

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



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Microbiologie

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

Thème

***Optimisation des paramètres de culture pour la
production d'antibiotiques par une souche
d'actinomycète « Streptomyces sp » en utilisant un
plan factoriel complet avec interactions***

Présenté par :

M^{elle} : REZZOUK Sarra

M^{elle} : TAKKA Lydia

Devant le jury :

Présidente : M^{me} BOUCHERBA Nawel (MCB, Université A.MIRA/ Bejaia).

Examinatrice : M^{me} BOUCHACHI Samira (MCB, Université A.MIRA/ Bejaia).

Examinatrice : M^{elle} DJINNI Ibtissem (MAA, Université A.MIRA/ Bejaia).

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

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

Promotion : 2013- 2014



Dédicaces Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

- *La mémoire de notre cher ami Hammar Mounir*
- *Mes très chers parents que j'aime beaucoup, pour leur aide et leurs soutiens durant toute ma vie.*
 - *Ma chère soeur Zoulikha*
 - *Mon très cher frère Menad*
- *A toute ma famille sans exception, oncles, cousins et cousines.*
- *A tous mes amis(es) : Hacene, Lydia, Dahvia, Nadia, Wiza, Nounou, Koukou, Djigo et Amirouche.*
- *A toute la promotion « Biotechnologie Microbienne »*
2013/2014

Sarra





Dédicaces Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail avant tout à
la mémoire de notre cher ami Hammar Mounir.*

*-Aux êtres qui me sont très chers : mon père et ma mère
pour leur patience, leurs encouragements et leur soutien
inconditionnel.*

-À mes très chers frères : Nonor et Karim.

-À ma chère sœur Sonia.

-À mon cher Malek,

*-À toute ma famille sans exception, oncles, cousins et
cousines.*

*-À tous mes amis(es) : Sarra, Dahvia, Naima, manel,
Amel, Fouzia, Nadia, Koukou, Djigo, Amirouche et al.*

*-À toute la promotion « Biotechnologie Microbienne »
2013/2014*

LYDIA



Remerciements

*Tout d'abord, on remercie Dieu, le Généreux qui nous a
donné la force afin d'accomplir ce modeste travail*

*Nous tenons à remercier en premier lieu notre promotrice Mme BOUDRIES.
de nous avoir encadré et orienté.*

*Nos remerciements s'adressent à Mme ARKOUB, notre Co-promotrice Qui nous
a prodigué de précieux conseils.*

*Nous exprimons aussi nos remerciements à tous les membres du jury d'avoir
accepté d'examiner ce travail.*

*Mme BOUCHERBA Nawel, qui a bien voulu nous faire l'honneur de présider
ce jury
et examiner ce travail, qu'elle reçoit, ici, l'expression de notre profonde gratitude.*

*Mme BOUHACHI Samira et M^{elle} DJINNI Ibtissem, qui ont bien voulu nous
faire l'honneur
d'examiner ce travail, qu'elles reçoivent, ici, l'expression de notre profonde
gratitude.*

*On tient à remercier également tous les gens qui nous ont
aidé de près ou de loin à réaliser ce travail notamment Mr MESSIS Aziz et Mr
BETACHE Azzedine. Il nous est agréable
de leur exprimer notre reconnaissance et notre profond respect.*

MERCI

M^{elle} REZZOUK Sarra

M^{elle} TAKKA Lydia

Sommaire

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I. Rétrospective sur les actinomycètes.....3

I.1. Généralités sur les actinomycètes 3

I.2. Importance des actinomycètes..... 4

II. Antibiotiques6

II.1. Influence des sources nutritionnelles sur la production d'antibiotiques 6

II.1.1. Source de carbone..... 6

II. 1.2. Source d'azote 7

II.3. Influence des conditions de culture 7

III. Plans d'expériences.....8

III.1. Définition d'un plan d'expériences 8

III.2. Objectifs d'un plan d'expériences..... 8

III.3. Quelques nomenclatures 8

III.4. Modélisation..... 9

III.5. Modèle polynomial de premier degré 10

Chapitre II : Matériel et méthodes

I. Matériel.....11

I.1. Matériel analytique.....13

I.2. Les milieux de culture 11

I.3. Matériel biologique..... 11

II. Méthodes.....12

II.1. Modélisation de la production d'antibiotiques 12

II.2. Test des cylindres d'agar 13

II.3. La matrice des expériences..... 14

Chapitre III : Résultats et discussion

Sommaire

I. Macromorphologie.....	16
II. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des deux souches étudiées.....	16
III. Modélisation de l'activité antifongique de la souche S₁₀ par un plan factoriel complet avec interactions.....	19
III.1. Calcul des coefficients du modèle	22
III.2. Analyse statistique de l'équation de régression	22
IV. Etude des effets et des interactions des différents paramètres.....	26
IV.1. Effets linaires	26
IV.2. Etude des interactions	27
V. Optimisation.....	31
Conclusion.....	36
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste des figures

