzyme L-asparaginase from marine Actinomycetes by solid-state and submerged fermentation: Purification and Characterization. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research.* **8:** 353-360p.

Sanchez S, and Demain AL. (2002). Metabolic regulation of fermentation processes. *Enzyme and Microbial Technology.* **31:** 895-906p.

Références bibliographiques

Sangliers JJ, Haag TA, Huck TA, and Fehr T. (1993). Review of actinomycetes compounds 1990-1995. *Exp. Opin. Invest. Drugs.* **5**: 207-223p.

Sanglier JJ, Wellington EMH, kamoun A, Kelly C, Mercer DK, Prinzis S, and Trigo C .(1993). Novel bioactive compounds from Actinomycetes. *Res Microbiol.* **144**: 661-663p.

Sierra G. (1957). A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates.

Antonie Van. Leeuwenhoek, **23** : 15-22p.

Smaoui S. (2010). Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat en Génie de Procédés et Environnement. Université de Toulouse. France. 251p.

Solé M, Rius N, and Lorén J G. (2000). Rapid extracellular acidification induced by glucose metabolism in non-proliferating cells of *Serratia marcescens*. *Inter Microbiol* **3**: 39-43p.

Spizek J, and Tichy P. (1995). Some aspects of overproduction of secondary metabolites. *Folia Microbiol.* **40** : 43-50p.

Strub C. (2008). Modélisation et optimisation de la production de thiolutine chez *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de doctorat. Université de Toulouse. France, 52p.

Strub C. (2008). Modélisation et optimisation de la production de thiolutine chez *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de doctorat. Université de Toulouse INP-ENSAT. France.174p.

Summers A O. (2006).Genetic linkage and horizontal gene transfer, the roots of the antibioticsmulti resistance problem. *Animal Biotechnology.* **17**: 125-135p.

Suzuki K, Nagai K, Shimizu Y, and Suzuki Y. (1994).A Screening system for antiviral compounds againts Herpes simplex virus type 1 using the MTT method with L929 cells. *Tohoku J Exp Med.* **176**: 163-171p.

Références bibliographiques

T

Takahashi Y, and Omura S. (2003). Isolation of new actinomycetes strains for the screening of new bioactive compounds. *J Gen Appl Microbiol.***49**: 141-154p.

Tamara Garcia A, Adriana A, Pierre Cornelis, Marc C et Pierre S. (2013). Identification of antimicrobial resistant bacteria in rivers: Insights into the cultivation bias. *Water Reserch.***47**: 4938-4947p.

V

Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald G F, Chater K F, and Van Sinderen D. (2007). Genomics of *Actinobacteria*: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71 (3)**:495–548p.

W

Weinberg, E.D. (1973). Secondary metabolism: control by temperature and inorganic phosphate. *Dev. Ind. Microbiol.* **15**: 70-81p.

Weinberg, E.D. (1978). Secondary metabolism: regulation by phosphate and trace elements. *Folia Microbiol.*, **23**: 496-501p.

Williamson N R, Fineran C P, Leeper F j, Salmon P C. (2006). The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginin. *Nature Microbiology Review.* **Vol 4**.

Wright G D. (2007). The antibiotic resistance: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature Rev. Microbiol.* **5**: 175-186p.

X

Xu L-H, Li Q R, and Jiang C L. (1996). Diversity of soil actinomycetes in yunnan, China. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62** : 244-248p.

Y

Références bibliographiques

Yala D, Merad A S, Mohamed D, Ouar Korich M N. (2001). Classification et mode d'action des antibiotiques. *Medecine de Maghreb*. N° 91.

Yilma S, Cannon Sykora J, Samoylov A, Loc T, Liu N, Brinker C J, Neely W C, and Vodyanoy V. (2008). Large-conductance cholesterol–amphotericin Bchannels in reconstituted lipid bilayers. *Biosensors Bioelectron*. **22**: 1359–1367p.

