

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Biotechnologie microbienne



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

MASTER

Thème

**Optimisation de la production de la
streptazoline par la souche
Streptomyces sp. SRC3 en utilisant les
plans d'expérience**

Présenté par :

BANANOUN Saloua & KERNAF Amira

Soutenu le : 15 Juin 2016

Devant le jury composé de :

Mme YAHIAOUI Houa
Melle DJINNI Ibtissem
Mme BOUCHERBA Nawal

MAA
MCB
MCA

Présidente
Encadreur
Examinatrice

Année universitaire : 2015 / 2016

Remerciements

«Nous remercions le bon Dieu de nous avoir donné le courage d'aller au bout de nos objectifs»

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

A Mme YAHIAOUI H de nous avoir fait l'honneur de présider notre jury

A Mme BOUCHERBA N pour avoir accepté d'examiner notre mémoire

A notre promotrice Melle DJINNI Ibtissem qui a bien voulu diriger ce travail, pour ses précieux conseils. On est très honorée d'avoir pu bénéficier de vos remarques et de vos compétences.

Nos vifs remerciements s'adressent aussi à notre copromotrice Mme ARKOUB Warda qui nous a aidé et orienté pour la réalisation d'une partie de ce travail. Merci pour votre gentillesse, votre confiance et de votre générosité.

Nos remerciements vont aussi aux membres du laboratoire de microbiologie de nous avoir permis d'effectuer notre différents analyses et pour avoir mis à notre disposition le matériel et les moyens nécessaires à la réalisation de notre travail.

Nos remerciement s'adresse également à toutes les personnes qui nous a apporté d'aide, de diverses façons et à différent moments pour achever ce modeste travail.

Amira & Saloua

Dédicaces

Je dédie ce travail :

*A mes très chers parents que j'aime plus
que tous au monde et à lesquelles je dois
toute ma vie et toutes mes réussites, je
vous dis merci et que le dieu vous
protège.*

*A mes deux frères, À ma petite sœur
yasmin, auxquels je souhaite beaucoup
de réussite et tout le bonheur du monde.*

A toute ma famille et toutes mes amies

En témoignage de ma profonde affection

Saloua

Dédicaces

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

A mes parents pour leurs exprimes tout le respect et l'amour que j'ai pour eux et leurs témoigner ma reconnaissance pour tous les efforts et sacrifices qui ont entrepris à de me voir ce que je suis, je vous dis merci et que dieu vous protège;

A la mémoire de grand père Amer, que dieu le bénisse dans son vaste paradis et grande mère Zohra, que dieu la protège;

A ma chère et ma seule sœur : Lynda et son mari Fares;

A mes chères frères : Sifeddinne, Zakaria, Anis;

A mon fiancé Hicham et toute sa famille;

A mes oncles et mes tantes surtout: Abdelmalk et tous mes proches ;

A ma meilleure amie d'enfance: Soltana, Hassiba, Amel;

A mes amies: Saloua, Meriem, Wafa, Rima, Aida, Siham, Karima, Assia, Ibtissem, Asma et Warda;

A tous les étudiants, enseignants et personnels du département des Sciences Biologique;

A mes enseignants depuis le primaire jusqu'à mon cursus universitaire.

Amira

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction	1
---------------------------	----------

PARTIE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralités sur les actinomycètes	1
I.1. Le genre <i>Streptomyces</i>	2
I.2. Cycle de développement du genre <i>Streptomyces</i>	2
I.3. Importance des actinomycètes	3
I.3.1. Production de biomolécules d'intérêt thérapeutique et biotechnologique	3
I.3.2. Production de molécules d'intérêt agronomique	4
II. Production d'antibiotiques par les actinomycètes	5
II.1. La streptazoline, historique.....	5
II.2. Structure et propriétés de la streptazoline.....	5
III. Effet des paramètres culturels sur la production d'antibiotiques.....	6
III.1. Influence des sources de carbone et d'azote	6
III.2. Influence de la source minérale.....	6
III.3. Influence du pH et de la température	6
IV. Les plans d'expériences	7
IV.1. Définition	7
IV.2. La modélisation.....	7
IV.3. Plans d'expériences pour surface de réponse.....	8
IV.3.1. Plan composite centré	8
IV.3.2. Equation du modèle mathématique.....	9

PARTIE II : MATERIEL ET METHODES

I. Matériel	10
I. 1. Matériel analytique	10
I. 2. Matériel biologique	10
I. 2.1. Microorganisme étudié « Actinomycète »	10
I.2.2. Germes cibles utilisés	10
II. Méthodes	11
II. 1. Etude morphologique de la souche SRC3	11
II. 1.1. Caractères macromorphologiques	11
1.2. Caractères micro morphologiques.....	11

2. Choix du meilleur milieu de production de la streptazoline par la souche SRC3.....	11
2.1. Standardisation de l'inoculum de la souche cible	11
2.2. Mise en évidence de l'activité antagoniste.....	11
3. Etude de la cinétique de production de la streptazoline par la souche <i>Streptomyces</i> sp SRC3	12
4. Etude de la cinétique de croissance de l'isolat <i>Streptomyces</i> sp SRC3.....	12
4.1 Mesure du poids sec	12
4.2. Mesure du pH	13
5. Modélisation de la production de la streptazoline par la souche SRC3 par un plan composite centré	13

PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION

I. Etude des caractères morphologiques de la souche <i>Streptomyces</i> sp. SRC3.....	15
I.1. Caractères macromorphologiques.....	15
I.2. Caractères micromorphologiques	16
II. Sélection du meilleur milieu de production de la streptazoline.....	17
III. Cinétique de production de la streptazoline par <i>Streptomyces</i> sp. SRC3.....	19
IV. Cinétique de croissance de la souche <i>Streptomyces</i> sp. SRC3	20
V. Modélisation de la production de la streptazoline par la souche SRC3 en suivant un plan composite centrée.....	21
V. 1. Caractéristiques morphologiques de l'isolat sur les différents milieux du model.....	21
V.2. Production et extraction de la streptazoline.....	22
V.3. Détermination de la concentration de la streptazoline.....	22
V.4 Modélisation de la concentration de la streptazoline	22
V.4.1 Elaboration du modèle de premier degré	23
V.4.1.1 Calcul des coefficients du modèle.....	24
V.4.1.2 Analyse statistique de l'équation de régression	24
V.4.2 Elaboration du modèle du second degré.....	25
V.4.2.1 Calcul des coefficients du modèle.....	26
V.4.2.2 Analyse statistique de l'équation de régression	27
V.4.3 Recherche de l'optimum	28
V.4.4.Tracé des iso réponses et des surfaces de réponses.....	29
Conclusion.....	35

Références bibliographiques

Annexes

Résumé Abstract

Tableau N°	Titre	page
I	Valeurs extrêmes des paramètres opératoires étudiés	13
II	Matrice des expériences pour $N = 30$	14
III	Etude macromorphologique et caractères culturels de la souche SRC3 après 21 jours d'incubation à 28°C	15
IV	Caractéristiques macromorphologiques de la souche SRC3 après 21 jours d'incubation à 28°C sur les différents milieux de Czapeck	IV
ii	Matrice des expériences pour $k = 4$ et $N (2^K) = 16$	23
VI	Valeurs des concentrations de la streptazoline au centre du domaine d'étude.	23
VII	Valeurs des coefficients de l'équation de régression b_j	24
VIII	Valeurs de t_j	25
IX	Valeurs des paramètres du plan en étoile	26
X	Valeurs des coefficients du modèle du second degré avec interactions	27
XI	Valeurs de t_j	27

N° de Figure	Titre	page
1	Cycle de développement du genre <i>Streptomyces</i>	4
2	Structure de la streptazoline	5
3	Plan composite pour l'étude de deux facteurs (k=2)	9
4	Macromorphologie de la souche SRC3 observée sur les milieux Czapeck et SCA après 21 jours d'incubation à 28°C.	16
5	Observation au microscope optique du mycélium aérien de la souche SRC3, cultivée pendant 14 jours à 28°C sur milieu Czapeck, aux grossissements: a) x10; b) x40	16
6	Activité antagoniste de l'isolat SRC3 sur trois milieux de culture différents à l'égard de quatre germes cibles.	17
7	Photographies illustrant l'activité antagoniste de l'isolat SRC3 à l'égard de (a) SARM, (b) <i>V. cholerae</i>	18
8	Cinétique de production de la streptazoline par la souche SRC3 vis-à-vis de SARM, <i>S. Typhi</i> , <i>C. albicans</i> et <i>V. cholerae</i> pendant 14 jours d'incubation à 28°C.	19
9	Suivi de la variation du poids sec de la souche SRC3 cultivée sur milieu Czapeck liquide pendant 14 jours d'incubation à 28°C.	20
10	Suivi de la variation du pH au cours de la croissance de la souche SRC3 cultivée sur milieu Czapeck liquide pendant 14 jours d'incubation à 28°C.	21
11	Surface de réponse (a) et courbe isoréponse (b) pour : $x_1 = 0$, $x_3 = 0$	30
12	Surface de réponse (a) et courbe isoréponse (b) pour : $x_1 = +1$, $x_3 = +1$	31
13	Surface de réponse (a) et courbe isoréponse (b) pour : $x_1 = -1$, $x_3 = -1$	32

ADN :	Acide Désoxyribonucléique
ATCC :	American Type Culture Collection
CCM :	Chromatographie sur couche mince
DAP:	Acide Diaminopimélique
DO :	Densité optique
HPLC:	Hight Performance Liquid Chromatography
MS :	Mycélium de substrat
MA :	Mycélium aérien
RMN :	Résonnance Magnétique Nucléaire
PS :	Poids sec
SCA :	Starch-Casein-Agar
SM :	Spectrométrie de masse
UFC/mL :	Unité Formant Colonie par Millilitre

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction	1
--------------------	---

PARTIE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralités sur les actinomycètes	2
I.1. Le genre Streptomyces	3
I.2. Cycle de développement du genre Streptomyces	3
I.3. Importance des actinomycètes	4
I.3.1. Production de biomolécules d'intérêt thérapeutique et biotechnologique	4
I.3.2. Production de molécules d'intérêt agronomique	4
II. Production d'antibiotiques par les actinomycètes	5
II.1. La streptazoline: historique	5
II.2. Structure et propriétés de la streptazoline	5
III. Effet des paramètres culturels sur la production d'antibiotiques	6
III.1. Influence des sources de carbone et d'azote	6
III.2. Influence de la source minérale	6
III.3. Influence du pH et de la température	6
IV. Les plans d'expériences	7
IV.1. Définition	7
IV.2. Modélisation	7
IV.3. Plans d'expériences pour surface de réponse	8
IV.3.1. Plan composite centré.....	8
IV.3.2. Equation du modèle mathématique.....	9

PARTIE II : MATERIEL ET METHODES

I. Matériel	10
I. 1. Matériel analytique	10
I. 2. Matériel biologique	10
I. 2.1. Microorganisme étudié « Actinomycète »	10
I.2.2. Germes cibles utilisés	10
II. Méthodes	11
II. 1. Etude morphologique de la souche SRC3	11
II. 1.1. Caractères macromorphologiques	11
1.2. Caractères micro-morphologiques	11

2. Choix du meilleur milieu de production de la streptazoline par la souche SRC3	11
2.1. Standardisation de l'inoculum des germes cibles	11
2.2. Mise en évidence de l'activité antagoniste	11
3. Etude de la cinétique de production de la streptazoline par la souche <i>Streptomyces</i> sp.....	12
4. Etude de la cinétique de croissance de l'isolat <i>Streptomyces</i> sp. SRC3.....	12
4.1 Mesure du poids sec	12
4.2. Mesure du pH	13
5. Modélisation de la production de la streptazoline par la souche SRC3 par un plan composite centré	13

PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION

I. Etude des caractères morphologiques de la souche SRC3	15
I.1. Caractères macromorphologiques	15
I.2. Caractères micro-morphologiques	16
II. Sélection du meilleur milieu de production de la streptazoline	17
III. Cinétique de production de la streptazoline par <i>Streptomyces</i> sp. SRC3	19
IV. Cinétique de croissance de la souche <i>Streptomyces</i> sp. SRC3.....	20
V. Modélisation de la production de la streptazoline par la souche <i>Streptomyces</i> sp. SRC3 en suivant un plans composite centré	21
V.1. Caractéristiques morphologiques de l'isolat sur les différents milieux du model statistique	21
V.2. Production et extraction de la streptazoline.....	22
V.3. Détermination de la concentration de la streptazoline.....	22
V.4. Modélisation de la concentration de la streptazoline	22
V.4.1. Elaboration du modèle du premier degré	23
V.4.1.1 Calcul des coefficients du modèle.....	24
V.4.1.2. Analyse statistique de l'équation de régression	24
V.4.2. Elaboration du modèle du second degré	26
V.4.2.1. Calcul des coefficients du modèle	26
V.4.2.2. Analyse statistique de l'équation de régression	27
V.4.3. Recherche de l'optimum	28
V.4.4.Tracé des iso réponses et des surfaces de réponses.....	29
Conclusion.....	35

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Abstract

Introduction

L'apparition de la multi-résistance bactérienne fait de la recherche et du développement de nouvelles molécules bioactives, un des défis les plus importants pour l'humanité au 21^{ème} siècle. Près d'un quart des décès dans le monde résulte de maladies infectieuses et un nombre grandissant d'infections est provoqué par des bactéries de plus en plus résistantes aux antibiotiques (Mukhopadhyay *et al.*, 2008).

Les antibiotiques naturels sont produits en majorité par des microorganismes qui sont la source de nombreuses molécules utilisées en thérapeutique humaine (pénicilline, vancomycine, streptomycine, amphotéricine B, ...etc.) (Misato *et al.*, 1982 ; Mc Manus *et al.*, 2002).

De nombreuses recherches sont orientées vers le criblage de nouvelles souches productrices d'antibiotiques à partir de nombreux habitats naturels afin de combattre les organismes résistants parfois à plusieurs antibiotiques (Valan *et al.*, 2008).

Les actinomycètes et en particulier le genre *Streptomyces* sont de grands producteurs de molécules actives. En effet, ce genre bactérien est à l'origine d'environ 70% des molécules antibiotiques utilisées en médecine et 60% des antifongiques utilisés en agriculture (Sujatha *et al.*, 2005; Smaoui, 2010). Toutefois, plusieurs travaux ont été menés pour augmenter le rendement de production de ces métabolites d'intérêt produits par le genre *Streptomyces* à travers l'étude de l'optimisation de la production des métabolites recherchés (Smaoui, 2010). Pour cela, des plans d'expérience basés sur des modèles mathématiques du premier degré (les plans de Koshal, Plackett et Burman) et du second degré (les plans composites centrés) ont été employés.

La conception des plans d'expérience est la méthode la plus efficace pour déterminer les concentrations optimales des variables choisies.

La présente étude s'inscrit dans cette optique qui s'organise autour de trois parties :

La première partie fait état des connaissances actuelles sur les actinomycètes et la streptazoline ainsi que des notions de bases liées aux plans d'expériences.

La deuxième partie de ce mémoire expose l'ensemble des méthodes expérimentales mises en œuvre dans l'étude des caractères morphologiques et antagonistes, des cinétiques de production et de croissance de la streptazoline et de la souche productrice, ainsi que de la modélisation et de l'optimisation de la production de la streptazoline par l'isolat étudié *Streptomyces* sp. SRC3 par le biais de la méthode des plans d'expériences.

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

Chapitre I
Partie
bibliographique

Dans ce chapitre, seront présentés les résultats et les discussions relatifs à l'étude de l'optimisation de la production de la streptazoline, agent antimicrobien, produit par la souche d'actinomycète *Streptomyces* sp. SRC3, à travers la description de l'élaboration d'un modèle mathématique par le biais d'un plan composite centré

D'autre part, il sera question de l'étude des caractères morphologiques de la souche SRC3 étudiée ainsi que la sélection du meilleur milieu de production de l'antibiotique produit. Par ailleurs, les cinétiques de croissance et de production de l'isolat et de la molécule produite seront détaillées.

I. Etude des caractères morphologiques de la souche SRC3

I.1. Caractères macromorphologiques

Les propriétés culturales de l'isolat SRC3 cultivé sur trois différents milieux de culture à 28°C pendant 21 jours sont présentées dans le tableau III ci-dessous.

Tableau III: Etude macromorphologique et caractères culturaux de la souche SRC3 après 21 jours d'incubation à 28°C

Milieux de culture	Couleur du mycélium aérien (MA)	Couleur du mycélium du substrat (MS)	Aspect des colonies	Production de pigments diffusibles	Croissance
Czapeck	Gris clair avec une teinte blanchâtre	Jaune clair	Colonies de taille moyenne, à aspect de craie et rugueux	—	++
SCA	Gris-crème	Jaune clair	Petites colonies d'aspect rugueux	—	+
Gausse	—	—	—	—	—

Note: ++ : Excellente croissance; + : Croissance moyenne; _ : Absence de croissance.

Les résultats démontrent que la souche SRC3 présente une excellente croissance et une sporulation abondante sur le milieu Czapeck et une croissance moyenne sur le milieu SCA avec toutefois aucun développement sur le milieu Gausse après 21 jours d'incubation à 28°C. En effet, le mycélium aérien est observé aussi bien sur milieu Czapeck que sur milieu SCA, il présente une couleur blanche accompagnée d'une teinte grise sur milieu Czapeck, alors qu'il

est de couleur gris à crème sur milieu SCA. Le mycélium du substrat par contre, est plutôt de couleur jaune claire sur les deux milieux.

La morphologie de la souche SRC3 sur les milieux Czapeck et SCA, observée à l'aide d'une loupe binoculaire est présentée dans la figure 4 ci-dessous



Figure 4: Macromorphologie de la souche SRC3 observée sur les milieux Czapeck et SCA après 21 jours d'incubation à 28°C.

I.2. Caractères micro-morphologiques

Les colonies de l'isolat SRC3 cultivées sur milieu Czapeck utilisé pour l'étude de la macromorphologie, sont directement observées sur boîte de Petri sous microscope optique et aux grossissements x10, x40 après 14 jours d'incubation à 28°C.

La figure 5 suivante illustre la micromorphologie de l'isolat observée au microscope optique aux grossissements : x10 et x40.

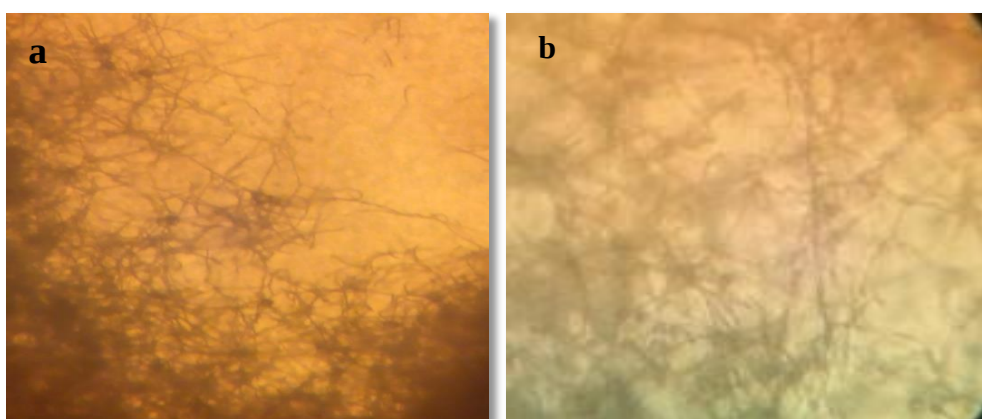


Figure 5 : Observation au microscope optique du mycélium aérien de la souche SRC3, cultivée pendant 14 jours à 28°C sur milieu Czapeck, aux grossissements: a) x10; b) x40

Les observations au microscope optique du mycélium aérien de l'isolat mettent en évidence des hyphes fins, ramifiés, non septés, présentant des chaînes de spores immobiles de forme spiralée qui se fragmentent en spores sphériques. Toutes autres structures telles que les sporanges, les synnemata, les sporophores ou encore les sclérotés sont absentes.

A la lumière des critères macro et micro morphologiques, l'isolat présente des traits typiques liés au Streptomycètes, ce qui confirme leur appartenance à ce genre actinomycétale. Toutes ces spécificités culturelles citées plus haut renvoient au genre *Streptomyces* tel qu'il est rapporté dans le *Bergey's Manuel de Bactériologie* (Bergey's, 1989).

II. Sélection du meilleur milieu de production de la streptazoline

Afin de sélectionner le milieu de culture permettant une meilleure production de l'antibiotique produit par la souche *Streptomyces* sp. SRC3 étudiée, trois milieux de culture de compositions différentes ont été utilisés : SCA, Gausse et Czapeck.

L'isolat SRC3 a été cultivé pendant 7 jours à 28°C et la mise en évidence de l'activité antagoniste a été réalisée par la méthode des cylindres d'agar à l'encontre de bactéries Gram positif, Gram négatif et une levure. Le milieu pour lequel la souche a présenté une activité antagoniste importante exprimée en termes de zones d'inhibition a été sélectionné pour la suite de notre travail.

Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 6 ci-dessous.

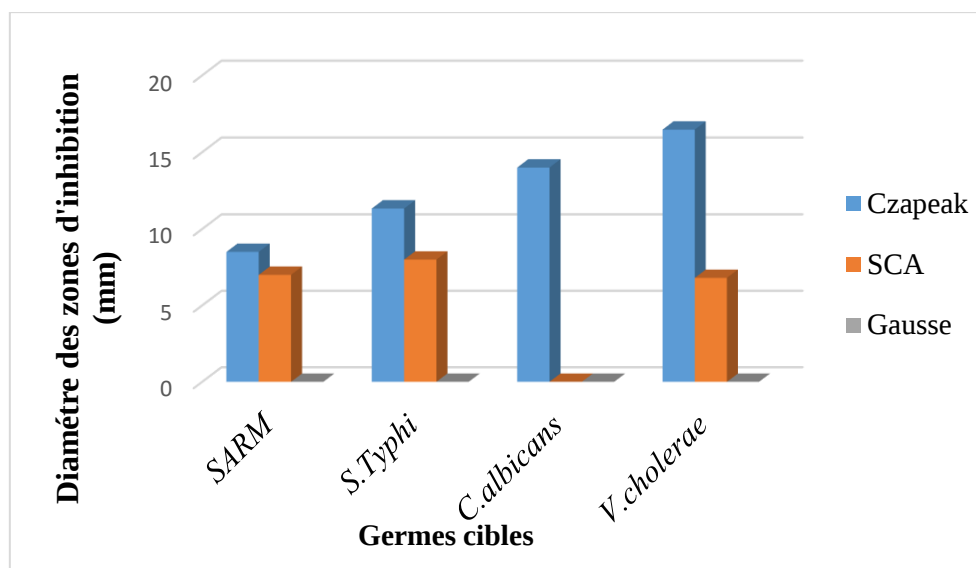


Figure 6: Activité antagoniste de l'isolat SRC3 sur trois milieux de culture différents à l'égard de quatre germes cibles.