Figure N°	Titre	page
1	Domaine de variation du facteur	8
2	Activité de la souche S ₁₀ à l'égard des germes cibles sur les 17 milieux MEM	18
3	Activité de la souche S ₁₉ à l'égard des germes cibles sur les 17 milieux MEM	18
4	Photographies des résultats des testes des cylindres d'agar pour S ₁₀ sur <i>Candida albicans</i>	19
5	Représentation graphique de l'interaction 1-2 ([amidon]-[extrait de levure]) pour l'activité antifongique de la souche S ₁₀	28
6	Représentation graphique de l'interaction x1-x4([amidon]-pH) pour l'activité antifongique de la souche S ₁₀	28
7	Représentation graphique de l'interaction x2-x3 ([extrait de levure]-[peptone]) de l'activité antifongique de la souche S ₁₀	29
8	Représentation graphique de l'interaction x2-x4 ([extrait de levure]-pH) de l'activité antifongique de la souche S ₁₀	29
9	Représentation graphique de l'interaction x3-x4 ([peptone]-pH) de l'activité antifongique de la souche S ₁₀	31
10	Courbe isoréponse (a) et surface de réponse (b) pour : x ₂ =0, x ₃ =0	32
11	Courbe isoréponse (a) et surface de réponse (b) pour : x ₂ =-1, x ₃ = -1	32
12	Courbe isoréponse (a) et surface de réponse (b) pour : x ₂ =1, x ₃ =1	33
13	Courbe isoréponse (a) et surface de réponse (b) pour : x ₂ =1, x ₃ = -1	34
14	Courbe isoréponse (a) et surface de réponse (b) pour : x ₂ =-1, x ₃ =1	34

Liste des tableaux

Tableau N°	Titre	Page
I	Quelques exemples d'agents antibiotiques produits pas les actinomycètes	5
II	liste des germes cibles utilisés	11
III	Valeurs extrêmes des paramètres opératoires étudiés	12
IV	Composition et pH des milieux MEM préparés	13
V	Matrice donnée par le plan factoriel complet pour l'optimisation du milieu MEM	14
VI	Caractères morphologique de la souche S ₁₀ , au 8 ^{ème} jours de la croissance sur les différents milieux MEM	Annexe II
VII	Caractères morphologique de la souche S ₁₉ , au 8 ^{ème} jours de la croissance sur les différents milieux MEM	Annexe II
VIII	Valeurs extrêmes des paramètres opératoires étudiés	20
IX	Matrice d'expériences pour k =4 et N=16	20
X	Valeurs des zones d'inhibition au centre du domaine d'étude	21
XI	Valeurs des coefficients de régression	22
XII	Valeurs de t _j	23
XIII	Valeurs moyennes du diamètre de la zone d'inhibition du couple 1-2 [amidon]-[extrait de levure]	Annexe III
XIV	Valeurs moyennes du diamètre de la zone d'inhibition du couple 1-4 [amidon]-pH	Annexe III
XV	Valeurs moyennes du diamètre de la zone d'inhibition du couple 2-3 [extrait de levure]-[peptone]	Annexe III
XVI	Valeurs moyennes du diamètre de la zone d'inhibition du couple 2-4 [extrait de levure]-pH	Annexe III
XVII	Valeurs moyennes du diamètre de la zone d'inhibition du couple 3-4 [peptone]-pH	Annexe III

Liste des abréviations

ADNr : Acide Désoxyribonucléique ribosomique.

ATCC : American Type Culture Collection.

DAB : Acide Diamino Butyrique.

DAP : Acide Diamino Pimélique.

GC% : Pourcentage Guanine-Cytosine.

LMA : Laboratoire de Microbiologie Appliquée.

MEM : Mincer Eau de Mer.

MH : Mueller Hinton.

PBD : Plaquette Burman Design.

RSM : Response Surface Methodology.