Z

Zhihua J, Xiu C, and Peilin C. (2006). Effects of Glucose and Phosphate on Spinosad Fermentation by *Saccharopolyspora spinosa*. *Chinese J. Chem. Eng.* **14(4)**: 542- 546p.

Références bibliographiques

Annexe I

❖ **Matériel utilisé :**

- Balance
- Autoclave
- Bain marie
- Bec benzene
- Etuve à 28°C et à 37°C
- pH mètre
- Pied à coulisse électronique
- Micro pipette
- Microscope optique
- Flacons de 250 ml
- Anse de platine
- Tubes à essais

❖ **Milieux de culture utilisés**

Milieu Czapeck

NaNO ₃	3.0 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5 g
KCl	0.5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	10.0 mg
Amidon.....	10.0 g
Agar.....	18.0 g
Eau distiller	1.0 L
pH.....	7±0.2

Starch Casein Agar (SCA) (Kuster and Williams, 1964)

Amidon.....	10g
Caseine	0.3g
KNO ₃	2g
K ₂ HPO ₄	2g
NaCl.....	2g
MgSO ₄ 7H ₂ O.....	0.05g

Annexe I

CaCO ₃	0.02g
FeSO ₄ 7H ₂ O.....	0.01g
Agar.....	18g
Eau distillé.....	1000mL
pH	7.2±0.2

Milieu Gause (Ivantiskaya et al. 1978)

Amidon.....	20g
K ₂ HPO ₄	0.5g
KNO ₃	1g
MgSO ₄ 7H ₂ O.....	0.5g
Agar.....	20g
Eau distiller.....	1000mL
pH.....	7.4 ± 0.2

Mueller-Hinton(williams et Kuster, 1964).

Extrait de viande.....	3g
Hydrolysate de caséin.....	17,5g
Amidon.....	1,5g
Agar.....	16g
pH.....	7,3

Gélose nutritive (GN) :

Extrait de viande.....	1g
Extrait de levure.....	2,5 g
Peptone.....	5g
NaCl.....	5g
Agar.....	15g
pH.....	7,24
T°.....	37°C.

❖ MILIEUX D'IDENTIFICATION

1. Etude morphologique

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

1.1. Milieu ISP1

Tryptone.....	5g
Extrait de levure.....	3g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000 ml
pH.....	7,2

1.2. Milieu ISP2

Glucose.....	4 g
Extrait de levure.....	4 g
Extrait de malt.....	10 g
Eau distillée.....	1000 ml
Agar.....	20 g
pH.....	7,2.

1.3. Milieu ISP3

Farine d'avoine.....	20 g
Solution saline standard.....	1 mL
Agar.....	20 g
Eau distillée.....	1000 ml
pH.....	7,2.

Solution saline standard:

FeSO ₄ , 7H ₂ O.....	0,1 g
MnCl ₂ , 4H ₂ O.....	0,1 g
ZnSO ₄ , 7H ₂ O.....	0.1 g
Eau distillée.....	100 ml

Annexe I

1.4. Milieu ISP4

Amidon.....	10 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	1 g
NaCl.....	1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
CaCO ₃	2 g
Solution saline standard (voir ISP3).....	1 ml
Agar.....	20 g
Eau distillée.....	1000 ml
pH.....	7,2

1.5 Milieu ISP6 :

Peptone.....	15g ;
Protéose peptone.....	5g ;
Citrate du fer amoniacal.....	0.5g ;
Thiosulfate de sodium.....	0,08g ;
Extrait de levure.....	1g ;
K ₂ HPO ₄	1g ;
Agar.....	20g ;
Eau distillée.....	1000ml ;
pH.....	7.