A partir de ces résultats, il est clairement remarqué que la souche SRC3 présente des activités antimicrobiennes relativement variables aussi bien vis-à-vis de bactéries à Gram positif (SARM) qu'à Gram négatif ainsi qu'à l'encontre de la levure *C. albicans*, en fonction du milieu de culture considéré. Elle présente toutefois un meilleur antagonisme vis-à-vis des bactéries à Gram négatif. En effet, les diamètres des zones d'inhibition varient entre 16, 63 et 0 mm à l'encontre de *V. cholerae*, de 13 à 0 mm vis-à-vis de *C. albicans* et de 11,3 à 0 mm à l'égard de *S. Typhi* et seulement de 8,5 à 0 mm vis-à-vis de SARM.

D'autre part, les activités les plus importantes ont été enregistrées en utilisant le milieu Czapeck, avec des diamètres de 16,46 mm vis-à-vis de *V. cholerae*, 13 mm à l'encontre de *C. albicans*, 11,33 mm vis-à-vis de *S. Typhi* et de 8,5 mm à l'égard de SARM comparativement aux deux autres milieux de culture utilisés SCA et Gausse, et un spectre d'activité plus large en utilisant ce même milieu comme milieu de production.

Suite à ces résultats, le milieu Czapeck a été sélectionné comme meilleur milieu de production de molécules actives et à cet effet a été retenu pour la suite du travail.

La figure 7 suivante illustre quelques activités antagonistes de l'isolat SRC3 vis-à-vis de quelques germes cibles

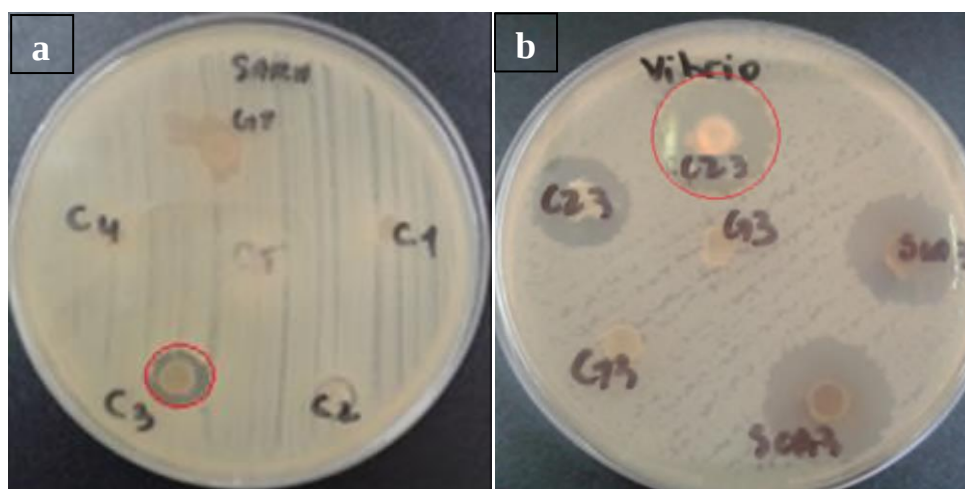


Figure 7 : Photographies illustrant l'activité antagoniste de l'isolat SRC3 à l'égard de (a) SARM, (b), *V. cholerae*.

III. Cinétique de production de la streptazoline par *Streptomyces* sp. SRC3

La cinétique de production de la substance bioactive par la souche *Streptomyces* sp. SRC3 a été suivie en culture solide, en utilisant le milieu Czapeck, par la technique des cylindres d'agar. Un cylindre est prélevé chaque 48h du 1^{er} au 14^{ème} jour d'incubation puis testé à l'encontre des germes cibles suivants: SARM, *S. Typhi*, *C. albicans* et *V. cholerae*.

Les résultats de cette cinétique sont exposés en figure 8 ci-dessous.

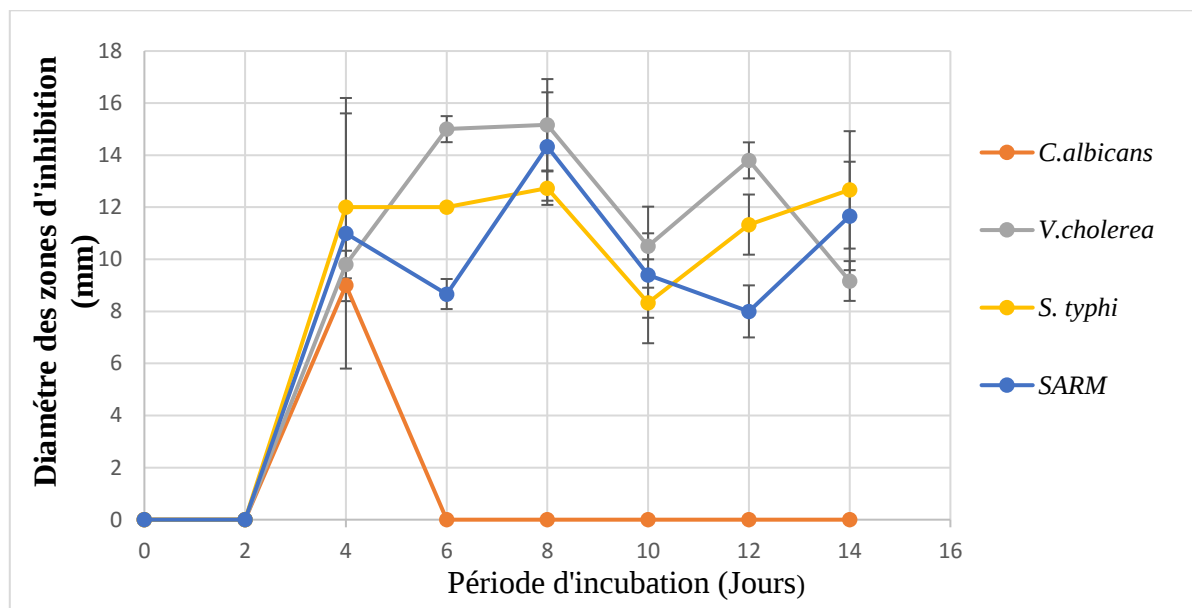


Figure 8: Cinétique de production de la streptazoline par la souche SRC3 vis-à-vis de SARM, *S. Typhi*, *C. albicans* et *V. cholerae* pendant 14 jours d'incubation à 28°C.

Le profil cinétique montre que l'activité antibactérienne de la souche SRC3 est détectée dès le 3^{ème} jour d'incubation pour la totalité des germes. Elle atteint son maximum au bout de 8 jours d'incubation à l'égard de *S. Typhi* et de SARM et également vis-à-vis de *V. cholerae*. L'activité diminue par la suite progressivement sans toutefois disparaître. Par ailleurs, l'activité antifongique à l'encontre de *C. albicans* débute avec des valeurs légèrement importantes au 4^{ème} jour d'incubation pour s'annuler au 6^{ème} jour d'incubation. Ces résultats sont en adéquation avec ceux obtenus par Sejiny (1991). En effet, il a démontré que l'activité antibactérienne des souches *Streptomyces* spp atteint des valeurs importantes à partir du 6^{ème} jour d'incubation (Sejiny, 1991).

Les résultats obtenus nous permettent de déduire que le jour optimum de production de la streptazoline par l'isolat SRC3 est le 8^{ème} jour d'incubation.

IV. Cinétique de croissance de la souche *Streptomyces* sp. SRC3

La cinétique de croissance a été suivie en culture liquide de la souche SRC3 sur milieu Czapeck pendant 14 jours. Des prélèvements quotidiens à intervalle de 48 h ont été effectués pour le suivi de la mesure du poids sec ainsi que l'évolution du pH du milieu au cours de la fermentation.

Les résultats obtenus sont présentés dans les figures 9 et 10.

- **Estimation de la variation du poids sec**

Après une incubation de 48h à 28°C, la souche SRC3 révèle une croissance rapide atteignant un poids sec de 3500 mg/L au quatrième jour d'incubation. A partir du cinquième jour apparaît une baisse du poids sec pour atteindre 200 mg/L au dixième jour d'incubation. Le poids sec augmente à 1000 mg/L au douzième jour puis diminue pour atteindre 500 mg/L au quatorzième jour (figure 9).

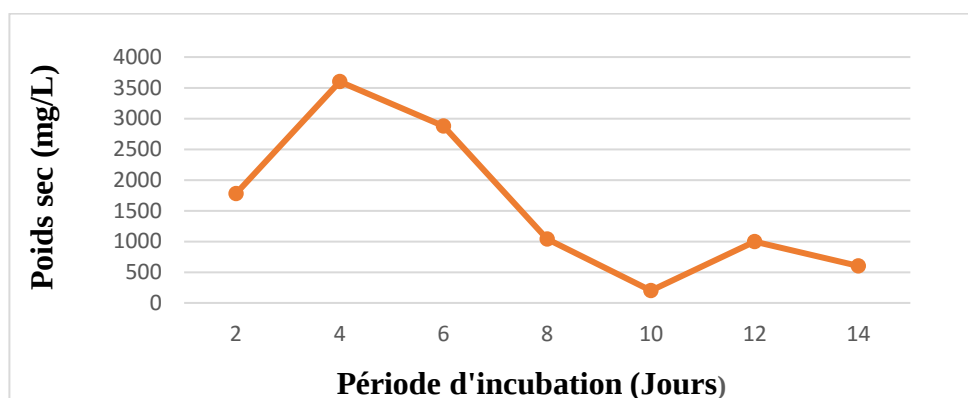


Figure 9: Suivi de la variation du poids sec de la souche SRC3 cultivée sur milieu Czapeck liquide pendant 14 jours d'incubation à 28°C.

- **Estimation de la variation du pH**

Les valeurs du pH enregistrées (figure 10) démontrent que durant les six premiers jours de croissance, une acidification progressive du milieu (7,02 – 6,61) est observée. Il s'en est suivi une remontée rapide pour atteindre une valeur de 7,50 au 8^{ème} jour d'incubation, puis diminue à nouveau à 6,36 au 10^{ème} jour, pour remonter et atteindre une valeur maximale de 7,57 au 12^{ème} jour. Au 14^{ème} jour d'incubation, la valeur du pH diminue pour revenir à sa valeur initiale de 7,04.

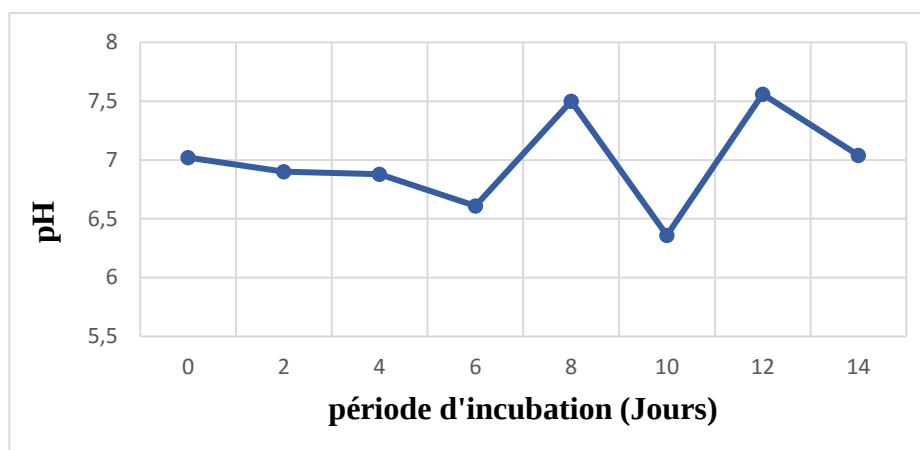


Figure 10: Suivi de la variation du pH au cours de la croissance de la souche SRC3 cultivée sur milieu Czapeck liquide pendant 14 jours d'incubation à 28°C.

D'après les résultats obtenus (figure 9 et 10), il est clairement remarqué que la phase de latence est pratiquement inexistante. Durant la phase de croissance, le poids sec augmente rapidement accompagné d'une acidification du milieu qui est peut être expliquée par une libération d'acides organiques (Boulahfrouf et *al.*, 2008).

Du 6^{ème} au 8^{ème} jour, le poids sec diminue rapidement et le pH évolue pour atteindre des valeurs légèrement basiques. Cette évolution serait due à la dégradation de sources azotées présentes dans le milieu pour libérer de l'ammonium. L'accumulation de ce dernier induit la basification du milieu d'une part, et d'autre part, par la production des métabolites secondaires qui alcalinisent le milieu comme la streptazoline. De telles constatations ont été énoncées par strub (2008).

. Du 8^{ème} au 14^{ème} jour, une succession d'abaissement et d'augmentation du pH et du poids sec est observée parallèlement ce qui pourrait être expliqué par la synthèse d'autres métabolites qui ont tendance à acidifier et à alcaliniser le milieu.

V. Modélisation de la production de la streptazoline par la souche SRC3 en utilisant un plan composite centrée

V.1. Caractéristiques morphologiques de l'isolat sur les différents milieux du model statistique

Après avoir préparé les 30 milieux de culture nécessaires à l'étude, à partir de la matrice générée par le plan d'expérience, la souche étudiée a été ensemencée sur ces derniers et ses caractères morphologiques ont été étudiés et présentés dans le tableau IV indexé en annexe III.

La souche étudiée présente des morphologies différentes en fonction des milieux de culture utilisés. En effet, nous remarquons que le mycélium aérien est de couleur gris claire avec une teinte blanchâtre sur la majorité des milieux (Cz₁₇, Cz₁₈, Cz₁₉, Cz₂₀, Cz₂₁, Cz₂₂, Cz₂₄, Cz₂₆, Cz₂₇, Cz₂₈, Cz₂₉, Cz₃₀) avec, toutefois, un début d'apparition de ce mycélium avec une couleur blanche sur les milieux Cz₁, Cz₅, Cz₇, Cz₈, Cz₉, Cz₁₀, Cz₁₁, Cz₁₃, Cz₁₅, Cz₂₃ et sur Cz₂₅. Les milieux Cz₂, Cz₃, Cz₄ et Cz₆, Cz₁₂, Cz₁₄, Cz₁₆ ont permis d'avoir des colonies dépourvues de mycélium aérien.

D'autre part, la couleur du mycélium de substrat varie entre jaune claire et beige. La croissance de l'isolat est également étudiée, elle est excellente sur pratiquement tous les milieux utilisés, à l'exception des milieux cités où le MA est absent.

V.2. Production et extraction de la streptazoline

La souche SRC3 a été cultivée en stries serrées sur les 30 milieux de culture générés par la matrice d'expérience (Tableau V présenté en annexe IV). Les boîtes de Petri ainsi ensemencées sont mises à incuber à 28 °C suivant le temps d'incubation imparti. L'extraction de la streptazoline est réalisée par macération de la gélose et du mycélium, découpés en petits morceaux, en additionnant 60 mL d'acétate d'éthyle pour chaque boîte de Petri. La macération est laissée toute une nuit à température ambiante. Les extraits bruts obtenus sont filtrés à l'aide d'un papier filtre de type Whatman et conservés à 4°C.

V.3. Détermination de la concentration de la streptazoline

La concentration de la streptazoline obtenue dans chaque extrait brut d'acétate d'éthyle est déterminée par la mesure de l'absorbance de ces extraits après calcul du coefficient d'absorption molaire (ϵ) en utilisant la loi de Beer Lambert $A = \epsilon \cdot \ell \cdot c$.

Le coefficient ϵ est déterminé à partir d'une solution de streptazoline pure à une concentration de $3,6 \cdot 10^{-3}$ les résultats obtenus sont représentés en annexe IV.

V.4. Modélisation de la concentration de la streptazoline

Les plans composites centrés se prêtent au déroulement séquentiel d'une étude. La première étape consiste à appliquer un plan factoriel complet à deux niveaux avec interactions, complétée par des points au centre du domaine de l'étude. Quand les tests de validation du modèle sont positifs, l'étude s'achève, sinon, des essais supplémentaires sont entrepris pour établir un modèle de second degré.

V.4.1. Elaboration du modèle du premier degré

Les paramètres opératoires (Z_1 , Z_2 , Z_3 , Z_4) considérés pour la modélisation de la concentration de la streptazoline produite par la souche SRC3 sont donnés dans le tableau V ci-après. Dans notre cas, le nombre N de combinaisons possibles des quatre facteurs ($k=4$) sur deux niveaux est égal à $2^4=16$.

Tableau V: Matrice des expériences pour N =16

N° d'essai	Z_1 (g/L)	Z_2 (g/L)	Z_3 (g/L)	Z_4 (jours)	x_0	x_1	x_2	x_3	x_4	[streptazoline] (mg/L)
Cz ₁	6	2	0,75	6	1	-1	-1	-1	-1	215,28
Cz ₂	14	2	0,75	6	1	+1	-1	-1	-1	229,77
Cz ₃	6	4	0,75	6	1	-1	+1	-1	-1	153,38
Cz ₄	14	4	0,75	6	1	+1	+1	-1	-1	121,92
Cz ₅	6	2	1,25	6	1	-1	-1	+1	-1	207,76
Cz ₆	14	2	1,25	6	1	+1	-1	+1	-1	225,63
Cz ₇	6	4	1,25	6	1	-1	+1	+1	-1	162,49
Cz ₈	14	4	1,25	6	1	+1	+1	+1	-1	225,63
Cz ₉	6	2	0,75	10	1	-1	-1	-1	+1	198,72
Cz ₁₀	14	2	0,75	10	1	+1	-1	-1	+1	108,26
Cz ₁₁	6	4	0,75	10	1	-1	+1	-1	+1	215,28
Cz ₁₂	14	4	0,75	10	1	+1	+1	-1	+1	207,76
Cz ₁₃	6	2	1,25	10	1	-1	-1	+1	+1	343,62
Cz ₁₄	14	2	1,25	10	1	+1	-1	+1	+1	189,61
Cz ₁₅	6	4	1,25	10	1	-1	+1	+1	+1	112,81
Cz ₁₆	14	4	1,25	10	1	+1	+1	+1	+1	90,33

Note: x_0 : variable fictive, Z_1 : amidon (g/L), Z_2 : NaNO_3 , Z_3 : $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/L), Z_4 : Temps d'incubation, Cz: milieu Czapeck agar.

La moyenne des concentrations de la streptazoline produite par la souche SRC3 sur 16 milieux de culture est :

$Y_i = 188,016$ mg/l. Le nombre (n_0) d'expériences au centre du domaine expérimental est de 6 essais. Les concentrations ainsi obtenues sont rassemblées dans le tableau VI suivant :

Tableau VI : Valeurs des concentrations de la streptazoline au centre du domaine d'étude.

N° d'expérience	y_0 (mg/L)
1	261,97
2	275,51
3	239,38
4	221,32
5	252,93
6	243,90

La moyenne des concentrations au centre du domaine est : $\bar{y}_0 = 249,17$ mg/L.

V.4.1.1 Calcul des coefficients du modèle

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

Tableau VII : Valeurs des coefficients de l'équation de régression b_j

Terme constant	Effets linéaires			
b_0	b_1	b_2	b_3	b_4
188,015	-13,151	-26,815	-6,719	-4,717

Effets d'interaction										
b_{12}	b_{13}	b_{14}	b_{23}	b_{24}	b_{34}	b_{123}	b_{124}	b_{134}	b_{234}	b_{1234}
13,362	1,217	-21,157	-20,104	0,062	-5,926	8,738	13,447	-11,031	-35,664	-2,664

V.4.1.2. Analyse statistique de l'équation de régression

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

Le test de Student permet de déterminer si parmi les coefficients du modèle, il existe des coefficients non significatifs, lesquels seront éliminés de l'équation de régression car leur influence sur la production de la streptazoline est négligeable (Katarou, 1974; Sadou et Sadou, 1991; Benoit et *al.*, 1994; Goupy, 2001). La procédure de calcul consiste à déterminer:

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

$$S_{\text{rep}}^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n_0} (y_i - \bar{y}_0)^2}{n_0 - 1} = 354,202$$

Avec :

y_i : Valeur des concentrations de la streptazoline au centre du domaine

$\bar{y}_0$: Moyenne des 6 essais au centre qui est de 249,17 mg/l

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

❖ Pour identifier les coefficients non significatifs par le test de Student, les valeurs de t_j

pour chaque coefficient sont déterminées avec : $t_j = \frac{|b_j|}{S_{bj}}$ Où

S_{bj} : écart quadratique moyen défini par : $S_{bj} = \frac{S_{rep}}{\sqrt{N}}$

On aura alors $S_{bj} = 4,705$

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

Tableau VIII : Valeurs de t_j

Terme constant	Effets linéaires			
t_0	t_1	t_2	t_3	t_4
39,960	2,795	5,699	1,428	1,002

Effets d'interaction										
t12	t13	t14	t23	t24	t34	t123	t124	t134	t234	t1234
2,840	0,259	4,497	4,273	0,013	1,259	1,857	2,858	2,344	7,580	0,566

En utilisant la table de Student relative à un test bilatéral (Annexe IV), on détermine la valeur de $t_\alpha (f)$ pour le niveau de signification $\alpha = 0,05$ et le nombre de degrés de liberté.

$f = n_0 - 1$ qui est égale à 5, soit $t_{0.05}(5) = 2,57$, d'après les résultats du tableau précédent, on remarque que les valeurs de t_3 , t_4 , t_{13} , t_{24} , t_{34} , t_{123} , t_{134} , t_{1234} sont inférieures à la valeur tabulée du test de Student (2,57) déduisant ainsi que les coefficients correspondants (b_3 , b_4 , b_{13} , b_{24} , b_{34} , b_{123} , b_{134} , b_{1234}) ne sont pas significatifs donc ils seront éliminés de l'équation de régression.