SARM : *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méthiciline.

U. F. C/ml : Unité Formant Colonie par Millilitre.

Introduction

Introduction

Depuis les temps les plus reculés, l'Homme a utilisé des micro-organismes pour préparer des boissons, des aliments. Bien que l'existence de ceux-ci n'ait été reconnue et étudiée qu'au XIXe siècle. Au siècle dernier, les micro-organismes, à mesure de leur découverte menaçant la santé, l'alimentation et les biens de l'Homme. Avec le progrès des connaissances, il paraît que les micro-organismes peuvent aider l'homme en agriculture, dans l'environnement et dans les industries.

Des réalisations telles que la biosynthèse de substances d'intérêt thérapeutique (les antibiotiques...) ou des vaccins antiviraux, révolutionnent certains traitements en médecine.

Parmi ses microorganismes, les bactéries de la famille des actinomycètes semblent être d'excellents candidats pour la production de substances à propriétés intéressantes. Ces bactéries forment le groupe de procaryote le plus important dans la nature (Lacey, 1997). Le genre *Streptomyces* secrète plus de 80% (cité par boughachich et *al* 2005). Ces bactéries sont aussi utilisées dans de nombreux processus biotechnologiques pour la production de diverses molécules bioactives (Boudjella, 2007).

L'exploration des écosystèmes à conditions extrêmes (température, pH, aération ou stress osmotique) favorise la découverte d'actinomycètes pouvant, éventuellement, avoir un potentiel d'activité antibactérienne et/ou antifongique important (Willams et cross, 1971). En outre, des efforts continus sont déployés pour la diminution de son coût de production par l'optimisation des milieux de culture.

La production de métabolites secondaires est influencée par divers facteurs environnementaux, y compris les éléments nutritifs (azote, phosphore et source de carbone), le taux de croissance et les conditions variables (approvisionnement en oxygène, la température, la lumière et le pH) (Augustine et *al.*, 2004 ; Lin et *al.*, 2010 ; Ruiz et *al.*, 2010). Toutefois, des études d'optimisation doivent être réalisées afin d'améliorer cette production, ceci en déterminant les conditions physiologiques et nutritionnelles amenant à une production maximale (Singh et *al.*, 2009 et Vijayakuma et *al.*, 2010).

La conception statistique expérimentale est la méthode la plus efficace pour déterminer les valeurs optimales des facteurs opératoires (Niladevi et *al.*, 2009). C'est dans ce contexte que s'inscrit notre étude.

Nous nous sommes fixés pour objectif l'optimisation de la production d'antibiotiques par deux souches d'actinomycètes appartenant au genre *Streptomyces*, par la modélisation en utilisant la méthodologie des plans d'expériences.

Nous avons adopté l'approche méthodologique suivante :

La première partie est bibliographique et concerne certaines généralités sur les actinomycètes et leur systématique. Des notions fondamentales relatives aux plans d'expériences seront présentées ainsi que la stratégie expérimentale pour obtenir un modèle linéaire avec interactions.

La deuxième partie est expérimentale et concerne :

Dans un premier temps, nous avons suivi la croissance des deux souches S_{10} et S_{19} sur les différents milieux Minceur Eau de Mer (MEM) avec les différentes concentrations d'amidon, d'extrait de levure, de peptone et enfin du pH du milieu et une présélection des deux souches étudiées sur les différents germes cibles par la méthode des cylindres d'agar. Ensuite, une modélisation de l'activité antibiotique par le biais d'un plan factoriel complet avec interactions est réalisée pour la détermination des conditions optimales des variables choisies.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

I. Rétrospective sur les actinomycètes

I.1. Généralités sur les actinomycètes

Le nom Actinomycète dérive du grec actinon et mycètes qui signifie « champignon rayonnant » (Gottlieb, 1973). Ils ont été longtemps exclus de l'ensemble des bactéries et confondus avec les champignons du fait de l'allure mycosique des maladies qu'ils provoquent (Hirvonen et *al.*, 1997 ; Gazonko et *al.*, 1998) et aussi de leur morphologie, parfois fungoïdes : filaments ramifiés, organe de sporulation...etc. (Becker et *al.*, 1965 ; Reponen et *al.*, 1998). Ce problème est résolu et ce groupe de microorganismes est définitivement classé parmi les bactéries (Becker et *al.*, 1965 ; Lechevalier et Lechevalier, 1981). Les actinomycètes n'ont pas de membrane nucléaire et possèdent des organites flagellaires, ressemblant à ceux des bactéries. Ils sont sensibles au lysozyme et aux agents antibactériens (Gottlieb, 1973)