2. Etude physiologique

2.1. Dégradation des glucides et dérivés

Milieu ISP9 (Milieu de base)

(NH ₄) ₂ SO ₄	2,64g ;
KH ₂ PO ₄	2,38g ;
K ₂ HPO ₄	5,65g ;
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	1g ;
Solution saline*.....	1 ml ;

Annexe I

Eau distillée..... 1000 ml ;
Agar..... 20g;
pH..... 6,8-7.

Solution saline:

CuSO₄, 5H₂O..... 0,64g;
FeSO₄, 7H₂O..... 0,11 g;
MnCl₂, 4H₂O..... 0,79 g;
ZnSO₄, 7H₂O..... 0.15 g;
Eau distillée..... 1000 ml.

2.2. Dégradation de la tyrosine, (Goodfellow, 1971 ; Gordon *et al.*, 1974)

0,4 g de tyrosine est suspendu dans 10 ml d'eau distillée et stérilisé. La suspension est ajoutée à 100 ml de gélose nutritive stérile pH 7,5 et maintenue en surfusion à 50°C.

La dégradation se manifeste par une auréole claire autour des colonies.

2.3. Dégradation de la gélatine (Marchal et Bourdon, 1987)

4 g de gélatine dans 100 ml de gélose nutritive. Le réactif de Frazier permet de mettre en évidence la dégradation de gélatine (auréole claire autour des colonies).

2.4. Dégradation de la caséine du lait (Gordon *et al.*, 1974)

10 g de lait en poudre écrémé sont dissous dans 100 ml d'eau distillée (pH 7,5), puis a stérilisés à l'autoclave. 100 ml d'eau distillée (pH 7,5) contenant 3,6 g d'agar sont parallèlement autoclavés. Ces deux solutions sont mélangées aseptiquement puis coulées en boîtes de Pétri stériles. L'apparition d'une auréole claire autour des colonies indique la dégradation de la caséine.

2.5. Dégradation des sels de sodium (Gordon *et al.*, 1974)

Sel de sodium (acétate, citrate, oxalate)..... 2 g,
NaCl..... 2 g ;
MgSO₄, 7H₂O..... 0,2 g ;
(NH₄)₂HPO₄..... 1 g ;
KH₂PO₄..... 0,5g ;
Agar..... 15 g ;
Eau distillée..... 1000 ml;
Solution aqueuse de rouge de phénol à 0,04%..... 20 ml,
pH..... 6,8.

Annexe I

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

2.6. Dégradation des métaux lourds :(Nutrient Agar est le milieu de base) :

le milieu NA est composé de : 28 g de NA+1000ml d'eau distillée avec un pH neutre.50mg/l de 5 métaux différent : $ZnSO_4,7H_2O$; $CuSO_4,5H_2O$; $K_2Cr_2O_7$; $Cd_3N_2O_6,4H_2O$ et $FeN_3O_9,9H_2O$.

Annexe I

Annexe II

Tableau III : Matrice des expériences de Plackett-Burman.

facteurs Nombres d'expériences	X ₁ (g/l)	X ₂ (g/l)	X ₃ (g/l)	X ₄ (g/l)	X ₅ (g/l)	X ₆	X ₇	Y(mm)
C ₁	14	0,7	0,6	5	0,7	5,2	10	6,83
C ₂	6	0,7	0,6	1	0,3	9,2	10	7
C ₃	14	0,3	1,4	5	0,3	9,2	4	9,66
C ₄	6	0,3	0,6	5	0,7	9,2	4	16,2
C ₅	6	0,3	1,4	5	0,7	5,2	10	0
C ₆	14	0,3	1,4	1	0,3	5,2	10	0
C ₇	10	0,5	1	3	0,5	7,2	7	11,5
C ₈	14	0,7	0,6	5	0,3	5,2	4	8,83
C ₉	6	0,7	1,4	1	0,7	5,2	4	11,33
C ₁₀	14	0,7	1,4	1	0,7	9,2	4	13,16
C ₁₁	14	0,3	0,6	1	0,7	9,2	10	0
C ₁₂	6	0,3	0,6	1	0,3	5,2	4	10
C ₁₃	6	0,7	1,4	5	0,3	9,2	10	0

X₁ :(Amidon) ; X₂ :(KCl) ; X₃ : (K₂HPO₄) ; X₄ :(NaNO₃) ; X₅:(MgSO₄) ; X₆: pH; X₇: temps (jours).