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

$$y = 188,01 - 13,15.x_1 - 26,81.x_2 + 13,36.x_1.x_2 - 21,16.x_1.x_4 - 20,10.x_2.x_3 + 13,45.x_1.x_2.x_4 - 35,66.x_2.x_3.x_4$$

✓ Test de validation de l'équation de régression

• Test de signification de la régression

Pour la signification de la régression on utilise le test de Fisher, le rapport F s'écrit comme suit:

$$F = \frac{\sum_{i=1}^N (\hat{y}_i - \bar{y})^2 / \ell - 1}{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2 / N - \ell} = 12,48$$

$$\text{Ou } \bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^N y_i}{N} = 188,01 \text{ mg/L}$$

D'après la valeur tabulée de test de Fisher, $F_{0,95}(\ell-1, N-\ell) = F_{0,95}(7, 8)$ est égale à 3,5 (Annexe V). Cette dernière étant inférieure à celle calculée, l'équation de régression peut être considérée comme adéquate et le modèle est valide à 95%.

- **Validation du modèle par le point au centre**

Dans cette étape, on compare la valeur de la réponse déterminée par le modèle au centre du domaine d'étude $\hat{y} = 188,016 \text{ mg/L}$ à la moyenne des 6 expériences au centre, soit $y_0 = 249,168 \text{ mg/L}$. L'erreur relative absolue entre ces deux valeurs (32%) étant supérieure à 5%, nous concluons alors que le modèle linéaire du premier degré choisi n'est pas valide. Nous allons donc tester un modèle du second degré.

V.4.2. Elaboration du modèle du second degré

Pour élaborer le modèle de second degré, on conserve les résultats des essais du plan factoriel complet avec interactions y compris les résultats des essais effectués au centre du domaine d'étude et on réalise les expériences complémentaires qui nécessitent le plan en étoile. Les valeurs des paramètres de ces essais complémentaires sont regroupées dans le tableau IX.

Tableau IX: Valeurs des paramètres du plan en étoile

Paramètres opératoires	Niveau $(-\alpha) = -2$	Niveau $(+\alpha) = +2$
Z_1 (g/L)	2	18
Z_2 (g/L)	1	5
Z_3 (g/L)	0,5	1,5
Z_4 (jours)	4	12

Note : Z_1 : amidon (g/L), Z_2 : NaNO_3 (g/L), Z_3 : $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/L), Z_4 : Temps d'incubation (jours).

V.4.2.1. Calcul des coefficients du modèle

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

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

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

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

Les résultats de ce calcul sont assemblés dans le tableau X ci-dessous.

Tableau X: Valeurs des coefficients du modèle du second degré

Terme constant	Effets linéaires			
b_0	b_1	b_2	b_3	b_4
249,168	-2,402	-11,839	3,720	-21,188

Effets d'interactions						Effets quadratiques			
b_{12}	b_{13}	b_{14}	b_{23}	b_{24}	b_{34}	b_{11}	b_{22}	b_{33}	b_{44}
13,362	1,217	-21,157	-20,104	0,062	-5,926	-25,769	27,509	-39,819	-0,334

V.4.2.2. Analyse statistique de l'équation de régression**✓ Vérification de la signification des coefficients**

La valeur de la variance de reproductibilité S_{rep}^2 est la même que celle calculée pour le modèle de premier degré, $S_{rep}^2 = 354,202$. Pour déterminer la variance des coefficients du modèle de second degré, il suffit de multiplier les éléments C_{jj} de la diagonale de la matrice de dispersion avec la variance de reproductibilité.

La relation est donnée comme suit: $S_{bj}^2 = C_{jj}.S_{rep}^2$

Les valeurs de t_j du test de Student sont rassemblées dans le tableau XI suivant:

Tableau XI : Valeurs de t_j

Terme constant	Effets linéaires			
t_0	t_1	t_2	t_3	t_4
32,429	0,625	3,082	0,968	5,515

Effets d'interactions						Effets quadratiques			
t_{12}	t_{13}	t_{14}	t_{23}	t_{24}	t_{34}	t_{11}	t_{22}	t_{33}	t_{44}
2,839	0,259	4,496	4,273	0,013	1,259	7,171	7,655	11,080	0,093

Pour le niveau de signification $\alpha = 0,05$ et le nombre de degrés de liberté: $f = n_0 - 1 = 5$; la valeur tabulée du test de Student $t_{0,05}(5) = 2,57$. Les valeurs de t_1 , t_3 , t_{13} , t_{24} , t_{34} , t_{44} étant inférieure à celle tabulée, les coefficients b_1 , b_3 , b_{13} , b_{24} , b_{34} et b_{44} sont non significatifs et seront éliminés de l'équation de régression.

✓ **Test de validation de l'équation de régression**

• **Test de signification de la régression:**

La valeur calculée du test de Fisher $F = 3,820$, alors que la valeur tabulée pour le niveau de signification $\alpha = 0,05$ et les nombres de degrés de liberté $f_1 (\ell - 1) = 8$ et $f_2 (N - \ell) = 21$ est de 2,42 comme F calculé est supérieur à celui tabulé alors le modèle est significatif et valide à 95%.

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

$$\hat{Y} = 249,17 - 11,84.x_2 - 21,19.x_4 + 13,36.x_1.x_2 - 21,16.x_1.x_4 - 20,10.x_2.x_3 - 25,768.x_1^2 + 27,51.x_2^2 - 39,82.x_3^2$$

V.4.3. Recherche de l'optimum

La modélisation de nos résultats par le biais d'un plan composite centré a permis d'aboutir à un modèle du second degré traduisant de manière significative l'effet de variation des différents paramètres opératoires à savoir: la concentration en amidon (x_1), la concentration en NaNO_3 (x_2), en $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (x_3) et le temps d'incubation (x_4) sur le rendement de la molécule active produite par la souche SRC3. L'étape de l'optimisation consiste à déterminer les valeurs optimales de ces facteurs qui entraînent une meilleure

production de la streptazoline. A cet effet, les courbes isoréponses et les surface de réponses sont tracées par le logiciel MATLAB 7.0 afin de localiser la région du domaine d'étude où cet optimum apparaît.

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

$$\hat{Y} = 249,17 - 11,84.x_2 - 21,19.x_4 + 13,36.x_1.x_2 - 21,16.x_1.x_4 - 20,10.x_2.x_3 - 25,768.x_1^2 + 27,51.x_2^2 - 39,82.x_3^2$$

Les optimums sont obtenus en dérivant le modèle prédictif par rapport à chacune des variables x_1 , x_2 , x_3 et x_4 . La procédure de calcul est comme suit:

$$\begin{cases} \frac{d\hat{y}}{dx_1} = -51,536x_1 + 13,362x_2 - 21,156x_4 = 0 \\ \frac{d\hat{y}}{dx_2} = -11,839 + 13,362x_1 + 55,016x_2 - 20,104x_3 = 0 \\ \frac{d\hat{y}}{dx_3} = -20x_2 - 79,636x_3 = 0 \\ \frac{d\hat{y}}{dx_4} = -21,188 - 21,156x_1 = 0 \end{cases}$$

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

$$\begin{cases} x_1 = -1 \\ x_2 = 0,42 \\ x_3 = -0,11 \\ x_4 = 2 \end{cases}$$

La concentration de la streptazoline théorique obtenue en ce point en remplaçant les variables x_1 , x_2 , x_3 et x_4 par ces valeurs dans le modèle du second degré est de 218 mg/L.

V.4.4. Tracé des isoréponses et des surfaces de réponses

L'objectif de ce travail étant d'obtenir les valeurs optimales des différents facteurs opératoires qui permettent l'obtention de la concentration de la streptazoline la plus élevée, pour ce fait 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 amenés à réaliser des coupes en fixant deux variables soit par exemple x_1 et x_3 (les variables les moins significatives) et en traçant les courbes isoréponses dans le plan $x_2 - x_4$. Ces courbes sont tracées à l'aide du logiciel MATLAB 7.0.

- Pour $x_1=0$, $x_3=0$, l'équation de régression s'écrit comme suit :

$$\hat{y} = 249,168 - 11,839 x_2 - 21,188 x_4 + 27,508 x_2^2$$

Les surfaces de réponse et les courbes isoréponses sont illustrées dans la figure 11

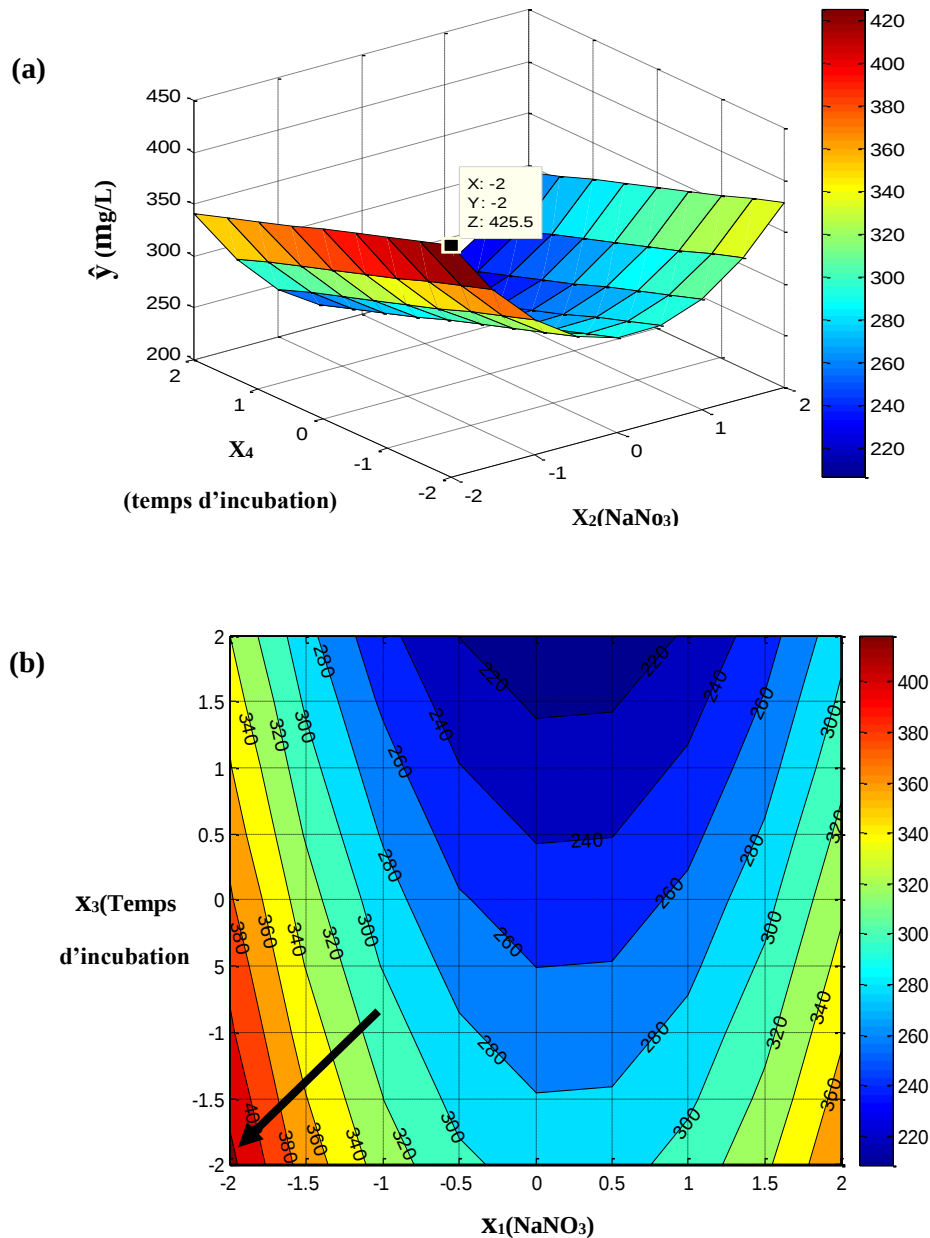


Figure 11: Surface de réponse (a) et courbe iso réponse (b) pour : $x_1 = 0$, $x_3 = 0$

L'analyse des surfaces de réponse (a) et les courbes isoréponse (b) (figure 11) montre que la production de la streptazoline augmente dans le sens de la diminution de la concentration de NaNO_3 (x_2) et du temps d'incubation (x_4) comme c'est indiqué par la flèche sur la figure (b). La surface de réponse (a) correspondante montre qu'une production de 425,5

mg/L peut être atteinte pour une concentration en $\text{NaNO}_3 = 1 \text{ g/L}$ ($x_2 = -2$) et le temps d'incubation = 4 jours ($x_4 = -2$).

- Pour $x_1 = +1$ et $x_3 = +1$ l'équation de régression est:

$$\hat{y} = 183,582 - 18,518 x_2 - 42,344 x_4 + 27,508 x_2^2$$

Les surfaces de réponse et les courbes iso réponses sont illustrées dans la figure 12

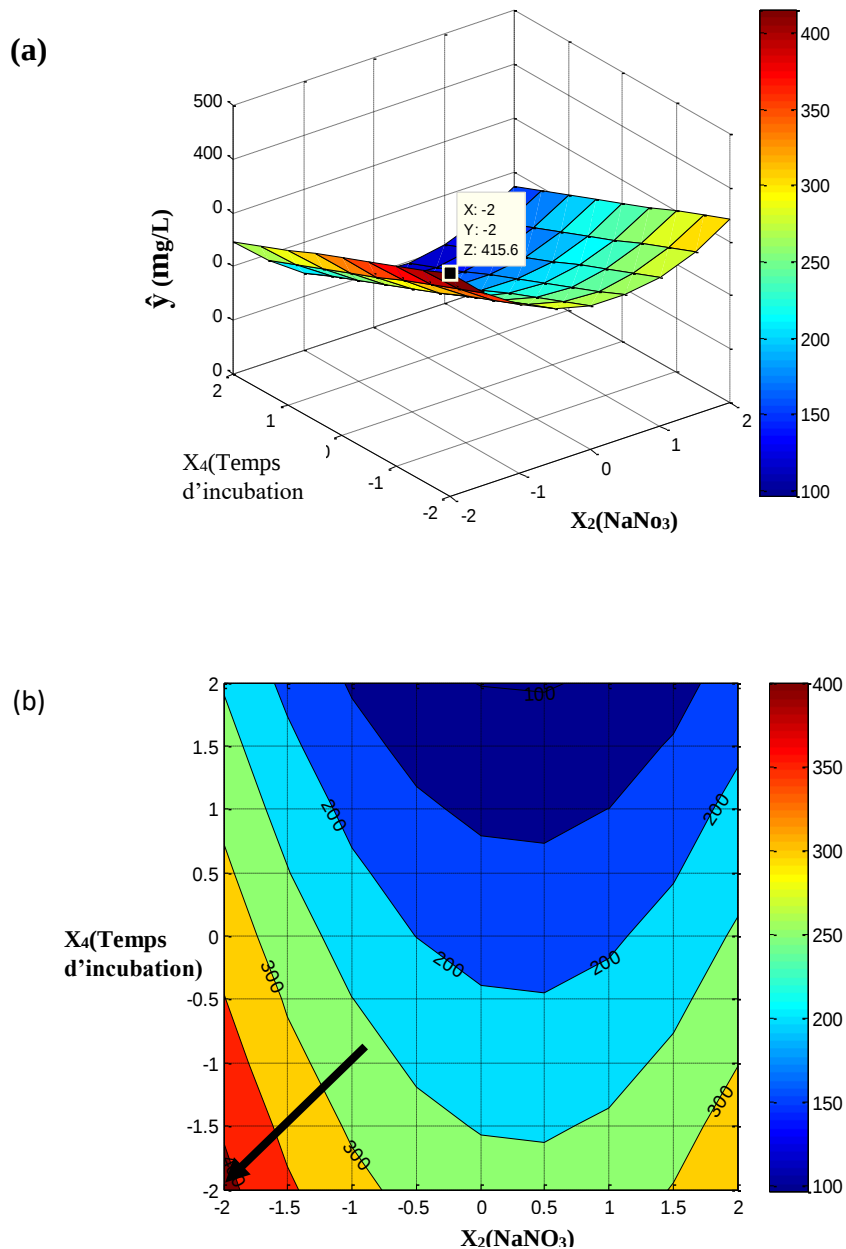


Figure12: Surface de réponse (a) et courbe iso réponse (b) pour : $x_1 = +1$, $x_3 = +1$

La surface de réponse (a) et la courbe isoréponse (b) (figure 12) obtenues pour $x_1 = +1$ (concentration en amidon de 14 g/L) et $x_3 = +1$ (concentration en MgSO_4 de 1,25 g/L) montrent que la concentration maximale de la streptazoline produite qui peut être atteinte est de 415,6 mg/L. Cet optimum est obtenu pour les mêmes conditions précédentes c'est à dire pour une concentration de $\text{NaNO}_3 = 1$ g/L ($x_2 = -2$) et un temps d'incubation de 4 jours ($x_4 = -2$).

- Pour $x_1 = -1$ et $x_3 = -1$ l'équation est

$$\hat{y} = 183,582 - 5,10 x_2 - 0,032 x_4 + 27,508 x_2^2.$$

Les surfaces de réponse et les courbes isoréponses sont présentées dans la figure 13

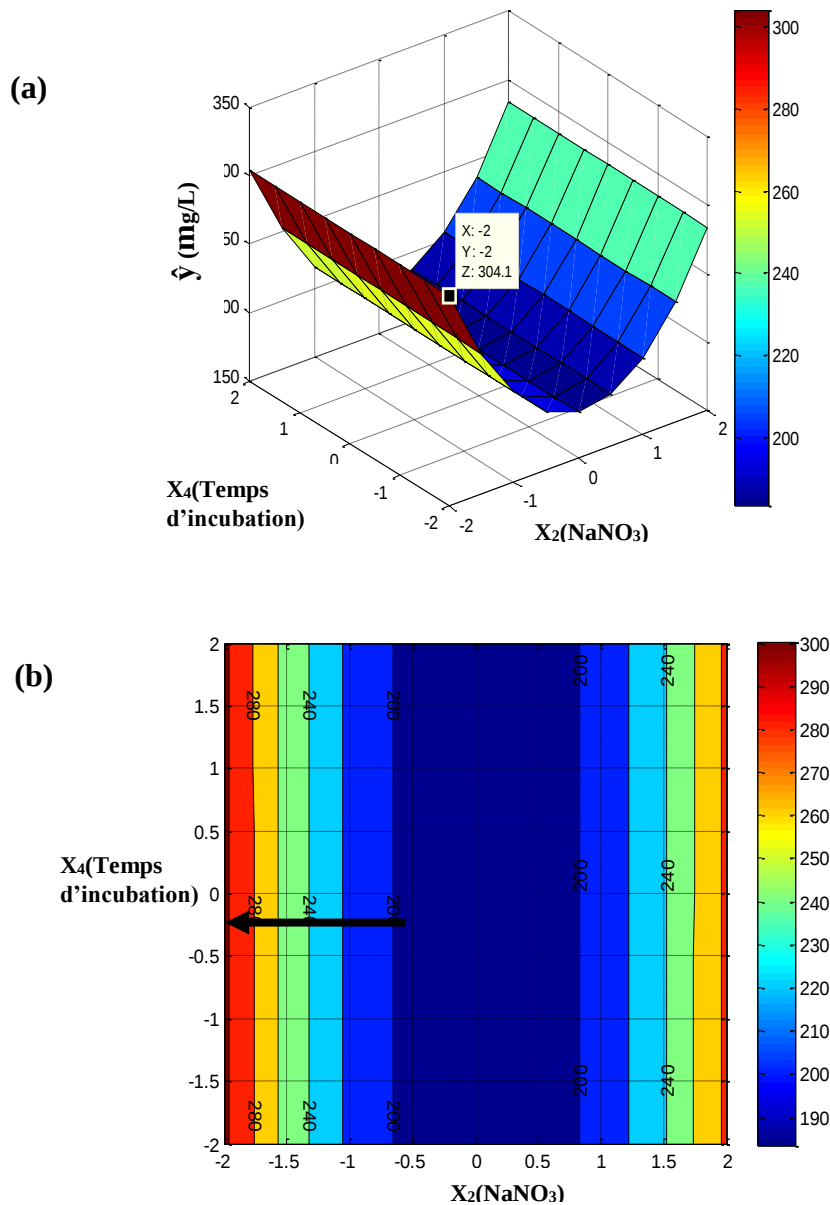


Figure13: Surface de réponse (a) et courbe iso réponse (b) pour : $x_1 = -1$, $x_3 = -1$

La figure 13 (a) et (b) montre que pour les concentrations minimales en amidon $x_1 = -1$ (6 g/L) et en MgSO_4 $x_3 = -1$ (0,75 g/L), une concentration en streptazoline produite de 304,1 mg/L peut être obtenue pour également une concentration de $\text{NaNO}_3 = 1$ g/L ($x_2 = -2$) et un temps d'incubation de 4 jours ($x_4 = -2$).

D'après les courbes tracées ci-dessus, on peut conclure que le meilleur rendement de production de la streptazoline (425 mg/L) est obtenu pour les conditions suivantes des différents paramètres opératoires :

$x_1 = 0$	—————→	[amidon] = 10 g/l
$x_2 = -2$	—————→	$\text{NaNO}_3 = 1$ g/L.
$x_3 = 0$	—————→	$\text{K}_2\text{HPO}_4 = 1$ g/L.
$x_4 = -2$	—————→	Temps d'incubation = 4 jours.

L'optimisation des conditions de culture en particulier les paramètres physiques et nutritionnels par les méthodes classiques s'avère longue, laborieuse et coûteuse en plus du fait qu'elle ignore les interactions combinées entre les différentes variables (Li *et al.*, 2009). Une étude statistique basée sur l'élaboration d'un modèle mathématique par le biais d'un plan composite centré avec interaction a été réalisée dans le but d'optimiser et d'améliorer le rendement de production de la streptazoline, molécule antimicrobienne produite par la souche *Streptomyces* sp.SRC3.

D'après le modèle du second degré développé, on note que les composantes du milieu Czapeck les plus influentes sur la production de la streptazoline sont la concentration de NaNO_3 (x_2) avec un effet de (− 11,84) et le temps d'incubation (x_4) avec un effet de (− 21,19). Leurs signes négatifs indiquent que lorsque ces derniers sont à leurs niveaux bas (1 g/L) et (4 jours) respectivement, l'influence est positive sur la production de la streptazoline et peut atteindre d'après les surfaces de réponse et les courbes isoréponse tracées, une concentration de 425,5 mg/L en fixant l'amidon (10g/L) et le K_2HPO_4 (1g/L) au centre du domaine de l'étude.