Les actinomycètes sont des bactéries à Gram positif (Williams et *al.*, 1993 ; Sanglier et Trujillo, 1997) dont le coefficient de Chargaff (GC%) est supérieur à 55%, généralement compris entre 60 et 75% (Ensign, 1978 ; Larpent et Sanglier, 1989 ; Williams et *al.*, 1993 ; Chun et *al.*, 1997 ; Sanglier et Trujillo, 1997). Leur paroi cellulaire ne renferme ni chitine ni cellulose mais une glycoprotéine contenant de la lysine ou de l'acide diaminopimélique (DAP) et leur cytologie est celle des bactéries (Lechevalier et Lechevalier, 1985 ; Mariat et Sebald, 1990). Le DAP peut être sous deux formes isomériques LL ou DL, il peut être parfois remplacé par la lysine, l'ornithine ou le diaminobutyrique (DAB) (Becker et *al.*, 1965). En plus du DAP ou la lysine, la paroi des actinomycètes peut contenir de la glycine (Lechevalier et Lechevalier, 1970).

Les actinomycètes possèdent une structure des procaryotes, mais un cycle biologique semblable à celui de certains champignons (Floyd et *al.*, 1987 ; Sanglier et Trujillo, 1997). Ce sont des bactéries dont la croissance donne lieu à des colonies circulaires (Eunice et Prosser, 1983) constituées d'hyphes, c'est-à-dire de filaments qui irradient par croissance centrifuge tout autour du germe qui leur a donné naissance (Gottlieb, 1973 ; Lechevalier et Lechevalier, 1981 ; Eunice et Prosser, 1983). Elles tendent à croître lentement comme des filaments ramifiés ayant un diamètre des hyphes plus petit que celui des champignons (0,5-1,0 µm de diamètre) (Gottlieb, 1973 ; Eunice et Prosser, 1983). Leur croissance est plus lente que celle des autres bactéries et leur temps de génération moyen est d'environ 2 à 3 heures (Ottow et Glathe, 1968 ; Larpent et Sanglier, 1989).

Les actinomycètes sont des microorganismes ubiquitaires que l'on rencontre sur tous les substrats naturels courants : « air, fumier, composte, foins débris végétaux, sédiment marins, sols pollués...etc. (Waksman, 1959 ; Porter, 1971 ; Lacey, 1973 ; Williams et *al.*, 1984). Ces microorganismes sont surtout présents dans la couche comprise entre la surface du sol et jusqu'à 2 m de profondeur. Ils produisent des substances spécifiques telles que la géosmine et le 2-méthyl isobornéol qui sont responsables de l'odeur d'humus caractéristique des sols (Omura, 1992 ; Zaitlin et *al.*, 2003).

Les actinomycètes appartiennent au phylum des *Actinobacteria*, qui renferme une seule classe *Actinobacteria* qui est subdivisée en 5 classes, 6 ordres, 4 sous ordres (dont 10 appartiennent à l'ordre des *Actinomycetales*), 44 familles et 163 genres (dont 139 appartiennent à l'ordre des *Actinomycetales*) (Bergey's, 2012).

I.2. Importance des actinomycètes

Les actinomycètes forment un grand groupe de procaryote, le plus important dans la nature (Lacey, 1997) présentant de nombreux intérêts au niveau industriel, médical et environnemental (Behal, 2003 ; Overbye et Barrett, 2005 ; Baltz, 2008).

Les actinomycètes sont particulièrement intéressants pour leur haute capacité à produire de différents métabolites secondaires avec diverses structures chimiques (Valan Arasu et *al.*, 2008), il a été estimé qu'environ les deux tiers des antibiotiques naturels ont été sécrétés par les actinomycètes (Xue, 2009), et environ 75% à 80% de ces molécules très exploitées sont produites par le genre *Streptomyces* (Solanki et *al.*, 2008 ; Badji et *al.*, 2009). Ce genre est alors la source la plus importante d'antibiotiques (Okami et Hotta, 1988 ; Long et Wildman, 1993 ; Sanchez, 1996 ; Hwang et *al.*, 2001) et à partir de 1955, il devient et va rester le grand fournisseur d'antibiotiques nouveaux (Hwang et *al.*, 2001) bien que d'autres structures nouvelles soient isolées des autres genres rares comme *Actinomadura* (Sanglier et *al.*, 1993). Le tableau I illustre quelques exemples d'antibiotiques produits par les actinomycètes.