Annexe II

Tableau IV : Matrice d'expériences pour $k = 4$ et $N = 16$.

Milieux czapeck	Z ₁	Z ₂	Z ₃	Z ₄	x ₀	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	y (mm)
C1	0,3	0,6	0,3	4	+1	-1	-1	-1	-1	11
C2	0,7	0,6	0,3	4	+1	+1	-1	-1	-1	12,18
C3	0,3	1,4	0,3	4	+1	-1	+1	-1	-1	13,86
C4	0,7	1,4	0,3	4	+1	+1	+1	-1	-1	7,65
C5	0,3	0,6	0,7	4	+1	-1	-1	+1	-1	0
C6	0,7	0,6	0,7	4	+1	+1	-1	+1	-1	8,25
C7	0,3	1,4	0,7	4	+1	-1	+1	+1	-1	12,92
C8	0,7	1,4	0,7	4	+1	+1	+1	+1	-1	17,46
C9	0,3	0,6	0,3	10	+1	-1	-1	-1	+1	10,1
C10	0,7	0,6	0,3	10	+1	+1	-1	-1	+1	7,41
C11	0,3	1,4	0,3	10	+1	-1	+1	-1	+1	9,62
C12	0,7	1,4	0,3	10	+1	+1	+1	-1	+1	8,94
C13	0,3	0,6	0,7	10	+1	-1	-1	+1	+1	10,24
C14	0,7	0,6	0,7	10	+1	+1	-1	+1	+1	11,68
C15	0,3	1,4	0,7	10	+1	-1	+1	+1	+1	9,67
C16	0,7	1,4	0,7	10	+1	+1	+1	+1	+1	10,47

X₀ : variable fictive, X₁ : KCl, X₂ :K₂HPO₄, X₃ :MgSO₄,X₄: temps d'incubation.

Annexe III

Tableau XV : Caractères morphologique de la souche SRC₃ au 3^{ème}, 7^{ème}, 14^{ème}, 21^{ème} jours de croissance sur les différents milieux ISP à 28°C.

Milieux	ISP ₁	ISP ₂	ISP ₃	ISP ₄	ISP ₆
3 ^{ème} jour					
7 ^{ème} jour					
14 ^{ème} jour					
21 ^{ème} jour					

Annexe IV

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

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

F0.95 pour la distribution F

ν_1 ν_2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	∞
1	161	200	216	225	230	234	237	239	241	242	244	246	248	249	250	254
2	18.5	19.0	19.2	19.2	19.3	19.3	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.5	19.4	19.5
3	10.1	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.74	8.7	8.66	8.64	8.62	8.53
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.0	5.96	5.91	5.86	5.80	5.77	5.75	5.63
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.68	4.62	4.56	4.53	4.50	4.37
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.00	3.94	3.87	3.84	3.81	3.67
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.57	3.51	3.44	3.41	3.38	3.23
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.28	3.22	3.15	3.12	3.08	2.93
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.07	3.01	2.94	2.90	2.86	2.71
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.91	2.85	2.77	2.74	2.70	2.54
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.79	2.72	2.65	2.61	2.57	2.40
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.8	2.75	2.69	2.62	2.54	2.51	2.47	2.30
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.60	2.53	2.46	2.42	2.38	2.21
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.7	2.65	2.60	2.53	2.46	2.39	2.35	2.31	2.13
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.48	2.40	2.33	2.29	2.25	2.07
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.42	2.35	2.28	2.24	2.19	2.01
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.38	2.31	2.23	2.19	2.15	1.96
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.34	2.27	2.19	2.15	2.11	1.92
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.31	2.23	2.16	2.11	2.07	1.88
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.28	2.20	2.12	2.08	2.04	1.84
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32	2.25	2.18	2.10	2.05	2.01	1.81
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30	2.23	2.15	2.07	2.03	1.98	1.78
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27	2.20	2.13	2.05	2.01	1.96	1.76
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25	2.18	2.11	2.03	1.98	1.94	1.73
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24	2.16	2.09	2.01	1.96	1.92	1.71
26	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27	2.22	2.15	2.07	1.99	1.95	1.9	1.69
27	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25	2.2	2.13	2.06	1.97	1.93	1.88	1.67
28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24	2.19	2.12	2.04	1.96	1.91	1.87	1.65
29	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22	2.18	2.10	2.03	1.94	1.90	1.85	1.64
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.09	2.01	1.93	1.89	1.84	1.62
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08	2.00	1.92	1.84	1.79	1.74	1.51
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04	1.99	1.92	1.84	1.75	1.70	1.65	1.39
120	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.18	2.09	2.02	1.96	1.91	1.83	1.75	1.66	1.61	1.55	1.25
∞	3.84	3.00	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.88	1.83	1.75	1.67	1.57	1.52	1.46	1.0