Ces résultats confirment les travaux de Spizic et Tichy (1995), qui stipulent qu'un excès en azote réprime la production des antibiotiques. Cependant, la diminution de la durée d'incubation (x_4) de sa valeur maximale (12 jours) à sa valeur minimale (4 jours) fait augmenter la production des molécules bioactives ce qui corrobore les études menées par Martin et Demain (1980), Lohr *et al.* (1989) et Seo *et al.* (2010), qui ont constaté que

plusieurs antibiotiques synthétisés par des souches de *Streptomyces* apparaissent au premier jour de culture et atteignent leur maximum au quatrième jour.

D'autre part, Lebrihi et *al* (1988) et Lounès et *al* (1995) ont démontré que la production spécifique de métabolites secondaires s'avère souvent meilleure sur une source de carbone complexe, plus difficilement métabolisable, comme les polysaccharides (amidon, dextrines) comme c'est le cas pour notre souche. Par ailleurs, Hamza et *al*, (2013) ont établi que l'utilisation de l'amidon comme source de carbone permettait d'avoir un rendement plus élevé de la molécule active étudiée produite par la souche *Streptomyces sp.* AH 11.4.

L'utilisation des plans d'expériences comme le plans composite centré dans notre étude, nous a permis la conception d'un milieu de culture avec des paramètres opératoires différents du milieu de base et ainsi optimiser le rendement de la production de la streptazoline par la souche productrice *Streptomyces sp.* SRC3 de 249mg/L à 425,5 mg/L soit de 70%.

I. Généralités sur les actinomycètes

Les actinomycètes sont des microorganismes à Gram positif caractérisés par une teneur élevée en guanine cytosine dans leur ADN (>55%) (Goodfellow et Cross, 1984 ; Sanglier et Trujillo, 1997). Le terme « actinomycètes » emprunté du grec, « aktis » (rayon) et « mykes » (champignon) explique que ces microorganismes ont d'abord été considérés comme des champignons en raison de leur capacité à former un véritable mycélium ramifié (Gottlieb et *al.*, 1973). Cependant, leurs propriétés chimiques, physiologiques et immunologiques les classent parmi les procaryotes (Williams et *al.*, 1993). Leur paroi cellulaire ne renferme ni chitine ni cellulose mais une glycoprotéine contenant de la lysine (formes fermentatives) ou de l'acide diaminopimélique (formes oxydatives) et leur cytologie est celle des bactéries (Mariat et Sebald, 1990). Ces caractères s'ajoutant à d'autres comme leur sensibilité aux antibiotiques antibactériens ne permettent pas de les classer parmi les mycètes (Hasley et Leclerc, 1993).

Les actinomycètes sont : organotrophes, hétérotrophes, aérobies strictes ou micro-aérophiles. En général, les conditions optimales pour leur croissance sont des températures comprises entre 25 et 30°C (50°C pour les thermo actinomycètes) et un pH neutre. Toutefois de nombreuses espèces ont été isolées à partir d'environnements extrêmes (Ensign et *al.*, 1993 ; Chun et *al.*, 1997 ; Watve et *al.*, 2001).

Les actinomycètes sont des microorganismes ubiquitaires que l'on rencontre sur tous les substrats naturels (Larpent et Sanglier, 1989). La grande majorité est d'origine tellurique et c'est à partir du sol que ces bactéries peuvent coloniser de nombreux biotopes (rivières, lacs, fumier, composts, sédiments marines ...etc.) (Williams et *al.*, 1983 ; Ziatlin et *al.*, 2006).

Avec les récentes éditions du manuel de taxonomie bactérienne, plusieurs formes bactériennes non mycéliennes ont été rattachées aux actinomycètes sur la base de leurs parentés phylogénétiques. Avec la version 2012 du manuel de la systématique bactérienne, les actinomycètes sont rattachés au phylum *Actinobacteria* qui comprend 5 classes, 15 ordres, 43 familles et 203 genres (Goodfellow, 2012).

I.1. Le genre *Streptomyces*

Les actinomycètes comprennent des formes peu évoluées comme le genre *Mycobacterium* ou très évoluées comme le genre *Streptomyces* qui forme un véritable mycélium non fragmenté et sporulant. Le genre *Streptomyces* est l'actinomycète le mieux étudié en termes de métabolisme de cycle de vie et de génétique du fait de l'intérêt considérable généré par ce genre bactérien pour la découverte d'antibiotiques (Subrabani et Aabersreg, 2012).

La classification est basée sur plusieurs critères : morphologique, chimique, physiologique et moléculaire. L'identification des genres est facilitée par les études morphologiques et chimiotaxonomique tandis que les critères physiologiques et moléculaires séparent les espèces. Le genre *Streptomyces* se distingue des autres genres bactériens par la présence de l'isomère de l'acide L-L-diamino-pimélique (DAP) et de la glycine dans leurs parois et la production de chaîne de spores. Il comprend de nombreuses espèces dont la classification repose sur plusieurs critères tels que la détermination de la couleur des mycélia aérien et du substrat sur différents milieux, la production de métabolites spécifiques ou la morphologie de chaînes de spores. D'autres critères peuvent être également employés comme la tolérance au chlorure de sodium, la production de molécules odorantes telles que la géosmine...etc (Dietz, 1988).

I.2. Cycle de développement du genre *Streptomyces*

Les espèces du genre *Streptomyces* ont un cycle de développement complexe qui se divise en plusieurs étapes. Sur milieu solide (Figure 1), il débute par la germination d'une spore qui donne naissance à un mycélium primaire formé d'hyphes non septés et plurinuclées, ramifié et ancré dans le milieu solide. Un mycélium aérien se développe sur ce mycélium primaire et les extrémités des hyphes aériens se spiralisent puis se cloisonnent et se différencient pour former des chaînes de spores uninuclées (Hodgson, 1992), ces spores sont des agents de dissémination (Hopwood et *al.*, 1985).

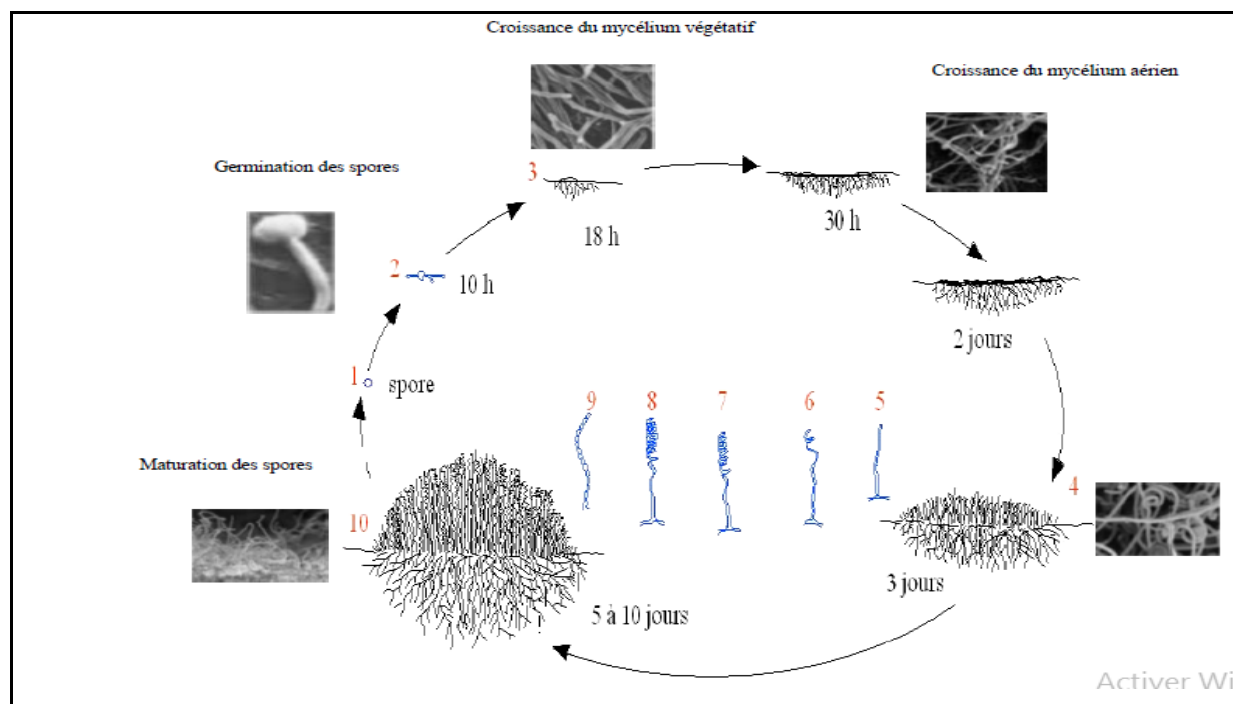


Figure 1: Cycle de développement du genre *Streptomyces* (Hopwood et *al.*, 1985)

I.3. Importance des actinomycètes

I.3.1. Production de biomolécules d'intérêt thérapeutique et biotechnologique

La différenciation morphologique des actinomycètes est accompagnée d'une différenciation métabolique. En effet, en milieu liquide et à la fin du cycle biologique, les *Streptomyces* produisent un grand nombre de métabolites secondaires possédant des structures chimiques et des activités biologiques très variées qui n'existent dans aucun autre genre bactérien. Les actinomycètes sont de remarquables producteurs d'antibiotiques en particulier le genre *Streptomyces* (Oskay et *al.*, 2004) qui à lui seul produit 80% des antibiotiques commercialisés tels que : la streptomycine, la nystatine... etc (Thakur et *al.*, 2007).

En plus de la production d'antibiotiques, les actinomycètes sont d'excellents producteurs d'enzymes telles que les transglutaminases, les xylanases et cellulases ...etc (Rawashdeh et *al.*, 2005).

I.3.2. Production de molécules d'intérêt agronomique

Les actinomycètes représentent un pourcentage élevé de la biomasse microbienne du sol. Ils ont la capacité de produire une large variété d'hydrolases extracellulaires qui leur confèrent un rôle dans la décomposition de la matière organique, des éléments minéraux et contribuent ainsi à la fertilisation des sols (Goodfellow et *al.*, 1984). Ils ont un grand pouvoir de transformer des substances organiques complexes difficilement ou non dégradables par les

autres microorganismes, tels que les polymères complexes, les polysaccharides, la chitine...etc. (Lechevalier, 1981; Goodfellow et Williams, 1983).

II. Production d'antibiotiques par les actinomycètes

II.1. La streptazoline: historique

La streptazoline est un antibiotique appartenant à la famille des alcaloïdes, elle a été isolée pour la première fois par Draut et *al.*, en 1981 à partir d'une culture de *Streptomyces viridochromogenes*. Cet antibiotique est connu pour ces activités antibactérienne et antifongique importantes in vitro vis-à-vis de pathogènes résistants (Drautz et *al.*, 1981 ;Karrer et Dobler, 1982).

II.2. Structure et propriétés de la streptazoline

La molécule de la streptazoline représentée en figure 2 possède une caractéristique structurale importante pour l'activité biologique. En effet, elle a tendance à se polymériser en solution concentrée, elle est toutefois stable dans une solution diluée à température ambiante (Drautz et *al.*, 1981). D'autre part, le squelette tricyclique avec un fragment d'uréthane présent dans sa structure est un système cyclique inhabituel rarement rencontré dans la nature et n'a été retrouvé que chez la streptazoline et ses analogues (Puder et *al.*, 2001; Nomura et Mukai 2002; Zheng et *al.*, 2012). Sa synthèse a été discutée par plusieurs auteurs notamment par Mayer et Thiericke en 1993, Kozikovski et Park, 1985, Kozikovski et Park, 1990, Nomura et Mukai, 2004

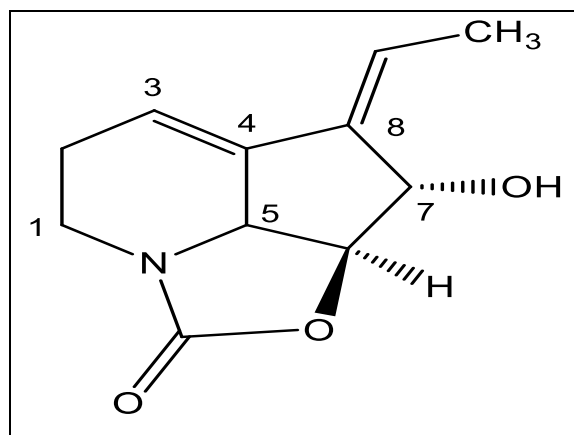


Figure 2 : Structure de la streptazoline (Perry et *al.*, 2015)

III. Effet des paramètres culturels sur la production d'antibiotiques

De nombreux facteurs peuvent affecter la production d'antibiotiques tels que les sources de carbone et d'azote, la source minérale, le pH, la température...etc.

III.1. Influence des sources de carbone et d'azote

Pour la plupart des microorganismes producteurs d'antibiotiques, une source de carbone rapidement assimilable exerce une action négative sur la biosynthèse « effet glucose » (Larpent et Larpent-Gourgaud, 1990). En effet, la production spécifique de métabolites secondaires s'avère souvent meilleure sur une source de carbone complexe, plus difficilement métabolisable comme les polysaccharides (amidon ...etc.). Cependant, le choix de la source de carbone influence fortement le métabolisme secondaire et par conséquent la production d'antibiotiques (Spizec et Tichy, 1995).

De même pour la source d'azote, selon Spizec et Tichy, (1995), elle influence le métabolisme secondaire par la répression de la production d'antibiotiques pendant l'idiophase en cas d'excès (Spizec et Tichy 1995).

L'utilisation des acides aminés comme sources d'azote, peut inhiber fortement ou améliorer la biosynthèse de certains métabolites secondaires (Ahronowitz, 1980; Martin et Demain, 1980). Cet effet négatif de certains acides aminés sur la production de molécules actives antibiotiques peut être attribué à l'ammonium produit par leur catabolisme (Untrauet *al.*, 1994; Lounès *et al.*, 1995).

III.2. Influence de la source minérale

Plusieurs oligoéléments (Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo) sont des cofacteurs de la croissance des microorganismes et sont nécessaires à des concentrations très faibles (environ 10^{-7} M). Certains jouent un rôle important quantitativement et qualitativement dans la biosynthèse des antibiotiques, tels que, le manganèse, le fer et le zinc qui sont les ions métalliques les plus importants pour la production de molécules actives (Strub, 2008).

III.3. Influence du pH et de la température

Les conditions de culture comme le pH et la température affectent de manière importante la production des métabolites secondaires (Smaoui, 2010).

En effet, d'après l'étude menée par Asanza et Ternuel en 1997, il a été démontré l'influence du pH sur la production de plusieurs métabolites secondaires. Chez *Streptomyces*

aureofaciens, le changement de pH pendant le procédé de fermentation peut induire des modifications de l'équilibre entre la production du chlorotétracycline et de la tétracycline dans le milieu de culture; un pH acide favorise la production du chlorotétracycline et un pH basique favorise plutôt la production de la tétracycline (Asanza *et al.*, 1997).

Bien que ce soit un fait établi, Sharon *et al.*, en 2014 ont rapporté que la température optimale de production de métabolites bioactifs varie entre 25 et 28°C pour les actinomycètes du genre *Streptomyces* et qu'un écart par rapport à cet intervalle influence l'efficacité de la molécule active produite.

IV. Les plans d'expériences

IV.1. Définition

Un plan d'expérience est une approche statistique permettant de maîtriser un problème à plusieurs paramètres tout en suivant un programme préconçu des différentes expériences qu'on doit effectuer. Il a pour but de minimiser le nombre d'essais pour obtenir des résultats fiables qui reflètent la variation réelle du phénomène étudié en fonction des diverses facteurs opératoires (Ozil, 1997 ; Goupy, 2006).

En général, la méthode des plans d'expériences consiste à faire varier simultanément les niveaux d'un ou de plusieurs facteurs à chaque essai. Cette méthodologie va permettre de détecter les interactions entre les facteurs et déterminer le réglage dit optimal de ces facteurs par rapport à une réponse (Vial et Jardy, 1998 ; Goupy, 1990).

IV.2. Modélisation

La modélisation est l'objet même du plan d'expérience, elle permet, une fois que les facteurs influents sont identifiés, de trouver la forme de cette influence et l'équation ou la fonction qui décrit les variations du phénomène étudié en fonction des facteurs influents (Goupy, 1999; Box *et al.*, 1978).

Toute réponse expérimentale peut être écrite sous la forme suivante :

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

Avec

Y : réponse expérimentale, Z_k : facteurs contrôlés, ε : erreur expérimentale

Où

f est une fonction inconnue (modèle théorique) des facteurs influents contrôlés ($Z_1, Z_2, \dots, Z_k$)

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

- $\hat{y}$ est l'estimé (valeur prédite par le modèle) de y (valeur expérimentale) ;
- x_j sont les coordonnées des facteurs Z_j exprimées en variables centrées réduites, ($j=1, \dots, k$) ;
- b_0 : Terme constant de l'équation de régression.
- b_j : Effets linéaires.
- b_{uj} : Effets d'interaction.
- b_{jj} : effets quadratiques.

IV.3. Plans d'expériences pour surface de réponse

Parmi les nombreux types de plans permettant de construire des surfaces de réponse, le plan composite centré est l'un d'eux. Notre choix s'est porté sur ce plan car il présente l'avantage de faciliter la construction d'une part et d'autre part, il est construit en ajoutant quelques expériences à celles utilisées pour la mise en place du plan factoriel complet à deux niveaux (Goupy, 2005).

IV.3.1. Plan composite centré

Les plans composites centrés permettent une modélisation du second degré. Ce sont des plans souvent utilisés car ils se prêtent bien au déroulement séquentiel d'une étude (Goupy, 1992). Ces plans consistent à réaliser les essais d'un plan factoriel, dont les facteurs prennent deux niveaux complétés par des expériences au centre du domaine d'étude et des essais en étoile (Ozil, 2007 ; Goupy, 2006 ; Goupy, 2005).

Le nombre total d'essais N à réaliser est:

$$N = n_f + n_\alpha + n_0$$

Avec:

- n_f essais d'un plan factoriel ;
- n_α essais de plan en étoile ;

- n_0 essais au centre.

La figure (3) présente un plan composite pour deux facteurs. Les points A, B, C et D sont les points expérimentaux d'un plan $2^{k=2}$. Le point E est le point central. Ce point peut être répliqué une ou plusieurs fois. Les points F, G, H et I sont les points axiaux forment ce que l'on appelle le plan en étoile (Ozil, 1997; Goupy, 1999).

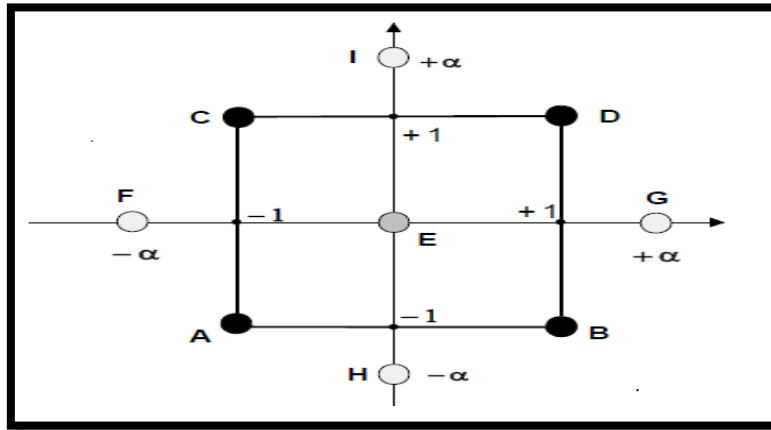


Figure 3: Plan composite pour l'étude de deux facteurs ($k=2$) (Goupy, 2005)

Le modèle mathématique construit à l'aide des plans composites est un polynôme de second degré avec interactions. On ne conserve en général que l'interaction d'ordre deux (Goupy, 1999 ; Vivier, 2002). Ainsi pour deux facteurs ($k=2$), l'équation de régression s'écrit :

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + \varepsilon \dots \dots \dots (3)$$

Chapitre II

Matériel et méthodes

I. Matériel

I. 1. Matériel analytique

Le matériel utilisé dans cette étude est résumé en annexe I

I. 2. Matériel biologique

I. 2.1. Microorganisme étudié « Actinomycète »

La souche d'actinomycète notée *Streptomyces* sp. SRC3 utilisée dans cette étude appartient à la collection du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA) de l'Université A. Mira de Bejaia. Elle a été isolée en Janvier 2015 à partir de sédiments de rivière prélevés dans la région de Ziama Mansouriah (Oued Ziama) située à mi-chemin entre les wilayas de Bejaia et Jijel en Janvier 2015. Suite à un criblage préliminaire basé sur la détermination de l'effet antagoniste vis-à-vis de microorganismes cibles, bactérien et fongique, cet isolat a été sélectionné et retenu pour la présente étude.

L'isolat SRC3 a fait objet d'une étude préalable de ces métabolites secondaires. Ces derniers ont été purifiés à l'aide de méthodes de séparation (CCM et HPLC analytiques et préparatives) et structurellement caractérisés par des techniques spectrales (spectroscopie UV-visible, infrarouges, résonance magnétique nucléaire (^1H RMN et ^{13}C RMN) et spectrométrie de masse (SM)). Les résultats obtenus ont permis d'identifier la molécule produite et l'attribuer à la famille des alcaloïdes, répondant au nom de streptazoline.

I.2.2. Germes cibles utilisés

Les microorganismes cibles utilisés dans cette étude sont présentés ci-dessous:

Bactéries à Gram positif

- ❖ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- ❖ *Staphylococcus aureus* résistant à la méthiciline (SARM) ATCC 43300.
- ❖ *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Bactérie à Gram négatif

- ❖ *Escherichia coli* ATCC 25922.
- ❖ *Salmonella typhi* ATCC 14028.
- ❖ *Vibrio cholerae* ATCC 14035.
- ❖ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Levure : *Candida albicans* ATCC 10231.

II. Méthodes

II. 1. Etude morphologique de la souche SRC3

II. 1.1. Caractères macromorphologiques

Cette étude vise à déterminer la couleur des mycéliums aérien (MA) et du substrat (MS), l'aspect général des colonies, la production ainsi que la couleur des pigments solubles produits sur trois milieux de culture différents : le milieu Starch-Casein-Agar (SCA), Czapeck et le milieu Gausse).

La composition de ces milieux est donnée en annexe II.