Tableau I : Quelques exemples d'agents antibiotiques produits par les actinomycètes

Actinomycètes producteurs	Antibiotiques	Références
1/ Les agents antibactériens		
<i>Streptomyces griseus.</i>	Candicidine	Jinenez et al., 2009
<i>Streptomyces lydicus.</i>	Streptolydigne	Liu et al., 2007
<i>Streptomyces lindensis.</i>	Rétamycine	Inoue et al., 2007
<i>Marinispora</i> sp.	Marinomycine	Sturdiková et Sturdik, 2009
<i>Verrucosipora</i> sp.	Abyssomycine	Sturdiková et Sturdik, 2009
2/ Les agents antifongiques		
<i>Streptomuces griseochromogenes</i>	Blasticidine	Fukunaga et al., 2008
<i>Nocardia transvalensis</i>	Transvalencine	Mukai et al., 2006

En ce qui concerne l'activité antifongique des actinomycètes, elle ne se limite pas seulement aux champignons filamenteux mais s'étend aux levures et aux dermatophytes. A titre d'exemple, la souche *Streptomyces mutabilis* présente une activité anticandidale envers *Candida albicans* (Sanasam et Ningthoujam, 2010), et la souche *Streptomyces rochei* présente une activité anti dermatophytique vis-à-vis du dermatophyte *Trichophytum rubrum* (Lakshmiathy et Krishnan, 2009).

Les actinomycètes sont aussi une source de substances antitumorales (actinomycine, adriamycine, rebeccamycine, mitomycine et dannomycine), insecticides (mikkomycine), pesticide (antimycine A), herbicides (phinotricine) et de substances ayant des activités immunosuppressives et immunostimulantes (la rapamycine) (Chun et al., 1997; Sanglier et Trujillo, 1997; Moor et al., 1999; Petrosyan et al., 2003)

Les enzymes viennent en seconde place après les antibiotiques (Lops et *al.*, 1999), comme les protéases, les lipases, les cellulases, les amylases, les pectinases et les xylanases (Vonothini et *al.*, 2008 ; Syed et *al.*, 2009). Les actinomycètes ont également un rôle écologique, ils possèdent la capacité de dégrader des molécules complexes non dégradées par les champignons ou les autres bactéries, contribuant ainsi à la fertilisation des sols.

II. Aantibiotiques

Un antibiotique est tout composé microbien, qui même à de très faibles concentrations, inhibe ou tue certains microorganismes. On l'emploie maintenant dans un sens plus large pour inclure en outre toute substance synthétique ou semi-synthétique dotée de ces propriétés (Singleton, 1994).

La streptomycine fut isolée à partir de *Streptomyces griseus* en 1943, le chloramphénicol à partir de *Streptomyces venezualae* en 1947, la chlortétracycline à partir de *Streptomyces aureofaciens* en 1948, l'érythromycine à partir de *Streptomyces erythreus* en 1952. (Slee et *al.*, 1987; Swaney et *al.*, 1989).

II.1. Influence des sources nutritionnelles sur la production d'antibiotiques

La nature et la concentration de certains composants du milieu de culture ont un effet remarquable sur la production des métabolites secondaires biologiquement actifs, entre autre chez les actinomycètes. Parmi les sources nutritionnelles, les sources de carbone, d'azote et de phosphate affectent fortement cette production. L'épuisement de ces sources pourrait déclencher l'initiation de la synthèse d'antibiotique en permettant de lever la régulation négative exercée par ces nutriments (Strub, 2008).

II.1.1. Source de carbone

La production spécifique de métabolites secondaires s'avère souvent meilleure sur une source de carbone complexe, plus difficilement métabolisable comme les disaccharides (amidon, dextrines) (Lebrihi et *al.*, 1988 ; Lounès et *al.*, 1995), les oligosaccharides (fructose, galactose et lactose) (Basak et Majumdar, 1973) ou les huiles (méthyloléate, huile de soja) (Park et *al.*, 1994), que sur une source de carbone rapidement assimilable telle que le glucose ou le glycérol.