ν_1 degrés de liberté au numérateur

ν_2 degrés de liberté au dénominateur

Annexe IV

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

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

Annexe IV

Résumé

L'objectif de cette étude est l'optimisation de la production d'antibiotiques par une souche d'actinomycète isolée à partir d'un échantillon de sédiment de rivière, de la Wilaya de Jijel (Ziama Mensouria). La mise en évidence de son activité antimicrobienne sur trois milieux de culture, effectuée par la méthode des cylindre d'agar, a permis la sélection du milieu Czapeck comme étant le meilleur pour la production d'antibiotiques.

Le plan de Plackett-Burman est appliqué, et trois constituants du milieu : KCl, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ et le temps d'incubation sont sélectionnés pour leurs effets significatifs sur la production d'antibiotiques. Le plan composite centré est par la suite utilisé pour optimiser ces facteurs. Un total de 25 expériences a conduit vers la construction d'un modèle quadratique et une équation polynomiale de second ordre est générée. Les optima des constituants et la durée d'incubation sont obtenus par l'analyse du modèle et le tracé de la courbes isoréponse ; donnant les valeurs optimales des paramètres comme suit: $[KCl] = 0,1 \text{ g / L}$, $[K_2HPO_4] = 1 \text{ g / L}$, $[MgSO_4 \cdot 7H_2O] = 0,2 \text{ g / l}$, le temps d'incubation est de 9 jours, 18 heures, 14 minutes et 24 secondes

Mots-clés : Optimisation, antibiotiques, Actinomycète, Plackett-Burman, plan composite centré.

Abstract:

The aim of this study is to optimize the production of antibiotics by an actinomycetes strain isolated from a river sediment sample from the wilaya of Jijel (Ziama Mensouria). The antimicrobial activity is carried out, on three culture media using the agar cylinder method allowed the selection of Czapeck medium as the best one for this production.

The Plackett-Burman design is applied, and three media constituents: KCl, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ and the incubation time are selected for their significant effects on the production of antibiotics. The central composite design is subsequently used to optimize these factors. A total of 25 experiments were conducted towards the construction of a second-order polynomial equation. The optimum concentration of medium constituents and the incubation time are obtained by the analysis of the model and the isoreponse curve; giving the optimal parameter's values as follows: $[KCl] = 0.1 \text{ g / L}$, $[K_2HPO_4] = 1 \text{ g / L}$, $[MgSO_4 \cdot 7H_2O] = 0,2 \text{ g / l}$, the incubation time is 9 days 18 hours, 14 minutes and 24 seconds.

Key-words: Optimization, antibiotics, actinomycete, Plackett-Burman design, central composite design.