1.2. Caractères micro-morphologiques

Après 14 jours d'incubation à 28°C, la souche SRC3 cultivée sur milieu Czapeck a été observée à l'aide d'un microscope optique à deux grossissements (x10 et x 40).

Ces observations sont réalisées directement sur les boîtes de Pétri pour étudier les mycéliums aérien et du substrat en place sans altérer leurs structures. Elles consistent également à observer la formation de spores caractéristiques ainsi que leur agencement (Williams *et al.*, 1989).

2. Choix du meilleur milieu de production de la streptazoline par la souche SRC3

Dans le but de déterminer le meilleur milieu de production de la molécule antibiotique (streptazoline), trois milieux de culture de compositions différentes ont été utilisés à savoir les milieux : SCA (Williams et Kuster, 1964), Gausse (Ivantiskaya *et al.*, 1978) et Czapeck (Lawrence, 1956).

2.1. Standardisation de l'inoculum des germes cibles

La méthode de standardisation des germes cibles utilisée est celle des suspensions dilutions, accompagnée d'une mesure de la densité optique, à différentes longueurs d'onde suivant le germe étudié, (DO = 0,5) de la solution mère suivie par un dénombrement sur boîte. La charge de l'inoculum utilisée est de 10^7 UFC/mL (Billerbeck *et al.*, 2002).

2.2. Mise en évidence de l'activité antagoniste

L'activité antagoniste de la souche SRC3 à l'encontre de bactéries et de la levure pathogènes a été évaluée par la méthode des cylindres d'agar sur milieu Mueller Hinton (Bastide *et al.*, 1986).

Cette méthode consiste à ensemencer la souche SRC3 en stries serrées sur les trois milieux étudiés et incubé pendant 7 à 10 jours à 28°C. Après incubation, des cylindres de 6 mm de diamètres sont découpés stérilement à l'aide d'un emporte-pièce et déposés à la surface du milieu Mueller Hinton préalablement ensemencé par les germes cibles cités précédemment à raison de 10^7 UFC/mL. Les boîtes sont maintenues à 4°C pendant 2 heures afin de permettre une bonne diffusion de la substance antibiotique produite puis incubées à 37°C/24h. Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés et exprimés en millimètre à l'aide d'un pied à coulisse.

Le milieu de culture ayant permis à la souche d'actinomycète d'obtenir le plus haut pouvoir antagoniste exprimé en termes de zone d'inhibition est sélectionné comme milieu de base pour l'étude de l'optimisation de cette production.

3. Etude de la cinétique de production de la streptazoline par la souche *Streptomyces* sp. SRC3

En vue de déterminer le jour optimal de production de la streptazoline par la souche d'actinomycète étudiée SRC3, une cinétique de production a été réalisée par le biais du suivi de l'activité antagoniste, vis à vis des pathogènes cités plus haut, en utilisant la méthode des cylindres d'agar. L'isolat est ensemencé en stries serrées sur des boîtes de Pétri contenant le meilleur milieu de production préalablement sélectionné. Après incubation à 28°C, trois cylindres sont découpés et prélevés chaque 48 h à partir de chaque boîte de Pétri puis disposés sur milieu Mueller Hinton préalablement ensemencé par les germes cibles cités précédemment. Les boîtes sont entreposées à 4°C pendant 2h. Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse après 24 h d'incubation à 28°C.

4. Etude de la cinétique de croissance de l'isolat *Streptomyces* sp. SRC3

Les techniques permettant l'étude et l'estimation de la croissance bactérienne sont nombreuses. La méthode utilisée dans cette étude est celle de la mesure du poids sec.

4.1 Mesure du poids sec

Elle consiste à estimer la biomasse mycélienne chaque 48h pendant 14 jours d'incubation sur milieu liquide.

• Préparation de l'inoculum

La souche étudiée SRC3 est ensemencée en stries serrées sur milieu solide puis mise à incuber à 28°C pendant 8 jours. Après incubation, 5 cylindres d'agar sont découpés et placés dans chacun des 7 erlenmeyers de 250 mL contenant 50 mL de milieu liquide.

Les cultures ainsi préparées sont mises à incuber à 28°C sous agitation permanente à 120 tr/min. Après chaque 48h d'incubation, la biomasse mycélienne est séparée du milieu de culture par filtration, en utilisant du papier Whatman N°1. Le poids de la biomasse humide (P_0) est mesuré après filtration, la pesée est refaite après séchage à 37°C/4 à 5 jour (p_1). Ainsi, le poids sec du mycélium exprimé en mg de matière sèche est calculé comme suit :

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

4.2. Mesure du pH

Le filtrat obtenu à suite de la filtration de la biomasse mycélienne est utilisé immédiatement pour enregistrer les variations du pH au cours du temps.

5. Modélisation de la production de la streptazoline par la souche SRC3 par un plan composite centré

Les paramètres opératoires (Z_1 , Z_2 , Z_3 , Z_4) considérés pour la modélisation de la concentration de la molécule produite (streptazoline) sont respectivement : la concentration initiale en amidon, en NaNO_3 , en K_2HPO_4 et le temps d'incubation. Les valeurs extrêmes de ces derniers sont résumées dans le tableau I ci-dessous.

Tableau I: Valeurs extrêmes des paramètres opératoires étudiés

Paramètres opératoires	Niveau $(-\alpha)$	Niveau minimal (-1)	Centre	Niveau maximal $(+1)$	Niveau $(+\alpha)$
Z_1	2	6	10	14	18
Z_2	1	2	3	4	5
Z_3	0.5	0.75	1	1.25	1.5
Z_4	4	6	8	10	12

Note: Z_1 : Amidon (g/L), Z_2 : NaNO_3 (g/L), Z_3 : K_2HPO_4 (g/L), Z_4 : Le temps d'incubation (jours)

Trente milieux de culture Czapeck de compositions variables ont été préparés selon la matrice des expériences présentée dans le tableau II.

L'isolat SRC3 est ensemencé sur chaque milieu et incubée à 28°C pendant 4, 6, 8, 10 et 12 jours.

Tableau II : Matrice des expériences pour N = 30

N° d'essai	Z ₁ (g/L)	Z ₂ (g/L)	Z ₃ (g/L)	Z ₄ (jours)	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄
Cz1	6	2	0.75	6	-1	-1	-1	-1
Cz2	14	2	0.75	6	+1	-1	-1	-1
Cz3	6	4	0.75	6	-1	+1	-1	-1
Cz4	14	4	0.75	6	+1	+1	-1	-1
Cz5	6	2	1.25	6	-1	-1	+1	-1
Cz6	14	2	1.25	6	+1	-1	+1	-1
Cz7	6	4	1.25	6	-1	+1	+1	-1
Cz8	14	4	1.25	6	+1	+1	+1	-1
Cz9	6	2	0.75	10	-1	-1	-1	+1
Cz10	14	2	0.75	10	+1	-1	-1	+1
Cz11	6	4	0.75	10	-1	+1	-1	+1
Cz12	14	4	0.75	10	+1	+1	-1	+1
Cz13	6	2	1.25	10	-1	-1	+1	+1
Cz14	14	2	1.25	10	+1	-1	+1	+1
Cz15	6	4	1.25	10	-1	+1	+1	+1
Cz16	14	4	1.25	10	+1	+1	+1	+1
Cz17	10	3	1	8	0	0	0	0
Cz18	10	3	1	8	0	0	0	0
Cz19	10	3	1	8	0	0	0	0
Cz 20	10	3	1	8	0	0	0	0
Cz 21	10	3	1	8	0	0	0	0
Cz 22	10	3	1	8	0	0	0	0
Cz23	2	3	1	8	-2	0	0	0
Cz24	18	3	1	8	+2	0	0	0
Cz25	10	1	1	8	0	-2	0	0
Cz26	10	5	1	8	0	+2	0	0
Cz27	10	3	0.5	8	0	0	-2	0
Cz28	10	3	1.5	8	0	0	+2	0
Cz29	10	3	1	4	0	0	0	-2
Cz30	10	3	1	12	0	0	0	+2

Note: Z₁: Amidon (g/L), Z₂: NaNO₃ (g/L), Z₃: K₂HPO₄ (g/L), Z₄: Le temps d'incubation (jours) Cz : Milieu Czapeck agar

Chapitre III

Résultats et discussion

Dans ce chapitre, seront présentés les résultats et les discussions relatifs à l'étude de l'optimisation de la production de la streptazoline, agent antimicrobien, produit par la souche d'actinomycète *Streptomyces* sp. SRC3, à travers la description de l'élaboration d'un modèle mathématique par le biais d'un plan composite centré

D'autre part, il sera question de l'étude des caractères morphologiques de la souche SRC3 étudiée ainsi que la sélection du meilleur milieu de production de l'antibiotique produit. Par ailleurs, les cinétiques de croissance et de production de l'isolat et de la molécule produite seront détaillées.

I. Etude des caractères morphologiques de la souche SRC3

I.1. Caractères macromorphologiques

Les propriétés culturales de l'isolat SRC3 cultivé sur trois différents milieux de culture à 28°C pendant 21 jours sont présentées dans le tableau III ci-dessous.

Tableau III: Etude macromorphologique et caractères cultureux de la souche SRC3 après 21 jours d'incubation à 28°C

Milieux de culture	Couleur du mycélium aérien (MA)	Couleur du mycélium du substrat (MS)	Aspect des colonies	Production de pigments diffusibles	Croissance
Czapeck	Gris clair avec une teinte blanchâtre	Jaune clair	Colonies de taille moyenne, à aspect de craie et rugueux	—	++
SCA	Gris-crème	Jaune clair	Petites colonies d'aspect rugueux	—	+
Gausse	—	—	—	—	—

Note: ++ : Excellente croissance; + : Croissance moyenne; _ : Absence de croissance.

Les résultats démontrent que la souche SRC3 présente une excellente croissance et une sporulation abondante sur le milieu Czapeck et une croissance moyenne sur le milieu SCA avec toutefois aucun développement sur le milieu Gausse après 21 jours d'incubation à 28°C. En effet, le mycélium aérien est observé aussi bien sur milieu Czapeck que sur milieu SCA, il présente une couleur blanche accompagnée d'une teinte grise sur milieu Czapeck, alors qu'il

est de couleur gris à crème sur milieu SCA. Le mycélium du substrat par contre, est plutôt de couleur jaune claire sur les deux milieux.

La morphologie de la souche SRC3 sur les milieux Czapeck et SCA, observée à l'aide d'une loupe binoculaire est présentée dans la figure 4 ci-dessous



Figure 4: Macromorphologie de la souche SRC3 observée sur les milieux Czapeck et SCA après 21 jours d'incubation à 28°C.

I.2. Caractères micro-morphologiques

Les colonies de l'isolat SRC3 cultivées sur milieu Czapeck utilisé pour l'étude de la macromorphologie, sont directement observées sur boîte de Petri sous microscope optique et aux grossissements x10, x40 après 14 jours d'incubation à 28°C.

La figure 5 suivante illustre la micromorphologie de l'isolat observée au microscope optique aux grossissements : x10 et x40.

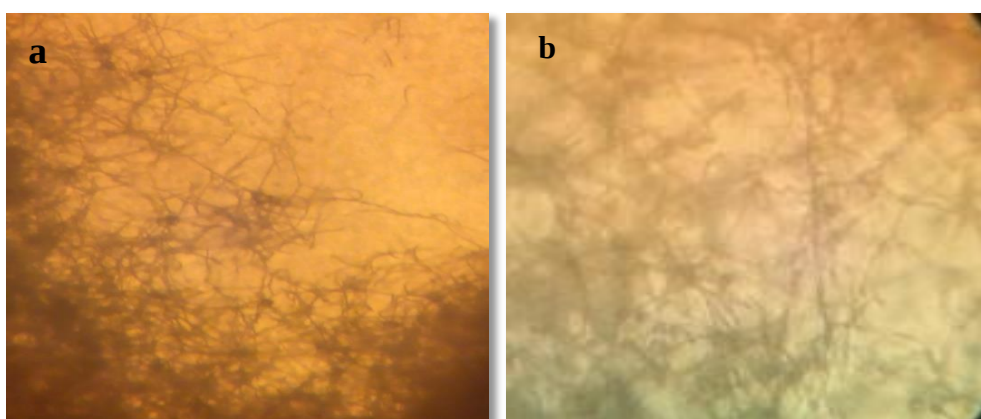


Figure 5 : Observation au microscope optique du mycélium aérien de la souche SRC3, cultivée pendant 14 jours à 28°C sur milieu Czapeck, aux grossissements: a) x10; b) x40

Les observations au microscope optique du mycélium aérien de l'isolat mettent en évidence des hyphes fins, ramifiés, non septés, présentant des chaînes de spores immobiles de forme spiralée qui se fragmentent en spores sphériques. Toutes autres structures telles que les sporanges, les synnemata, les sporophores ou encore les sclérotés sont absentes.

A la lumière des critères macro et micro morphologiques, l'isolat présente des traits typiques liés au Streptomycètes, ce qui confirme leur appartenance à ce genre actinomycétale. Toutes ces spécificités culturelles citées plus haut renvoient au genre *Streptomyces* tel qu'il est rapporté dans le *Bergey's Manuel de Bactériologie* (Bergey's, 1989).

II. Sélection du meilleur milieu de production de la streptazoline

Afin de sélectionner le milieu de culture permettant une meilleure production de l'antibiotique produit par la souche *Streptomyces* sp. SRC3 étudiée, trois milieux de culture de compositions différentes ont été utilisés : SCA, Gausse et Czapeck.

L'isolat SRC3 a été cultivé pendant 7 jours à 28°C et la mise en évidence de l'activité antagoniste a été réalisée par la méthode des cylindres d'agar à l'encontre de bactéries Gram positif, Gram négatif et une levure. Le milieu pour lequel la souche a présenté une activité antagoniste importante exprimée en termes de zones d'inhibition a été sélectionné pour la suite de notre travail.

Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 6 ci-dessous.

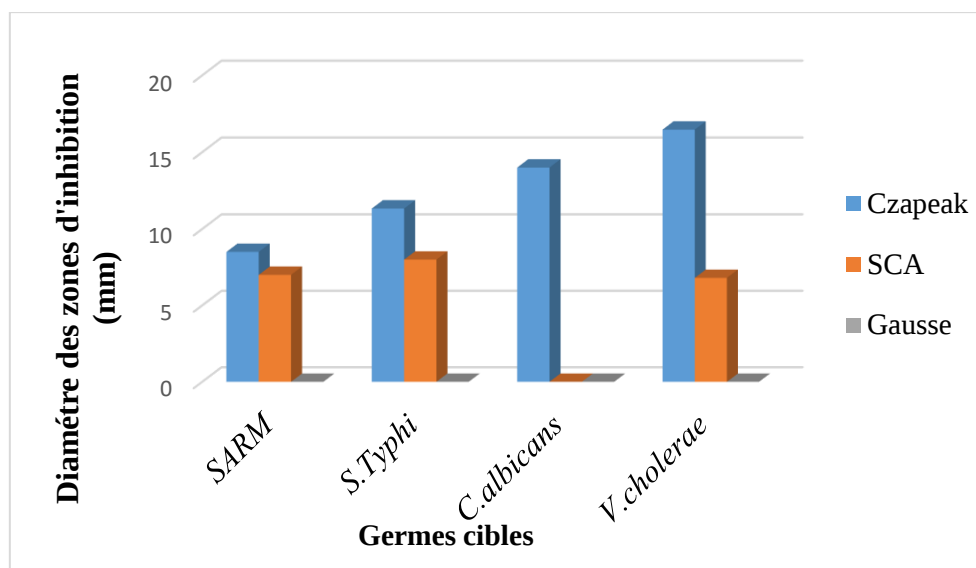


Figure 6: Activité antagoniste de l'isolat SRC3 sur trois milieux de culture différents à l'égard de quatre germes cibles.

A partir de ces résultats, il est clairement remarqué que la souche SRC3 présente des activités antimicrobiennes relativement variables aussi bien vis-à-vis de bactéries à Gram positif (SARM) qu'à Gram négatif ainsi qu'à l'encontre de la levure *C. albicans*, en fonction du milieu de culture considéré. Elle présente toutefois un meilleur antagonisme vis-à-vis des bactéries à Gram négatif. En effet, les diamètres des zones d'inhibition varient entre 16, 63 et 0 mm à l'encontre de *V. cholerae*, de 13 à 0 mm vis-à-vis de *C. albicans* et de 11,3 à 0 mm à l'égard de *S. Typhi* et seulement de 8,5 à 0 mm vis-à-vis de SARM.

D'autre part, les activités les plus importantes ont été enregistrées en utilisant le milieu Czapeck, avec des diamètres de 16,46 mm vis-à-vis de *V. cholerae*, 13 mm à l'encontre de *C. albicans*, 11,33 mm vis-à-vis de *S. Typhi* et de 8,5 mm à l'égard de SARM comparativement aux deux autres milieux de culture utilisés SCA et Gausse, et un spectre d'activité plus large en utilisant ce même milieu comme milieu de production.

Suite à ces résultats, le milieu Czapeck a été sélectionné comme meilleur milieu de production de molécules actives et à cet effet a été retenu pour la suite du travail.

La figure 7 suivante illustre quelques activités antagonistes de l'isolat SRC3 vis-à-vis de quelques germes cibles

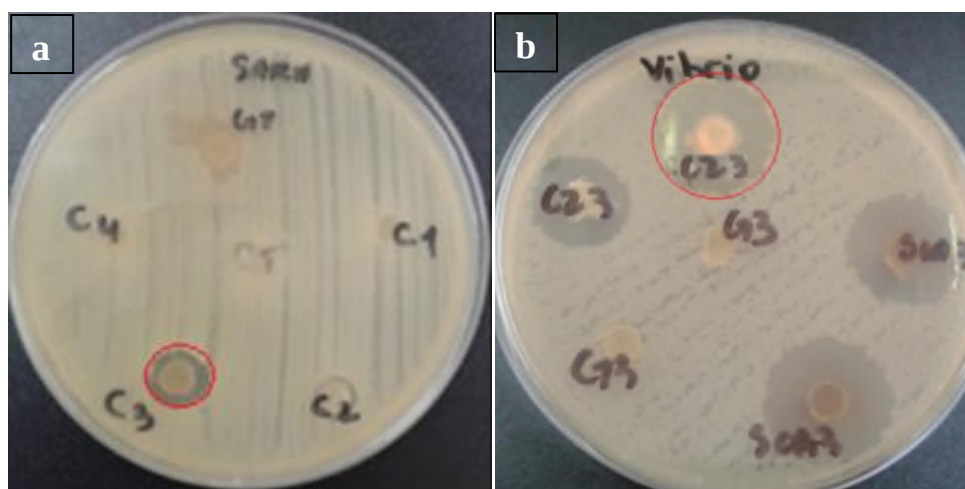


Figure 7 : Photographies illustrant l'activité antagoniste de l'isolat SRC3 à l'égard de (a) SARM, (b), *V. cholerae*.

III. Cinétique de production de la streptazoline par *Streptomyces* sp. SRC3

La cinétique de production de la substance bioactive par la souche *Streptomyces* sp. SRC3 a été suivie en culture solide, en utilisant le milieu Czapeck, par la technique des cylindres d'agar. Un cylindre est prélevé chaque 48h du 1^{er} au 14^{ème} jour d'incubation puis testé à l'encontre des germes cibles suivants: SARM, *S. Typhi*, *C. albicans* et *V. cholerae*.

Les résultats de cette cinétique sont exposés en figure 8 ci-dessous.

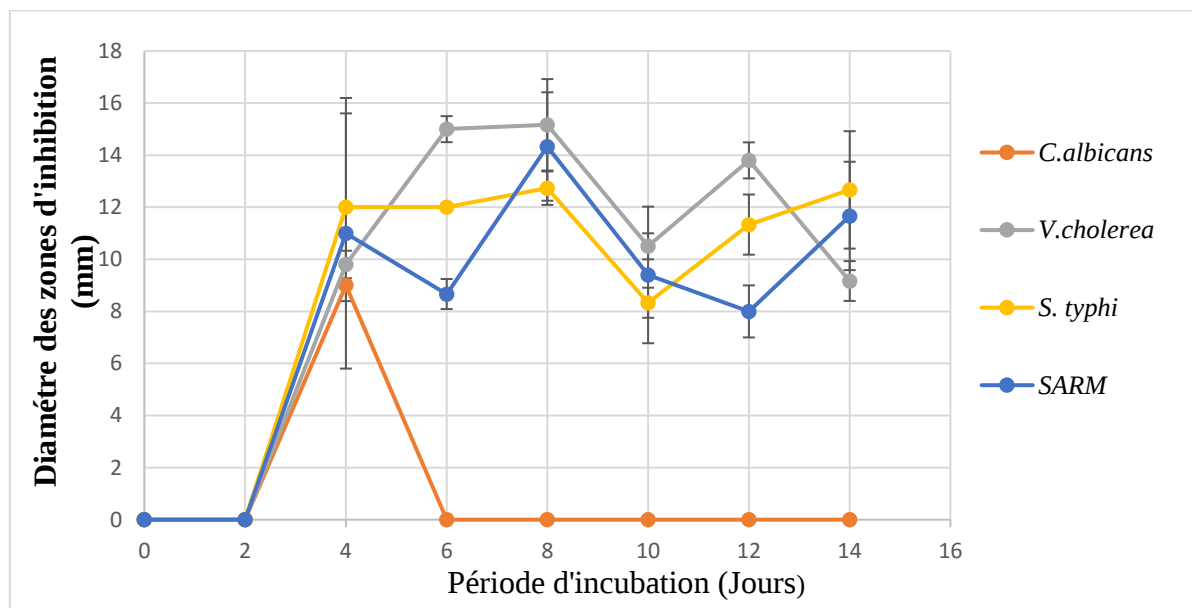


Figure 8: Cinétique de production de la streptazoline par la souche SRC3 vis-à-vis de SARM, *S. Typhi*, *C. albicans* et *V. cholerae* pendant 14 jours d'incubation à 28°C.

Le profil cinétique montre que l'activité antibactérienne de la souche SRC3 est détectée dès le 3^{ème} jour d'incubation pour la totalité des germes. Elle atteint son maximum au bout de 8 jours d'incubation à l'égard de *S. Typhi* et de SARM et également vis-à-vis de *V. cholerae*. L'activité diminue par la suite progressivement sans toutefois disparaître. Par ailleurs, l'activité antifongique à l'encontre de *C. albicans* débute avec des valeurs légèrement importantes au 4^{ème} jour d'incubation pour s'annuler au 6^{ème} jour d'incubation. Ces résultats sont en adéquation avec ceux obtenus par Sejiny (1991). En effet, il a démontré que l'activité antibactérienne des souches *Streptomyces* spp atteint des valeurs importantes à partir du 6^{ème} jour d'incubation (Sejiny, 1991).