Chez beaucoup de microorganismes, le glucose provoque une répression de la formation de plusieurs antibiotiques amino-glycosidiques produits par les actinomycètes

(streptomycine, kanamycine, istamycine et néomycine) par une répression des enzymes de biosynthèse (Demain, 1989 ; Piepersberg et Distler, 1997).

Chez certains microorganismes, l'effet inhibiteur du glucose sur la production des métabolites est dû à l'acidification suite à l'accumulation des acides organiques (Solé et *al.*, 2000).

II. 1.2. Source d'azote

Les sources les plus favorables à la production de métabolites secondaires sont les acides aminés et les sources complexes d'azote qui supportent une croissance lente et une assimilation progressive de l'azote. Cependant, le choix de certains acides aminés comme source d'azote peut aussi entraîner une forte diminution de la production de métabolites secondaires surtout lorsqu'ils sont ajoutés en excès (Castro et *al.*, 1985 ; Untrau et *al.*, 1994 ; Lounès et *al.*, 1995). Cet effet négatif de certains acides aminés sur la production d'antibiotique peut être attribué à l'ammonium produit par leur catabolisme (Untrau et *al.*, 1994 ; Lounès et *al.*, 1995). En effet, dans de nombreux cas, la formation des précurseurs est inhibée par l'ammonium (Omura et *al.*, 1984 ; Tanaka et *al.*, 1986).

II.2. Influence des conditions de culture

Les facteurs physico-chimiques comme le pH, la température, l'agitation et le temps d'incubation affectent la biosynthèse des métabolites secondaires.

Depuis longtemps, l'influence du pH sur la production de plusieurs métabolites organiques du métabolisme secondaire a été démontrée. En effet, la production d'un antifongique par la souche *S.rochei* AK39 peut être stimulée ou inhibée par des variations de pH (Augustine et *al.*, 2005).

Concernant l'effet de la température, Doull et collaborateurs (1993) ont montré qu'un choc thermique d'une heure induit la production de jadomycine B chez *S. venezualae*.

III. plans d'expériences

III.1. Définition d'un plan d'expériences

Un plan d'expériences est une stratégie optimale permettant de prédire avec le maximum de précision une réponse à partir d'un nombre minimal d'essais et en utilisant un modèle postulé (Ozil, 1997).

III.2. Objectifs d'un plan d'expériences

Un plan d'expériences sert à :

- Optimiser l'organisation des essais tout en diminuant le nombre d'essais.
- Donner une meilleure précision des résultats.
- Déduire les paramètres influençant.
- Evaluer les effets des interactions entre les paramètres.
- Modéliser les résultats expérimentaux. (Goupy, 1999 ; Antony, 2003).

III.3. Quelques nomenclatures

III.3.1. Un facteur : c'est la variable étudiée ; sensée influencer sur les variations de la réponse, il peut varier entre une borne inférieure que l'on note souvent par **-1 « niveau bas »** et une borne supérieure que l'on note par **+1 « niveau haut »**. Ce facteur peut prendre plusieurs niveaux à l'intérieur de son domaine de variation, il est noté par la lettre x accompagné d'indice indiquant le nom du facteur (Goupy, 1999 ; Goupy, 2005).

Exemple : x_1 c'est le facteur 1

III.3.2. Domaine de variation : c'est l'ensemble de toutes les valeurs que peut prendre le facteur entre le niveau bas et le niveau haut. On l'appelle aussi domaine du facteur (figure1).

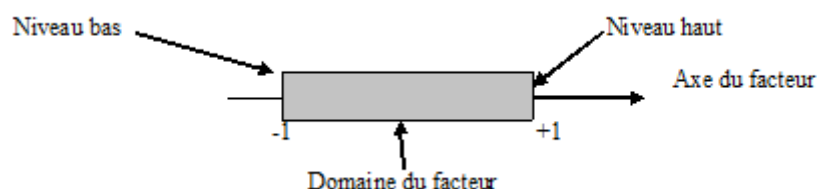


Figure 1: Domaine de variation du facteur (Goupy, 1999)

III.3.3. Domaine d'étude : c'est l'ensemble des domaines de variation de chaque facteur, il est la partie de l'espace expérimental retenu pour faire ces essais (Goupy, 1999).

III.3.4. Réponse (grandeur étudiée) : c'est les grandeurs qui intéressent l'expérimentateur et qui sont mesurées à chaque expérience (Goupy, 1999 et Goupy, 2005).

III.3.5. Variable centrée réduite : c'est une variable qui permet le passage des variables d'origine aux variables centrées réduites x . Elle est donnée par la formule suivante :

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

Tels que : $Z_j^0 = \frac{Z_{j\max} + Z_{j\min}}{2}$ (2) et $\Delta Z_j = \frac{Z_{j\max} - Z_{j\min}}{2}$ (3)

x_j est la variable centrée réduite correspondant à la variable naturelle Z_j .

Le point de coordonnées $(Z_1^0, Z_2^0, \dots, Z_k^0)$ est dénommé centre du plan ; ΔZ_j est l'unité ou intervalle de variation suivant l'axe des Z_j . $Z_{j\min}$ et $Z_{j\max}$ sont les niveaux inférieur et supérieur des facteurs qui constituent les frontières du domaine d'étude (Ozil, 1997 ; Ravikumar et al., 2005).

III.4. Modélisation

La modélisation est l'objet même du plan d'expériences, elle permet une fois que les facteurs influents sont identifiés, de trouver la forme de cette influence et l'équation ou la fonction qui décrit les variations du phénomène étudié en fonction des facteurs influents (Ozil, 1997 ; Antony, 2003 ; Arkoub, 2013)

$$\hat{y} = b_0 + \sum_{j=1}^k b_j x_j + \sum_{\substack{u, j=1 \\ u \neq j}}^k b_{uj} x_u x_j + \sum_{j=1}^k b_{jj} x_j^2 \dots \tag{4}$$

Où x_j sont les coordonnées des facteurs Z_j exprimés en variables centrées réduites, ($j = 1, \dots, k$). \hat{y} est la réponse estimée (valeur prédite par le modèle) de y (valeur expérimentale). Chaque valeur expérimentale y_i est sujette aux erreurs aléatoires ϵ_i à distribution normale telle que :

$$y_i = \hat{y}_i + \epsilon_i \dots \tag{5}$$

On appelle les coefficients :

b_0 : Terme constant de l'équation de régression.

b_j : Effets linéaires.

b_{uj} : Effets d'interactions.

b_{jj} : effets quadratiques.

III.5. Modèle polynomial de premier degré

III.5.1. Plan factoriel complet à deux niveaux 2^k

Les plans factoriels à deux niveaux sont basés sur le principe que dans bien des cas, on admet que la réponse est linéaire quand un facteur passe d'un niveau minimal à un niveau maximal. Il suffit alors d'étudier seulement ce qui se passe aux bords du domaine de variation du facteur. Le nombre d'expériences (N) à réaliser est fonction du nombre (k) de paramètres (facteurs) : $N = 2^k$ (Benoit et *al.*, 1994 ; Goupy, 1999 ; Antony, 2003).

III.5.2. Calcul des coefficients du modèle

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

$$b_j = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_{ji} y_i \quad , \quad j=0,1,\dots,k \quad (6)$$

et celles des coefficients d'interaction par :

$$b_{uj} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_u x_j)_i y_i \quad , \quad j=1,\dots,k \quad , \quad u = 1,\dots,k \quad j \neq u \quad (7)$$

$$b_{ujf} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_u x_j x_f)_i y_i \quad (8)$$

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

Chapitre II

Matériel et méthodes

I. Matériel

I.1. Matériel analytique (voire annexe I)

I.2. Les milieux de culture

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

I.3. Matériel biologique

I.3.1. Microorganismes tests « Actinomycètes »

Deux souches d'actinomycètes appartenant à la collection du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA) ont fait l'objet d'une modélisation des paramètres de production d'antibiotique. Ces dernières ont été isolées par M^{me} BOUDRIES à partir d'un échantillon d'eau polluées de la wilaya de Bejaia en Juillet 2010. Il s'agit des souches dénommées S₁₀ et S₁₉ rattachées au genre *Streptomyces*.

I.3.2. Souches cibles

Afin de mettre en évidence l'activité antimicrobienne des deux souches étudiées, cinq bactéries (4 à Gram positif et une à Gram négatif) et une levure sont testées. Les bactéries cibles sont gracieusement offertes par l'Institut Pasteur d'Algérie, quant à la levure elle est gracieusement offerte par l'université de Tiaret. L'ensemble des souches cibles utilisées est mentionné dans le tableau II.