Les résultats obtenus nous permettent de déduire que le jour optimum de production de la streptazoline par l'isolat SRC3 est le 8^{ème} jour d'incubation.

IV. Cinétique de croissance de la souche *Streptomyces* sp. SRC3

La cinétique de croissance a été suivie en culture liquide de la souche SRC3 sur milieu Czapeck pendant 14 jours. Des prélèvements quotidiens à intervalle de 48 h ont été effectués pour le suivi de la mesure du poids sec ainsi que l'évolution du pH du milieu au cours de la fermentation.

Les résultats obtenus sont présentés dans les figures 9 et 10.

- **Estimation de la variation du poids sec**

Après une incubation de 48h à 28°C, la souche SRC3 révèle une croissance rapide atteignant un poids sec de 3500 mg/L au quatrième jour d'incubation. A partir du cinquième jour apparaît une baisse du poids sec pour atteindre 200 mg/L au dixième jour d'incubation. Le poids sec augmente à 1000 mg/L au douzième jour puis diminue pour atteindre 500 mg/L au quatorzième jour (figure 9).

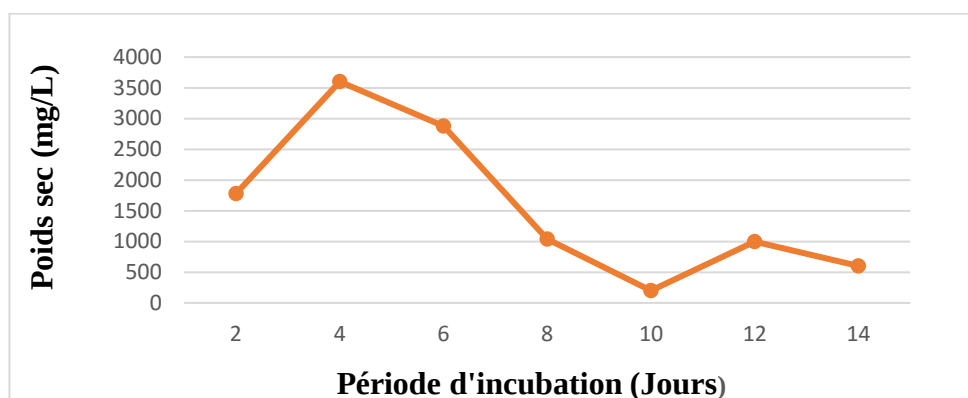


Figure 9: Suivi de la variation du poids sec de la souche SRC3 cultivée sur milieu Czapeck liquide pendant 14 jours d'incubation à 28°C.

- **Estimation de la variation du pH**

Les valeurs du pH enregistrées (figure 10) démontrent que durant les six premiers jours de croissance, une acidification progressive du milieu (7,02 – 6,61) est observée. Il s'en est suivi une remontée rapide pour atteindre une valeur de 7,50 au 8^{ème} jour d'incubation, puis diminue à nouveau à 6,36 au 10^{ème} jour, pour remonter et atteindre une valeur maximale de 7,57 au 12^{ème} jour. Au 14^{ème} jour d'incubation, la valeur du pH diminue pour revenir à sa valeur initiale de 7,04.

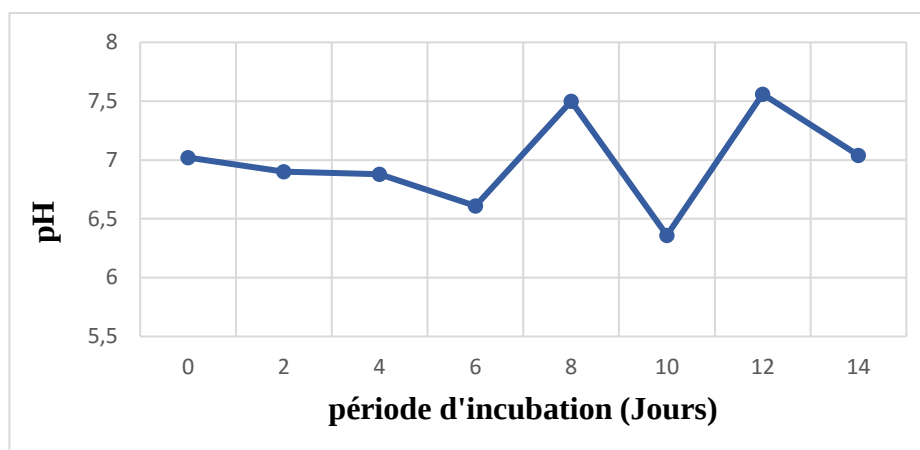


Figure 10: Suivi de la variation du pH au cours de la croissance de la souche SRC3 cultivée sur milieu Czapeck liquide pendant 14 jours d'incubation à 28°C.

D'après les résultats obtenus (figure 9 et 10), il est clairement remarqué que la phase de latence est pratiquement inexistante. Durant la phase de croissance, le poids sec augmente rapidement accompagné d'une acidification du milieu qui est peut être expliquée par une libération d'acides organiques (Boulahfrouf et *al.*, 2008).

Du 6^{ème} au 8^{ème} jour, le poids sec diminue rapidement et le pH évolue pour atteindre des valeurs légèrement basiques. Cette évolution serait due à la dégradation de sources azotées présentes dans le milieu pour libérer de l'ammonium. L'accumulation de ce dernier induit la basification du milieu d'une part, et d'autre part, par la production des métabolites secondaires qui alcalinisent le milieu comme la streptazoline. De telles constatations ont été énoncées par strub (2008).

. Du 8^{ème} au 14^{ème} jour, une succession d'abaissement et d'augmentation du pH et du poids sec est observée parallèlement ce qui pourrait être expliqué par la synthèse d'autres métabolites qui ont tendance à acidifier et à alcaliniser le milieu.

V. Modélisation de la production de la streptazoline par la souche SRC3 en utilisant un plan composite centrée

V.1. Caractéristiques morphologiques de l'isolat sur les différents milieux du model statistique

Après avoir préparé les 30 milieux de culture nécessaires à l'étude, à partir de la matrice générée par le plan d'expérience, la souche étudiée a été ensemencée sur ces derniers et ses caractères morphologiques ont été étudiés et présentés dans le tableau IV indexé en annexe III.

La souche étudiée présente des morphologies différentes en fonction des milieux de culture utilisés. En effet, nous remarquons que le mycélium aérien est de couleur gris claire avec une teinte blanchâtre sur la majorité des milieux (Cz₁₇, Cz₁₈, Cz₁₉, Cz₂₀, Cz₂₁, Cz₂₂, Cz₂₄, Cz₂₆, Cz₂₇, Cz₂₈, Cz₂₉, Cz₃₀) avec, toutefois, un début d'apparition de ce mycélium avec une couleur blanche sur les milieux Cz₁, Cz₅, Cz₇, Cz₈, Cz₉, Cz₁₀, Cz₁₁, Cz₁₃, Cz₁₅, Cz₂₃ et sur Cz₂₅. Les milieux Cz₂, Cz₃, Cz₄ et Cz₆, Cz₁₂, Cz₁₄, Cz₁₆ ont permis d'avoir des colonies dépourvues de mycélium aérien.

D'autre part, la couleur du mycélium de substrat varie entre jaune claire et beige. La croissance de l'isolat est également étudiée, elle est excellente sur pratiquement tous les milieux utilisés, à l'exception des milieux cités où le MA est absent.

V.2. Production et extraction de la streptazoline

La souche SRC3 a été cultivée en stries serrées sur les 30 milieux de culture générés par la matrice d'expérience (Tableau V présenté en annexe IV). Les boîtes de Petri ainsi ensemencées sont mises à incuber à 28 °C suivant le temps d'incubation imparti. L'extraction de la streptazoline est réalisée par macération de la gélose et du mycélium, découpés en petits morceaux, en additionnant 60 mL d'acétate d'éthyle pour chaque boîte de Petri. La macération est laissée toute une nuit à température ambiante. Les extraits bruts obtenus sont filtrés à l'aide d'un papier filtre de type Whatman et conservés à 4°C.

V.3. Détermination de la concentration de la streptazoline

La concentration de la streptazoline obtenue dans chaque extrait brut d'acétate d'éthyle est déterminée par la mesure de l'absorbance de ces extraits après calcul du coefficient d'absorption molaire (ϵ) en utilisant la loi de Beer Lambert $A = \epsilon \cdot \ell \cdot c$.

Le coefficient ϵ est déterminé à partir d'une solution de streptazoline pure à une concentration de $3,6 \cdot 10^{-3}$ les résultats obtenus sont représentés en annexe IV.

V.4. Modélisation de la concentration de la streptazoline

Les plans composites centrés se prêtent au déroulement séquentiel d'une étude. La première étape consiste à appliquer un plan factoriel complet à deux niveaux avec interactions, complétée par des points au centre du domaine de l'étude. Quand les tests de validation du modèle sont positifs, l'étude s'achève, sinon, des essais supplémentaires sont entrepris pour établir un modèle de second degré.

V.4.1. Elaboration du modèle du premier degré

Les paramètres opératoires (Z_1 , Z_2 , Z_3 , Z_4) considérés pour la modélisation de la concentration de la streptazoline produite par la souche SRC3 sont donnés dans le tableau V ci-après. Dans notre cas, le nombre N de combinaisons possibles des quatre facteurs ($k=4$) sur deux niveaux est égal à $2^4=16$.

Tableau V: Matrice des expériences pour N =16

N° d'essai	Z_1 (g/L)	Z_2 (g/L)	Z_3 (g/L)	Z_4 (jours)	x_0	x_1	x_2	x_3	x_4	[streptazoline] (mg/L)
Cz ₁	6	2	0,75	6	1	-1	-1	-1	-1	215,28
Cz ₂	14	2	0,75	6	1	+1	-1	-1	-1	229,77
Cz ₃	6	4	0,75	6	1	-1	+1	-1	-1	153,38
Cz ₄	14	4	0,75	6	1	+1	+1	-1	-1	121,92
Cz ₅	6	2	1,25	6	1	-1	-1	+1	-1	207,76
Cz ₆	14	2	1,25	6	1	+1	-1	+1	-1	225,63
Cz ₇	6	4	1,25	6	1	-1	+1	+1	-1	162,49
Cz ₈	14	4	1,25	6	1	+1	+1	+1	-1	225,63
Cz ₉	6	2	0,75	10	1	-1	-1	-1	+1	198,72
Cz ₁₀	14	2	0,75	10	1	+1	-1	-1	+1	108,26
Cz ₁₁	6	4	0,75	10	1	-1	+1	-1	+1	215,28
Cz ₁₂	14	4	0,75	10	1	+1	+1	-1	+1	207,76
Cz ₁₃	6	2	1,25	10	1	-1	-1	+1	+1	343,62
Cz ₁₄	14	2	1,25	10	1	+1	-1	+1	+1	189,61
Cz ₁₅	6	4	1,25	10	1	-1	+1	+1	+1	112,81
Cz ₁₆	14	4	1,25	10	1	+1	+1	+1	+1	90,33

Note: x_0 : variable fictive, Z_1 : amidon (g/L), Z_2 : NaNO_3 , Z_3 : $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/L), Z_4 : Temps d'incubation, Cz: milieu Czapeck agar.

La moyenne des concentrations de la streptazoline produite par la souche SRC3 sur 16 milieux de culture est :

$Y_i = 188,016$ mg/l. Le nombre (n_0) d'expériences au centre du domaine expérimental est de 6 essais. Les concentrations ainsi obtenues sont rassemblées dans le tableau VI suivant :

Tableau VI : Valeurs des concentrations de la streptazoline au centre du domaine d'étude.

N° d'expérience	y_0 (mg/L)
1	261,97
2	275,51
3	239,38
4	221,32
5	252,93
6	243,90

La moyenne des concentrations au centre du domaine est : $\bar{y}_0 = 249,17$ mg/L.

V.4.1.1 Calcul des coefficients du modèle

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

Tableau VII : Valeurs des coefficients de l'équation de régression b_j

Terme constant	Effets linéaires			
b_0	b_1	b_2	b_3	b_4
188,015	-13,151	-26,815	-6,719	-4,717

Effets d'interaction										
b_{12}	b_{13}	b_{14}	b_{23}	b_{24}	b_{34}	b_{123}	b_{124}	b_{134}	b_{234}	b_{1234}
13,362	1,217	-21,157	-20,104	0,062	-5,926	8,738	13,447	-11,031	-35,664	-2,664

V.4.1.2. Analyse statistique de l'équation de régression

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

Le test de Student permet de déterminer si parmi les coefficients du modèle, il existe des coefficients non significatifs, lesquels seront éliminés de l'équation de régression car leur influence sur la production de la streptazoline est négligeable (Katarou, 1974; Sadou et Sadou, 1991; Benoit et al., 1994; Goupy, 2001). La procédure de calcul consiste à déterminer:

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

$$S_{\text{rep}}^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n_0} (y_i - \bar{y}_0)^2}{n_0 - 1} = 354,202$$

Avec :

y_i : Valeur des concentrations de la streptazoline au centre du domaine

$\bar{y}_0$: Moyenne des 6 essais au centre qui est de 249,17 mg/l

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

❖ Pour identifier les coefficients non significatifs par le test de Student, les valeurs de t_j

pour chaque coefficient sont déterminées avec : $t_j = \frac{|b_j|}{S_{bj}}$ Où

S_{bj} : écart quadratique moyen défini par : $S_{bj} = \frac{S_{rep}}{\sqrt{N}}$

On aura alors $S_{bj} = 4,705$

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

Tableau VIII : Valeurs de t_j

Terme constant	Effets linéaires			
t_0	t_1	t_2	t_3	t_4
39,960	2,795	5,699	1,428	1,002

Effets d'interaction										
t_{12}	t_{13}	t_{14}	t_{23}	t_{24}	t_{34}	t_{123}	t_{124}	t_{134}	t_{234}	t_{1234}
2,840	0,259	4,497	4,273	0,013	1,259	1,857	2,858	2,344	7,580	0,566

En utilisant la table de Student relative à un test bilatéral (Annexe IV), on détermine la valeur de $t_\alpha (f)$ pour le niveau de signification $\alpha = 0,05$ et le nombre de degrés de liberté.

$f = n_0 - 1$ qui est égale à 5, soit $t_{0.05}(5) = 2,57$, d'après les résultats du tableau précédent, on remarque que les valeurs de t_3 , t_4 , t_{13} , t_{24} , t_{34} , t_{123} , t_{134} , t_{1234} sont inférieures à la valeur tabulée du test de Student (2,57) déduisant ainsi que les coefficients correspondants (b_3 , b_4 , b_{13} , b_{24} , b_{34} , b_{123} , b_{134} , b_{1234}) ne sont pas significatifs donc ils seront éliminés de l'équation de régression.

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

$$y = 188,01 - 13,15.x_1 - 26,81.x_2 + 13,36.x_1.x_2 - 21,16.x_1.x_4 - 20,10.x_2.x_3 + 13,45.x_1.x_2.x_4 - 35,66.x_2.x_3.x_4$$

✓ Test de validation de l'équation de régression

• Test de signification de la régression

Pour la signification de la régression on utilise le test de Fisher, le rapport F s'écrit comme suit:

$$F = \frac{\sum_{i=1}^N (\hat{y}_i - \bar{y})^2 / \ell - 1}{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2 / N - \ell} = 12,48$$

$$\text{Ou } \bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^N y_i}{N} = 188,01 \text{ mg/L}$$

D'après la valeur tabulée de test de Fisher, $F_{0,95}(\ell-1, N-\ell) = F_{0,95}(7, 8)$ est égale à 3,5 (Annexe V). Cette dernière étant inférieure à celle calculée, l'équation de régression peut être considérée comme adéquate et le modèle est valide à 95%.

- **Validation du modèle par le point au centre**

Dans cette étape, on compare la valeur de la réponse déterminée par le modèle au centre du domaine d'étude $\hat{y} = 188,016 \text{ mg/L}$ à la moyenne des 6 expériences au centre, soit $y_0 = 249,168 \text{ mg/L}$. L'erreur relative absolue entre ces deux valeurs (32%) étant supérieure à 5%, nous concluons alors que le modèle linéaire du premier degré choisi n'est pas valide. Nous allons donc tester un modèle du second degré.

V.4.2. Elaboration du modèle du second degré

Pour élaborer le modèle de second degré, on conserve les résultats des essais du plan factoriel complet avec interactions y compris les résultats des essais effectués au centre du domaine d'étude et on réalise les expériences complémentaires qui nécessitent le plan en étoile. Les valeurs des paramètres de ces essais complémentaires sont regroupées dans le tableau IX.

Tableau IX: Valeurs des paramètres du plan en étoile

Paramètres opératoires	Niveau $(-\alpha) = -2$	Niveau $(+\alpha) = +2$
Z_1 (g/L)	2	18
Z_2 (g/L)	1	5
Z_3 (g/L)	0,5	1,5
Z_4 (jours)	4	12

Note : Z_1 : amidon (g/L), Z_2 : NaNO_3 (g/L), Z_3 : $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/L), Z_4 : Temps d'incubation (jours).

V.4.2.1. Calcul des coefficients du modèle

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

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

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

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

Les résultats de ce calcul sont assemblés dans le tableau X ci-dessous.

Tableau X: Valeurs des coefficients du modèle du second degré

Terme constant	Effets linéaires			
b_0	b_1	b_2	b_3	b_4
249,168	-2,402	-11,839	3,720	-21,188

Effets d'interactions						Effets quadratiques			
b_{12}	b_{13}	b_{14}	b_{23}	b_{24}	b_{34}	b_{11}	b_{22}	b_{33}	b_{44}
13,362	1,217	-21,157	-20,104	0,062	-5,926	-25,769	27,509	-39,819	-0,334

V.4.2.2. Analyse statistique de l'équation de régression

✓ Vérification de la signification des coefficients

La valeur de la variance de reproductibilité S_{rep}^2 est la même que celle calculée pour le modèle de premier degré, $S_{rep}^2 = 354,202$. Pour déterminer la variance des coefficients du modèle de second degré, il suffit de multiplier les éléments C_{jj} de la diagonale de la matrice de dispersion avec la variance de reproductibilité.

La relation est donnée comme suit: $S_{bj}^2 = C_{jj}.S_{rep}^2$

Les valeurs de t_j du test de Student sont rassemblées dans le tableau XI suivant:

Tableau XI : Valeurs de t_j

Terme constant	Effets linéaires			
t_0	t_1	t_2	t_3	t_4
32,429	0,625	3,082	0,968	5,515

Effets d'interactions						Effets quadratiques			
t_{12}	t_{13}	t_{14}	t_{23}	t_{24}	t_{34}	t_{11}	t_{22}	t_{33}	t_{44}
2,839	0,259	4,496	4,273	0,013	1,259	7,171	7,655	11,080	0,093

Pour le niveau de signification $\alpha = 0,05$ et le nombre de degrés de liberté: $f = n_0 - 1 = 5$; la valeur tabulée du test de Student $t_{0,05}(5) = 2,57$. Les valeurs de t_1 , t_3 , t_{13} , t_{24} , t_{34} , t_{44} étant inférieure à celle tabulée, les coefficients b_1 , b_3 , b_{13} , b_{24} , b_{34} et b_{44} sont non significatifs et seront éliminés de l'équation de régression.

✓ **Test de validation de l'équation de régression**

• **Test de signification de la régression:**

La valeur calculée du test de Fisher $F = 3,820$, alors que la valeur tabulée pour le niveau de signification $\alpha = 0,05$ et les nombres de degrés de liberté $f_1 (\ell - 1) = 8$ et $f_2 (N - \ell) = 21$ est de 2,42 comme F calculé est supérieur à celui tabulé alors le modèle est significatif et valide à 95%.

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

$$\hat{Y} = 249,17 - 11,84.x_2 - 21,19.x_4 + 13,36.x_1.x_2 - 21,16.x_1.x_4 - 20,10.x_2.x_3 - 25,768.x_1^2 + 27,51.x_2^2 - 39,82.x_3^2$$

V.4.3. Recherche de l'optimum

La modélisation de nos résultats par le biais d'un plan composite centré a permis d'aboutir à un modèle du second degré traduisant de manière significative l'effet de variation des différents paramètres opératoires à savoir: la concentration en amidon (x_1), la concentration en NaNO_3 (x_2), en $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (x_3) et le temps d'incubation (x_4) sur le rendement de la molécule active produite par la souche SRC3. L'étape de l'optimisation consiste à déterminer les valeurs optimales de ces facteurs qui entraînent une meilleure

production de la streptazoline. A cet effet, les courbes isoréponses et les surface de réponses sont tracées par le logiciel MATLAB 7.0 afin de localiser la région du domaine d'étude où cet optimum apparaît.

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

$$\hat{Y} = 249,17 - 11,84.x_2 - 21,19.x_4 + 13,36.x_1.x_2 - 21,16.x_1.x_4 - 20,10.x_2.x_3 - 25,768.x_1^2 + 27,51.x_2^2 - 39,82.x_3^2$$

Les optimums sont obtenus en dérivant le modèle prédictif par rapport à chacune des variables x_1 , x_2 , x_3 et x_4 . La procédure de calcul est comme suit:

$$\begin{cases} \frac{d\hat{y}}{dx_1} = -51,536x_1 + 13,362x_2 - 21,156x_4 = 0 \\ \frac{d\hat{y}}{dx_2} = -11,839 + 13,362x_1 + 55,016x_2 - 20,104x_3 = 0 \\ \frac{d\hat{y}}{dx_3} = -20x_2 - 79,636x_3 = 0 \\ \frac{d\hat{y}}{dx_4} = -21,188 - 21,156x_1 = 0 \end{cases}$$

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

$$\begin{cases} x_1 = -1 \\ x_2 = 0,42 \\ x_3 = -0,11 \\ x_4 = 2 \end{cases}$$

La concentration de la streptazoline théorique obtenue en ce point en remplaçant les variables x_1 , x_2 , x_3 et x_4 par ces valeurs dans le modèle du second degré est de 218 mg/L.

V.4.4. Tracé des isoréponses et des surfaces de réponses

L'objectif de ce travail étant d'obtenir les valeurs optimales des différents facteurs opératoires qui permettent l'obtention de la concentration de la streptazoline la plus élevée, pour ce fait 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 amenés à réaliser des coupes en fixant deux variables soit par exemple x_1 et x_3 (les variables les moins significatives) et en traçant les courbes isoréponses dans le plan $x_2 - x_4$. Ces courbes sont tracées à l'aide du logiciel MATLAB 7.0.

- Pour $x_1=0$, $x_3=0$, l'équation de régression s'écrit comme suit :

$$\hat{y} = 249,168 - 11,839 x_2 - 21,188 x_4 + 27,508 x_2^2$$

Les surfaces de réponse et les courbes isoréponses sont illustrées dans la figure 11

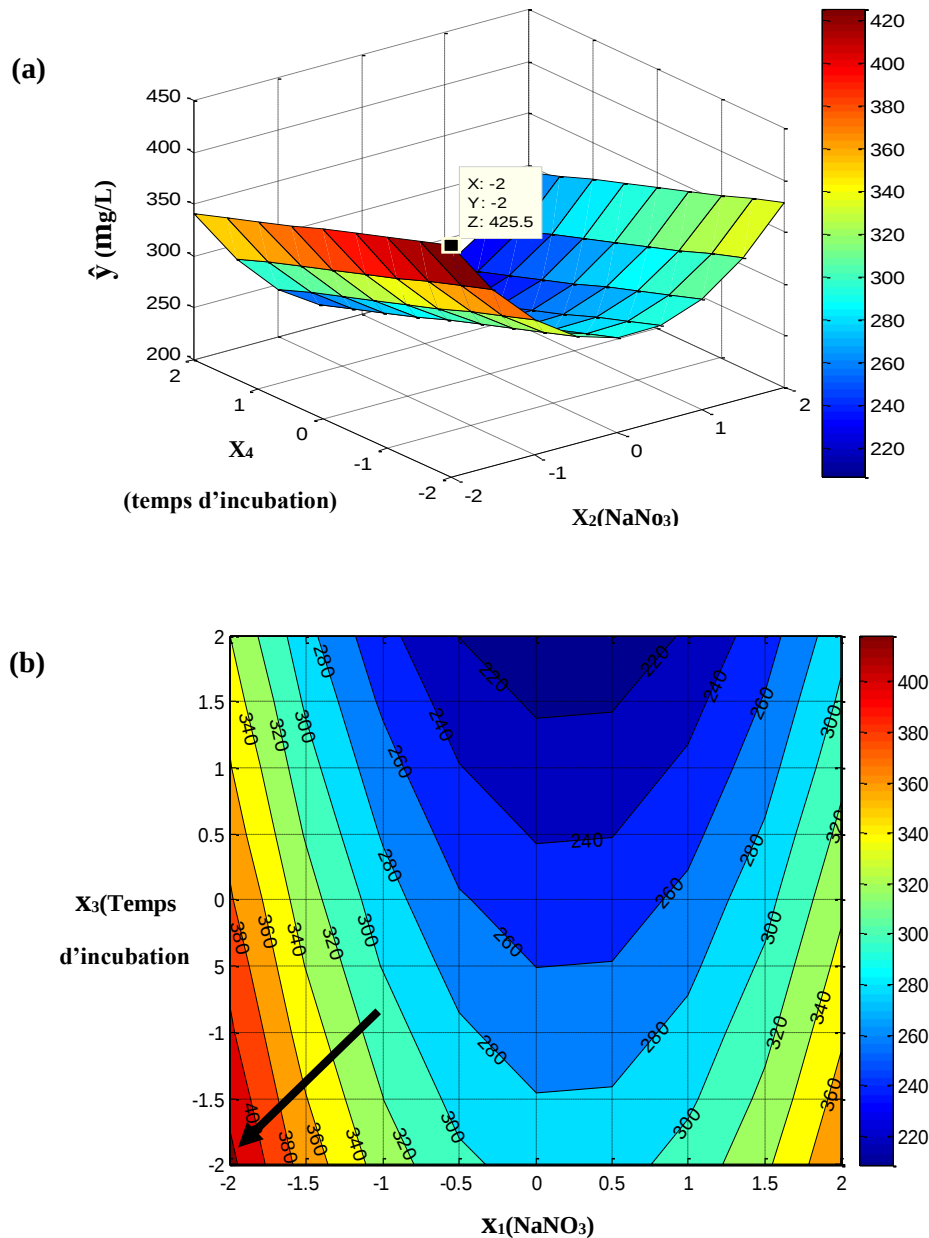


Figure 11: Surface de réponse (a) et courbe iso réponse (b) pour : $x_1 = 0$, $x_3 = 0$

L'analyse des surfaces de réponse (a) et les courbes isoréponse (b) (figure 11) montre que la production de la streptazoline augmente dans le sens de la diminution de la concentration de NaNO_3 (x_2) et du temps d'incubation (x_4) comme c'est indiqué par la flèche sur la figure (b). La surface de réponse (a) correspondante montre qu'une production de 425,5

mg/L peut être atteinte pour une concentration en $\text{NaNO}_3 = 1 \text{ g/L}$ ($x_2 = -2$) et le temps d'incubation = 4 jours ($x_4 = -2$).

- Pour $x_1 = +1$ et $x_3 = +1$ l'équation de régression est:

$$\hat{y} = 183,582 - 18,518 x_2 - 42,344 x_4 + 27,508 x_2^2$$

Les surfaces de réponse et les courbes iso réponses sont illustrées dans la figure 12

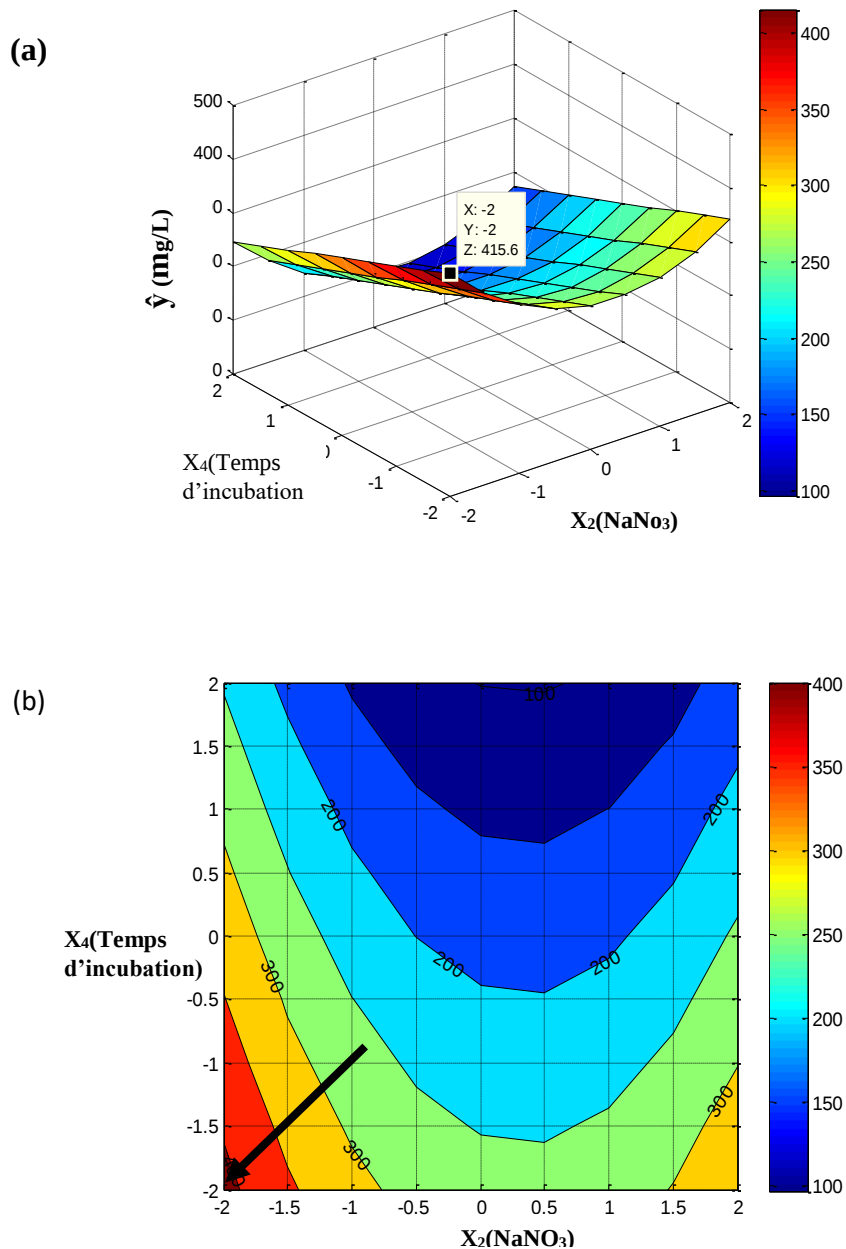


Figure12: Surface de réponse (a) et courbe iso réponse (b) pour : $x_1 = +1$, $x_3 = +1$

La surface de réponse (a) et la courbe isoréponse (b) (figure 12) obtenues pour $x_1 = +1$ (concentration en amidon de 14 g/L) et $x_3 = +1$ (concentration en MgSO_4 de 1,25 g/L) montrent que la concentration maximale de la streptazoline produite qui peut être atteinte est de 415,6 mg/L. Cet optimum est obtenu pour les mêmes conditions précédentes c'est à dire pour une concentration de $\text{NaNO}_3 = 1$ g/L ($x_2 = -2$) et un temps d'incubation de 4 jours ($x_4 = -2$).

- Pour $x_1 = -1$ et $x_3 = -1$ l'équation est

$$\hat{y} = 183,582 - 5,10 x_2 - 0,032x_4 + 27,508 x_2^2.$$

Les surfaces de réponse et les courbes isoréponses sont présentées dans la figure 13

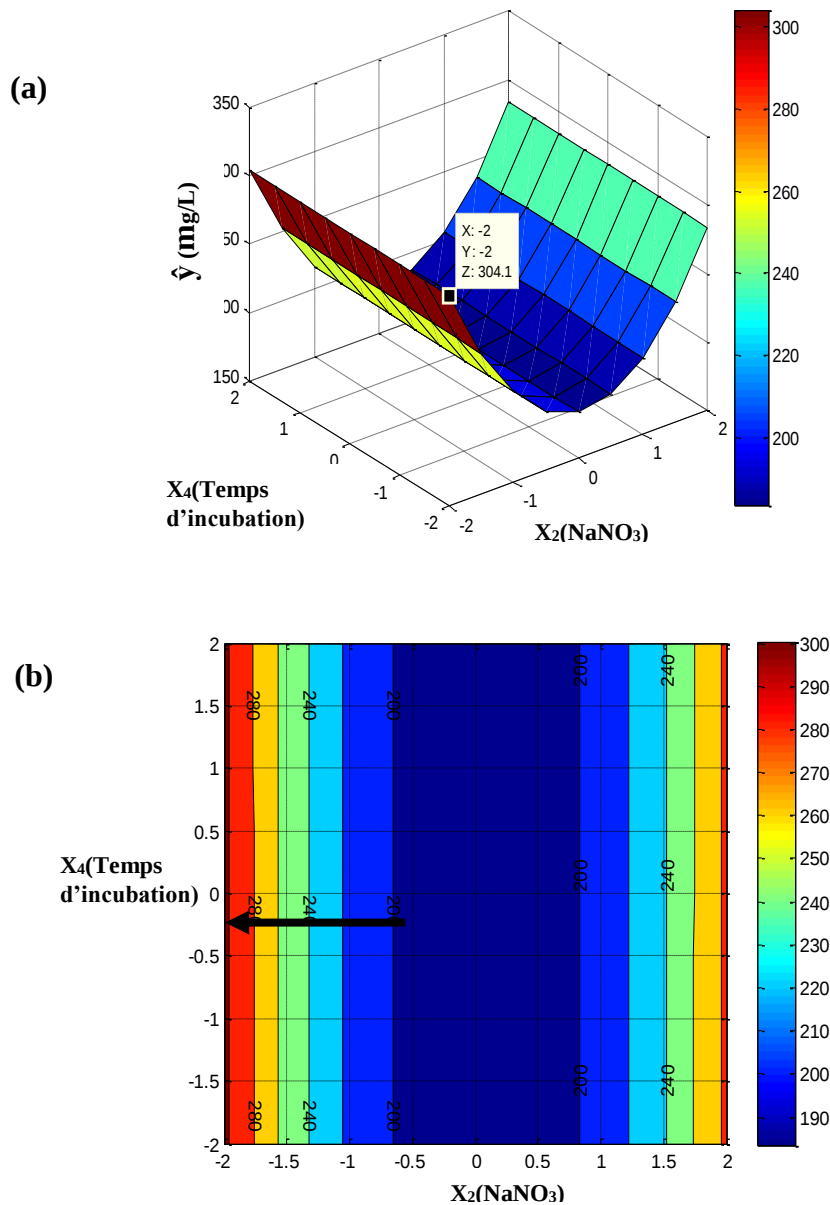


Figure13: Surface de réponse (a) et courbe iso réponse (b) pour : $x_1 = -1$, $x_3 = -1$

La figure 13 (a) et (b) montre que pour les concentrations minimales en amidon $x_1 = -1$ (6 g/L) et en MgSO_4 $x_3 = -1$ (0,75 g/L), une concentration en streptazoline produite de 304,1 mg/L peut être obtenue pour également une concentration de $\text{NaNO}_3 = 1$ g/L ($x_2 = -2$) et un temps d'incubation de 4 jours ($x_4 = -2$).

D'après les courbes tracées ci-dessus, on peut conclure que le meilleur rendement de production de la streptazoline (425 mg/L) est obtenu pour les conditions suivantes des différents paramètres opératoires :

$x_1 = 0$	—————→	[amidon] = 10 g/l
$x_2 = -2$	—————→	$\text{NaNO}_3 = 1$ g/L.
$x_3 = 0$	—————→	$\text{K}_2\text{HPO}_4 = 1$ g/L.
$x_4 = -2$	—————→	Temps d'incubation = 4 jours.

L'optimisation des conditions de culture en particulier les paramètres physiques et nutritionnels par les méthodes classiques s'avère longue, laborieuse et coûteuse en plus du fait qu'elle ignore les interactions combinées entre les différentes variables (Li *et al.*, 2009). Une étude statistique basée sur l'élaboration d'un modèle mathématique par le biais d'un plan composite centré avec interaction a été réalisée dans le but d'optimiser et d'améliorer le rendement de production de la streptazoline, molécule antimicrobienne produite par la souche *Streptomyces* sp.SRC3.

D'après le modèle du second degré développé, on note que les composantes du milieu Czapeck les plus influentes sur la production de la streptazoline sont la concentration de NaNO_3 (x_2) avec un effet de (- 11,84) et le temps d'incubation (x_4) avec un effet de (- 21,19). Leurs signes négatifs indiquent que lorsque ces derniers sont à leurs niveaux bas (1 g/L) et (4 jours) respectivement, l'influence est positive sur la production de la streptazoline et peut atteindre d'après les surfaces de réponse et les courbes isoréponse tracées, une concentration de 425,5 mg/L en fixant l'amidon (10g/L) et le K_2HPO_4 (1g/L) au centre du domaine de l'étude.

Ces résultats confirment les travaux de Spizic et Tichy (1995), qui stipulent qu'un excès en azote réprime la production des antibiotiques. Cependant, la diminution de la durée d'incubation (x_4) de sa valeur maximale (12 jours) à sa valeur minimale (4 jours) fait augmenter la production des molécules bioactives ce qui corrobore les études menées par Martin et Demain (1980), Lohr *et al.* (1989) et Seo *et al.* (2010), qui ont constaté que

plusieurs antibiotiques synthétisés par des souches de *Streptomyces* apparaissent au premier jour de culture et atteignent leur maximum au quatrième jour.

D'autre part, Lebrihi et *al* (1988) et Lounès et *al* (1995) ont démontré que la production spécifique de métabolites secondaires s'avère souvent meilleure sur une source de carbone complexe, plus difficilement métabolisable, comme les polysaccharides (amidon, dextrines) comme c'est le cas pour notre souche. Par ailleurs, Hamza et *al*, (2013) ont établi que l'utilisation de l'amidon comme source de carbone permettait d'avoir un rendement plus élevé de la molécule active étudiée produite par la souche *Streptomyces sp.* AH 11.4.

L'utilisation des plans d'expériences comme le plans composite centré dans notre étude, nous a permis la conception d'un milieu de culture avec des paramètres opératoires différents du milieu de base et ainsi optimiser le rendement de la production de la streptazoline par la souche productrice *Streptomyces sp.* SRC3 de 249mg/L à 425,5 mg/L soit de 70%.

Conclusion

Cette étude avait pour principal objectif l'optimisation de la production de la streptazoline, molécules antibiotique, produite par une souche d'actinomycete isolée de sédiments de rivière, *Streptomyces* sp. SRC3, en utilisant la méthode des plans d'expériences. Pour cela, des objectifs ont été fixés et détaillés dans les différentes parties de ce travail:

- L'évaluation de l'activité antagoniste de l'isolat est réalisée dans le but de déterminer le meilleur milieu de production de l'antibiotique produit en cultivant la souche SRC3 sur trois milieux de culture de compositions différentes. Les résultats obtenus ont permis de sélectionner le milieu Czapeck comme étant le meilleur milieu de production ayant présenté des activités antimicrobiennes relativement importantes d'une part, et un spectre d'activité plus large en comparaison avec les milieux Gausse et SCA utilisés d'autre part.
- La caractérisation phénotypique à travers l'étude macro et micromorphologique de l'isolat SRC3 a été réalisée et les résultats montrent que la souche étudiée appartient au genre *Streptomyces*, où le nom *Streptomyces* sp. SRC3 lui a été attribué.
- Les cinétiques de croissance et de production de la souche SRC3 et de la molécule antibiotique produite, à travers l'évaluation des variations du poids sec d'une part et du pH du milieu d'autre part, ont été réalisés et les résultats nous ont permis de déterminer le jour maximal de production estimé à 8 jours d'incubation et cela pour la majorité des germes antagoniste étudiés.
- L'étude de la modélisation et de l'optimisation de la production de la streptazoline a été réalisée en sélectionnant quatre facteurs comme variables: l'amidon comme source de carbone, le NaNO_3 comme source d'azote, le K_2HPO_4 comme source minérale et le temps d'incubation. Une modélisation statistique et mathématique a été entreprise en vue de sélectionner les paramètres influençant cette production, ainsi que leurs interactions et leur optimisation pour une production maximale de la streptazoline. Pour ce faire, un plan composite centré avec interactions a été utilisé.

L'isolat a été cultivé sur 30 milieux de culture, générés par la matrice des expériences.

La modélisation par le biais du plan composite centré a montré que l'interaction la plus importante qui influence sur la concentration de la streptazoline a été marquée par le couple ($[\text{NaNO}_3]$ - temps d'incubation).

Les concentrations optimales de ces paramètres ont pu être délimitées par le tracé des courbes iso-réponses et leurs valeurs sont les suivantes ; amidon (10 g/L), NaNO_3 (1 g/L au lieu de 3 g/L), K_2HPO_4 (1 g/L) et enfin le temps d'incubation (4 jours au lieu de 8 jours).

Le modèle du plan composite centré nous a permis de déterminer les concentrations optimales des différents paramètres pour une production maximale de l'antibiotique.

En effet, le rendement en streptazoline obtenu par le biais de cette optimisation est estimé à 425 mg/L soit une augmentation de 70% en comparaison au rendement obtenu sur le milieu de base avant optimisation (249 mg/L).

Par ailleurs, il y'a lieu de souligner que la production et la simple procédure de purification de cet antibiotique produit par la souche *Streptomyces* sp. SRC3 est concurrentielle à sa synthèse chimique, menée par plusieurs auteurs, depuis Huang et commins en 2000. De plus, afin d'obtenir la molécule pure, plus de 10 étapes de réactions chimiques sont nécessaires pour aboutir finalement à un rendement relativement faible.

Au terme de ce travail, nous envisageons de continuer nos recherches sur certains axes pertinents qui méritent d'être étudiés:

- ❖ Elargir la gamme de germes cibles aux moisissures phytopathogènes.
- ❖ Elargir l'étude à d'autres paramètres nutritionnels de culture tel que: le pH, la température ...etc.
- ❖ Identification moléculaire de la souche *Streptomyces* sp. SRC3.
- ❖ Extrapolation de l'étude de la production sur milieu liquide.
- ❖ Tester d'autres activités biologiques de la streptazoline tel que: les activités antivirale, antibiofilm...etc.

Références bibliographiques

A

- Aharonowitz Y. (1980). Nitrogen metabolite regulation of antibiotic biosynthesis. *Annu Rev Microbiol.* **34**, 209-233.
- Anderson AL et Wellington E. (2001). The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* **51**, 797–814.
- Asanza-Ternuel ML, Gontier E, Bienaime C, Nava-Saucedo JE, Barbotin JN. (1997). Response surface analysis of chlortetracycline and tetracycline production with K-caragenum immobilized *Streptomyces aureofaciens*. *Enzyme and Microbial Technology.* **21**, 314-320.

B

- Bastide A, De Méo M, Andriantsoa M, Laget M, et Duménil G. (1986). Isolement et sélection de souches d'actinomycète productrices de substances antifongiques de structure non-polyéniques. *Mircen. J.* **2**, 453-466.
- Becker B, Lechevalier MP, Gordon RE, et Lechevalier HA. (1964). Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. *Appl. Microbiol.* **12**, 421-423.
- Benoit D, Tourbier Y, et Germain S. (1994). « Plans d'expériences, construction et analyse ». Technique et documentation. Edition Lavoisier. Paris, p 206.
- Billerbeck VG, Roques C, Vanière P, et Marquier P. (2002). Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. Laboratoire de Bactériologie, virologie et microbiologie industrielle. *Hyg. Rev*, N°3.
- Boulahfrouf A, Reghioua S, Boughachiche F, Oulmi L, Zerizer H, Kitouni M, et Boudemagh A. (2008). Séparation et caractérisation préliminaire d'antibiotiques produits par une souche représentative d'actinomycète isolée de sol aride de la région de Biskra. *Sciences et Technologie.* **28**, 59-64.
- Box, Hunter, WG et Hunter JS. (1978). "Statistics for experimentels". Editions d'organisation. Paris.

C

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

D

- Demain AL, et Martin JF. (1980). Control of antibiotic synthesis. *Microbiol Rev.* **44**, 230-251.
- Dietz A. (1988). Practical and proposed cooperative investigational criteria for taxonomic studies of the *Actinomycetales*. In : biology of actinomycetes. Okamy Y, beppu T et Orawara H (end), Tokyo: *Japan Sci. Soc.Press.* 203-209.
- Drautz H, Achner Z, Kupfer E et Keller W. (1981). Benzoanalogous Congeners of Streptazolin. Schierlein, *Helv. Chim. Acta.* **64**, 1752 p.

E

- Ensign JC, Normand P, Burden JP, et Yallop CA. (1993). Physiology of some actinomycete genera. *Res. Microbiol.Vol.* **144**, 659-660.

F

- Flann CJ, et Overman LE. (1987). Total synthesis of (+/-) streptazolin. *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 6115 p.

H

- Haslay C, Leclerc H. (1993). Microbiologie des eaux d'alimentation. Lavoisier TEC et DOC.France.
- Holt JG. (1989). Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 4, ed. S.T. Williams and M.E.Sharpe, Baltimore, Md: Williams and Williams.
- Hopwood DA, Bibb MJ, Chater KF, Kieser T, Bruton CJ, Kieser HM, Lydiate DJ, Smith CP, Ward JM et Schrempf H. (1985). Genetic Manipulation of *Streptomyces*, Colney, Norwich NR4, England.
- Huang S et Comins DL. (2000). Total synthesis of (+/-) streptazolin. *Org. Chem. Commun.* 569–570.
- Hodgson DA. (1992). Differentiation in actinomycete, dans : Mohan S., Dow C. et Cole J.A. Prokaryotic structure and function. Society of General Microbiology Symposium 47. *Campridge University Press Edition.* 407-440.

I

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

G

- Garrity GM, Bell JA, et Lilburn TG. (2004). Taxonomic outline of Prokaryotes. Bergey's Manual of Systematic bacteriology.
- Goodfellow M. (2012). Phylum XXVI. Actinobacteria in: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" Whitman WB, Goodfellow M, Kampfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Ludwig W, Suzuki k, Parte A.vol 5, 34-2028.
- Goodfellow M, Cross T. (1984). Classification in Biology of the actinomycetes. Goodfellow M, Williams ST et Mordarski M. (1984). Introduction to and importance of the actinomycetes. In: « The biology of the actinomycetes », Goodfellow M, Williams S. and Mordarski M (Eds.). London: *Academic Press*.1-6.
- Gottlieb D. (1973). General 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.
- Goupy J. (1990). Revue de statistique appliquée, tome **38**, 4^{ème} édition Numdam.
- Goupy J. (1992). "Plans d'expériences". Techniques de l'ingénieur. Traité Analyse Chimique et Caractérisation, Les Editions d'organisation. Paris P230, p 1-20.
- Goupy J. (1999). Plans d'expériences pour surfaces de réponses. Edition: DUNOD. Paris, 409 p.
- Goupy J. (2001). Introduction aux plans d'expériences. 2^{ème} édition: DUNOD. Paris, 109 p.
- Goupy J. (2005). Pratiquer les plans d'expériences. Edition : DUNOD. Paris. 501-295.
- Goupy J. (2006). Les plans d'expériences. MODULAD. N°34. 80 p.

K

- Karrer A, et Dobler M. (1982). Total synthesis of (+/-) streptazolin. *Helv. Chim. Acta*, **65**, 1432 p.
- Katarou V. (1974). Méthodes cybernétiques et technologie chimique. Edition: MIR. Moscou. 98 p.
- Kozikowski AP et Park P. (1985). Total synthesis of (+/-) streptazolin. *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 1763 p.
- Kozikowski AP et Park P. (1990). Total synthesis of (+)-streptazolin. *J. Org. Chem.*, **55**, 4668 p.
- Kratzel M, Weigl A. (1997). Benzoanalogous Congeners of Streptazolin. *J Chem Soc Perkin Trans 1*, 1009 p.
- Kuster E et Williams ST. (1964). Selection of media for isolation of *Streptomyces*. *Nature*. **202**, 928-929.

L

- Larpent JP et Sanglier JJ. (1989). Biotechnologie des antibiotiques. (Ed), Masson. Paris, 48 p.
- Larpent JP et Larpent-Gourgaud. (1990). Memento technique de microbiologie. Tec. & Doc. lavoisier.
- Lawrence CH. (1956). A method for isolating actinomycetes from scabby potato tissue and soil with minimal contamination. *Canad. J. Bot.* **34**, 44-47.
- Lechevalier MP. (1981). Ecological associations involving actinomycetes. In: Actinomycetes. Shaal and Pulverer (Eds.). *Zbl. Bakt. Suppl.* **11**, 159-166.
- Lechevalier HA et Lechevalier MP. (1970a). A critical evaluation of genera of aerobic actinomycetes. In: The *Actinomycetales*. Prauser H. (Eds.). G. Fisher Verlag, Jena, 393-405.
- Lechevalier MP, Debievre C, et Lechevalier HA. (1977). Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochem. Syst. Ecol.* **5**, 249-260.
- Lounès A, Lebrihi A, Benslimane C, Lefebvre G, et Germain P. (1995). Glycerol effect on spiramycin production and valine catabolism in *Streptomyces ambofaciens*. *Current Microbiology.* **31**, 304-311.

M

- Mariat F et Sebald M. (1990). Actinomycètes In: Bactériologie Médicale. Le Minor L. et Véron M. (Eds.). 2ème édition. Flammarion. Paris. 935-949.
- Mayer M et Thiericke R. (1993). Biosynthesis of Streptazolin. *J. Org. Chem.* **58**, 3486–3489
- Mc Manuc PS, Stockwell VO, Sundin GW, et Jones AL. (2002). Antibiotic use in plant agriculture. *Ann Rev Phytopathol.* **40**, 443-465.
- Minnikin DE, Patel PV, Alshamaony L, et Goodfellow M. (1977). Polar lipid composition in the classification of *Nocardia* and related bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **27**, p 104-107.
- Misato T. (1982). Present status and future prospect of agricultural antibiotics. *J Pest. Sci.* **7**, 301-30.
- Mukhopadhyay J, Das K, Ismail S, Koppstein D, Jang M, Hudson B, Sarafianos S, Tuske S, Patel J, Jansen R, Irschik H, Arnold E et Ebright RH. (2008). The RNA polymerase “Switch Region” is a target for inhibitors. *Cell.* **135**, 295-307.

N

- Nomura I, Mukai C. (2002). Total synthesis of (+/-) 8 α - hydroxystreptazolone. *Org. Lett.* **4**, 4301-4304.
- Nomura I, Mukai C. (2004). Studies on the Total synthesis of streptazolin and it's related natural products : first total synthesis of (+/-) 8 α - hydroxystreptazolone. *J Org chem*, **69**, 1803-1812.

O

- Oskay M, Tamer A, et Azeri C. (2004). Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *Afr J Biotechnol.* **3(9)**, 441–446.
- Ozil P. (1997). Plans d'expériences : Méthode de TAGUCHI. E.N.S d'électrochimie et d'Electrometallurgie INPG.
- Ozil P. (2007). Plans d'experiences: Méthode de Taguchi. Ecole National Supérieure d'électrochimie et d'électrometallurgie, INP Grenoble – France.

P

- Perry JA, Koteva K, Verschoor CP, Wang W, Bowdish DME et Wright GD. (2015). A macrophage-stimulating compound from a screen of microbial natural products. *T.J.A.* **68**, 40-46.
- Poosarla A, Venkata RL, et Krishna RM. (2013). Isolation of potent antibiotic producing Actinomycetes from marine sediments of Andaman and Nicobar Marine Islands. *Journal of Microbiology and Antimicrobials.* **5**, p 6-12.
- Puder C, Loya S, Hizi A et Zeeck A. (2001). New co-metabolites of the streptazolin pathway. *J. Nat. Prod.* **64**, 42–45.

R

- Rawasheh R, Saadoun I et Mahasneh A. (2005). Effect of culture conditions on xylanase production by *Streptomyces* sp. (strain Ib 24D) and its potential to utilize tomato pomace. *Afri. J. of Biotechnol.* **4**, 251-255.

S

- Sadou G et Sadou MC. (1991). Les plans l'expérience et l'expérimentation à l'assurance qualité. Edition: AFNOR technique. 90p.

- Sanglier JJ et Turjillo M, (1997). Substance bioactives produites par les actinomycètes et stratégie de selection des souches. *Bulltin de la société Française et Microbiologie*. Vol 12 (13).
- Sejiny M. (1991). Growth phases of some antibiotics producing *Streptomyces* and their identification. *J K A U Sci*. **3**, 21-29.
- Sharon FBS, Daniel1 RR, et Shenbagarathai R. (2014). Optimization of antibiotic production by marine actinomycetes streptomyces Sp. Kod10. *Int J Pharm Pharm Sci*. Vol 6 Suppl. **2**, 506-510.
- Smaoui S. (2010). Purification et caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse doctorat de l'université de Toulouse. France. 125p.
- Spizek J et Tichy P. (1995). Some aspects of overproduction of secondary metabolites. *Floia Microbiol*. **40**, 43-50.
- Strub C. (2008). Modélisation et Optimisation de la production de thiolutine chez *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de doctorat. Université Toulouse. France, p 52.
- Subrabani R et Aalbersberg W. (2012). Marine actinomycetes : an ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiol. Res*. **167 (10)**, 571-580.
- Sujatha P, Bapi-Raju KVVSN, Ramana T. (2005). Studies on a new marine streptomycete BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiological Ressources*. **160**, 119-126.

T

- Thakur D, Yadav A, Gogoi BK, et Bora TS. (2007). Isolation and screening Streptomyces in soil from areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. *J. Microbiol. Médi*. **17**, 242-249.

U

- Untrau S, Lebrihi A, Lefebvre G et Germain P. (1994). Nitrogen catabolite regulation of spiramycin production in *Streptomyces ambofaciens*. *Curr Microbiol*. **28**, 111-118.

V

- Valan, Arasu M, Duraipandiyan V, Agastian P et Ignacimuthu S. (2008). Antimicrobial activity of Streptomyces spp. ERI-26 recovered from Western Ghats of Tamil Nadu. *Journal de Mycologie Médicale*. **18**, 147-153.
- Vial J et Jardy A. (1998). Utilisation des plans d'expériences pour évaluer la robustesse d'une méthode d'analyse par C.O.L. *Analysis*. **26**, 15-24.
- Vivier S. (2002). Stratégie d'optimisation par la méthode des plans d'expériences et application aux dispositifs électrochimiques modélisés par les éléments finis. Thèse de Doctorat. Université de Lille – France.

W

- Waksman SA et Henrici AT. (1943). The nomenclature and classification of the actinomycetes. *J. Bacteriol.* **46**, 337-341.
- Watve MG, Tichoo R, jog MM et Bhole BD. (2001). How many antibiotics are produced by the genus streptomyces. *Arch. Microbiol.* Vol **176**, 386-390.
- Williams ST et Goodfellow M. (1983). Ecology of actinomycetes. *Ann Rev Microbiol.* Vol **37**, 189-216.
- Williams ST, Goodfellow M, Alderson G. (1989). Genus streptomyces Waksman and Henrici 1943,399 AL. In : Williams ST, Sharpe ME, Holt JG (eds) Bergey's manual of systematic bacteriology, vol **4**. Williams, Baltimore. 2452-2492.
- Williams ST, Locci R, Beswick A, Kurtboke DI, Kuznetsov VD, Le Monnier FJ, Long PF, Maycroft KA, palma RA, Petrolini B, Quaroni S, Todd JI et West M. (1993). Detection and identification of novel actinomycetes. *Microbiol.* **144**, 653–656.

Z

- Zaitlin B et Watson SB. (2006). Actinomycetes in relation to taste and odour in drinking water. *Myths, tenets and truths*. **40 (9)**, 1741-1753.
- Zheng D, Han L, Li Y, Li J, Rong H, Leng Q, Jiang Y, Zhao L et Huang X. (2012). Isostreptazolin and sannaphenol, two new metabolites from Streptomyces sannanensis Molecules. **17**, 836-842.

Annexes

Annexe I

Matériel utilisé

- Autoclave (Biobase)
- Balance analytique (Ohaus Corp. Pine Brook, NJ, USA)
- Barreaux magnétiques
- Bec bunsen
- Boîte de Petri
- Bain Marie (GFL : Gesellschaft für Labortechnik m.b.H. & Co. D 3006 Burgwedel 1)
- Cuve en Cortez
- Ecouvillons
- Erlenmeyers
- Etuve à 28 °C et à 37°C (Memmert)
- Loupe binoculaire
- Micropipette de 1000 µL avec embouts plastiques
- Microscope optique (Zeiss West Germany)
- Pied à coulisse (Stinlesse Hardend)
- Pipette Pasteur
- Plaque agitatrice (Velp Scientifica)
- Spatule
- Spectrophotomètre (Shimadzu mini 1240)
- Tube à essais
- Vortex (VELP scientifica référence : ZX3)

Annexe II

Composition des milieux de culture

❖ 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
▪ H ₂ O.....	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
▪ CaCO ₃	0.02g
▪ FeSO ₄ 7H ₂ O.....	0.01g
▪ Agar.....	18g
▪ H ₂ O.....	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
▪ FeSO ₄ 7H ₂ O.....	0.01g
▪ Agar.....	20g
▪ H ₂ O.....	1000mL
▪ pH.....	7.4±0.2

❖ Milieu Muller-Hinton

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

❖ Milieu Chapman**❖ Milieu PCA**

Annexe III

Tableau IV: Caractéristiques morphologiques de la souche SRC3 après 21 jours d'incubation à 28°C sur les différents milieux de Czapeck

Milieu Czapeck	Couleur du mycélium aérien (MA)	Couleur du mycélium du substrat (MS)	Aspect des colonies	Production depigments diffusibles	Croissance
Cz ₁	blanc	Blanc à crème	Colonies moyennes, rugueuse	-	++
Cz ₂	-	Jaune clair	Petites colonies, rugueuse	-	++
Cz ₃	-	Crème	Petites colonies, rugueuse	-	++
Cz ₄	-	Beige	Petites colonies, rugueuse	-	+
Cz ₅	blanc	Crème	Colonies moyennes, rugueuse	-	++
Cz ₆	-	Jaune clair	Petites colonies, rugueuse	-	+
Cz ₇	Blanc	Beige	Colonies moyennes, rugueuse	-	++
Cz ₈	Blanc	Beige	Colonies moyennes, rugueuse	-	++
Cz ₉	blanc	Jaune clair	Petites colonies	-	++
Cz ₁₀	blanc	Jaune clair	Petites colonies, rugueuse	-	++
Cz ₁₁	blanc	Jaune clair	Petites colonies, rugueuse	-	++
Cz ₁₂	-	Beige	Petites colonies, rugueuse	-	+
Cz ₁₃	blanc	Beige	Colonies moyennes, rugueuse	-	++
Cz ₁₄	-	Jaune clair	Petites colonies, rugueuse	-	+
Cz ₁₅	blanc	Jaune clair	Colonies moyennes, rugueuse	-	++
Cz ₁₆	-	Beige	Petite Colonies, rugueuse	-	+
Cz ₁₇	Blanc avec une teinte grisâtre	Beige	Poudreux	-	+++
Cz ₁₈	Blanc	Beige	Colonies moyennes, poudreux	-	+++

Cz ₂₀	Gris claire avec une teinte blanchâtre	Beige	Colonies moyennes, poudreux	-	+++
Cz ₂₁	Gris claire	Blanc	poudreux	-	+++
Cz ₂₂	Gris claire avec une teinte blanchâtre	Beige	Colonies moyennes, Rugueux	-	+++
Cz ₂₃	Gris claire	Beige	Colonies moyennes, Rugueux	-	++
Cz ₂₄	Gris claire avec une teinte blanchâtre	Blanc	Rugueux, poudreux	-	+++
Cz ₂₅	Gris claire	Beige	Colonies moyennes, Rugueux	-	++
Cz ₂₆	Gris claire avec une teinte blanchâtre	Blanc	Poudreux	-	+++
Cz ₂₇	Gris claire avec une teinte blanchâtre	Blanc	Rugueux, poudreux	-	+++
Cz ₂₈	Gris claire avec une teinte blanchâtre	Blanc	Colonies moyennes, poudreux	-	+++
Cz ₂₉	Gris claire avec une teinte blanchâtre	Blanc	Colonies moyennes, rugueux	-	+++
Cz ₃₀	Gris claire avec une teinte blanchâtre		Colonies moyennes, poudreux	-	+++

Note: +++ Excellente croissance, ++, croissance Moyenne. +, Faible croissance, _ Absence de croissance. Cz, milieu Czapek.

Annexe IV

Tableau I : Matrice d'expérience pour K=2 et N=30

N° d'essai	Z ₁ (g/L)	Z ₂ (g/L)	Z ₃ (g/L)	Z ₄ (jours)	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	DO $\lambda_{\max} = 347\text{nm}$	[streptazoline] (mg/l)
Cz1	6	2	0.75	6	-1	-1	-1	-1	0,101	215,28
Cz2	14	2	0.75	6	+1	-1	-1	-1	0,104	229,77
Cz3	6	4	0.75	6	-1	+1	-1	-1	0,087	153,38
Cz4	14	4	0.75	6	+1	+1	-1	-1	0,080	121,92
Cz5	6	2	1.25	6	-1	-1	+1	-1	0,099	207
Cz6	14	2	1.25	6	+1	-1	+1	-1	0,103	225,63
Cz7	6	4	1.25	6	-1	+1	+1	-1	0,089	162,49
Cz8	14	4	1.25	6	+1	+1	+1	-1	0,103	225,63
Cz9	6	2	0.75	10	-1	-1	-1	+1	0,097	198,72
Cz10	14	2	0.75	10	+1	-1	-1	+1	0,077	108,26
Cz11	6	4	0.75	10	-1	+1	-1	+1	0,101	215,28
Cz12	14	4	0.75	10	+1	+1	-1	+1	0,099	207
Cz13	6	2	1.25	10	-1	-1	+1	+1	0,129	343,62
Cz14	14	2	1.25	10	+1	-1	+1	+1	0,095	189,61
Cz15	6	4	1.25	10	-1	+1	+1	+1	0,078	112,81
Cz16	14	4	1.25	10	+1	+1	+1	+1	0,073	90,33
Cz17	10	3	1	8	0	0	0	0	0,111	261,97
Cz18	10	3	1	8	0	0	0	0	0,114	275,51
Cz19	10	3	1	8	0	0	0	0	0,106	239,38
Cz20	10	3	1	8	0	0	0	0	0,102	221,32
Cz21	10	3	1	8	0	0	0	0	0,109	252,93
Cz22	10	3	1	8	0	0	0	0	0,107	243,90
Cz23	2	3	1	8	-2	0	0	0	0,087	153,38
Cz24	18	3	1	8	+2	0	0	0	0,104	229,77
Cz25	10	1	1	8	0	-2	0	0	0,135	368,46
Cz26	10	5	1	8	0	+2	0	0	0,151	440,91
Cz27	10	3	0.5	8	0	0	-2	0	0,084	139,93
Cz28	10	3	1.5	8	0	0	+2	0	0,082	130,82
Cz29	10	3	1	4	0	0	0	-2	0,142	401,58
Cz30	10	3	1	12	0	0	0	+2	0,094	185,05

Annexe V
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 VI
Table de Fisher (Goupy, 1999 et Ozil, 1997)
 Valeurs des 95^{nièmes} centiles (niveaux 0.05)
 F0.95 pour la distribution F

ν_1 → $\nu_1 \downarrow$	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

Résumé

Ce travail porte sur l'étude de l'optimisation de la production de la streptazoline par une souche d'actinomycète isolée à partir de sédiments de rivière provenant de la région de Ziam Mansouriah (Jijel). L'étude morphologique de l'isolat a permis son rattachement au genre *Streptomyces* où le nom *Streptomyces* sp. SRC3 lui a été attribué. La mise en évidence de l'activité antibactérienne de la souche SRC3 sur trois milieux de culture, effectuée par la méthode des cylindres d'agar, a permis la sélection du milieu Czapeck comme le meilleur milieu de production, utilisé pour l'étude de l'optimisation de la production de la streptazoline. La modélisation de la production de la streptazoline par le biais du plan composite centré a été réalisée en sélectionnant quatre facteurs comme variables: l'amidon, le NaNO_3 , le K_2HPO_4 et le temps d'incubation. La modélisation statistique et mathématique entreprise dans le but de sélectionner les paramètres influençant cette production ainsi que leurs interactions et leur optimisation pour une production maximale de la streptazoline a été réalisée. Les résultats obtenus ont montré que l'interaction la plus importante sur la concentration de la streptazoline est donnée par le couple ($[\text{NaNO}_3]$ - temps d'incubation). Les concentrations optimales des facteurs influençant ont été délimitées par le tracé des courbes isoréponses et leurs valeurs : amidon (10 g/L), NaNO_3 (1 g/L), K_2HPO_4 (1 g/L) et enfin le temps d'incubation (4 jours).

Mots-clés : Optimisation, Streptazoline, *Streptomyces*, Plan d'expériences, Plan composite centré, Molécules bioactives.

Abstract

The present work focuses on the study of the streptazolin production optimization by an actinomycete strain isolated from river sediments sampled from Ziam Mansouriah region (Jijel). Morphological study of the isolate allowed to link the strain to *Streptomyces* genus, and the name *Streptomyces* sp.SRC3 was attributed. Antimicrobial activity determination on three culture media by the agar cylinders method, allowed the selection of Czapeck medium as the best production medium.

Modeling the streptazolin production through full central composite design was performed by selecting for factors as variables : starch, NaNO_3 , K_2HPO_4 , and incubation time. The statistical and mathematical Modeling used to select parameters affecting the production and the interactions as well as the optimization for maximum production of streptazolin was studied. According to the obtained results, the most important interactions on streptazolin concentration is ($[\text{NaNO}_3]$ -incubation time).

The optimal concentrations of the influencing factors were determined by the layout of isoresponse curves, giving the following values : Starch(10 g/l), NaNO_3 (1 g /l), K_2HPO_4 (1 g/l) and finally the incubation time (4 days)

Keywords : Optimization, Streptazolin, *Streptomyces*, Design of experiment, Central composite design, Bioactive compound.