Tableau II : Liste des germes cibles utilisés

Germe cible	Nom de l'espèce	Choix
Gram positif	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Faible génétiquement (marqueur le plus sensible)
	<i>Listeria innocua</i> CLIP 74915	Selon la disponibilité
	SARM ATCC 43300	Résistance à la méthiciline
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Pour sa pathogénéicité
Gram négatif	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Représentant des Gram négatif
Levure	<i>Candida albicans</i>	Pour sa pathogénéicité

II. Méthode

Avant d'entamer l'étude expérimentale, des repiquages sur le milieu Mincer Eau de Mer (MEM) (dont la composition est donnée en Annexe I) des deux souches S_{10} et S_{19} ont été réalisés. Ce milieu a été sélectionné pour la production des antibiotiques des deux souches étudiées suite à une étude préalable effectuée au laboratoire qui la démontrait comme un meilleur milieu de production. Les boîtes sont par la suite incubées à 28 °C pendant 8 jours afin de vérifier la viabilité et la pureté des souches.

II.1. Modélisation de la production d'antibiotiques

Dans le but de déterminer les concentrations optimales en amidon, en extrait de levure en peptone et le pH du milieu MEM permettant une meilleure production d'antimicrobiens par les deux souches d'actinomycètes S_{10} et S_{19} , une étude statistique expérimentale a été réalisée, en utilisant la méthode de la planification des expériences. Un Plan Factoriel Complet avec interactions est appliqué dans cette étude afin de déterminer l'influence de chaque paramètre opératoire sur la réponse étudiée (activité antimicrobienne), d'une part et pour évaluer les effets d'interactions de ces derniers, d'autre part. Les valeurs extrêmes choisies pour les concentrations de la source de carbone, d'azote et le pH sont résumées dans le tableau III.

Tableau III : Valeurs extrêmes des paramètres opératoires étudiés

Paramètres opératoires	Notation	Niveau minimal	le centre	Niveau maximal
La concentration en amidon (g/l)	Z_1	6	10	14
La concentration en extrait de levure (g/l)	Z_2	3	4	5
La concentration en peptone (g /l)	Z_3	1,25	2	2,75
Le pH de la solution	Z_4	5	7	9

Seize milieux MEM (numérotés de 1 à 16) de composition variée sont préparés selon la matrice des expériences donnée par le plan factoriel complet aux quelles s'ajoutent trois essais réalisés au centre du domaine pour la modélisation du milieu MEM (tableau V).

Le pH du milieu a été ajusté avec l'acide chlorhydrique à 1N et avec une base de chlorure de sodium à 1M à l'aide d'un pH-mètre. Les deux souches S₁₀ et S₁₉ sontensemencées sur chacun des milieux et l'incubation des boites est effectuée à 28 °C pendant 8 jours.

Tableau IV : Composition et pH des milieux MEM préparés

MEM	Amidon	Extrait de levure	Peptone	pH
	(g/l)	(g/l)	(g/l)	
	Z ₁	Z ₂	Z ₃	Z ₄
01	6	3	1,25	5
02	14	3	1,25	5
03	6	5	1,25	5
04	14	5	1,25	5
05	6	3	2,75	5
06	14	3	2,75	5
07	6	5	2,75	5
08	14	5	2,75	5
09	6	3	1,25	9
10	14	3	1,25	9
11	6	5	1,25	9
12	14	5	1,25	9
13	6	3	2,75	9
14	14	3	2,75	9
15	6	5	2,75	9
16	14	5	2,75	9
17	10	4	2	7
18	10	4	2	7
19	10	4	2	7

II.2. Test des cylindres d'agar

L'activité antimicrobienne des souches d'actinomycètes est évaluée par la méthode des cylindres d'agar. La charge de l'inoculum utilisé est de 10⁷ UFC/ml (Billerbeck et *al.*, 2002).

Après 8 jours d'incubation à 28 °C des souches S₁₀ et S₁₉ sur les milieux MEM, des cylindres d'agar de 6 mm de diamètre sont découpés stérilement avec un emporte pièce, puis déposés à la surface d'un milieu Muller-Hinton préalablement ensemencé (par écouvillonnage) avec les germes cibles. Les boîtes de Petrie portant les cylindres d'agar sont mises à 4 °C pendant 2 heures pour permettre la diffusion des substances actives éventuellement produites, puis incubées à 37 °C pendant 24 heures. La lecture est effectuée par mesure du diamètre des zones d'inhibitions (en mm) autour des cylindres (le diamètre du cylindre étant pris en compte) à l'aide d'un pied à coulisse.

II.3. La matrice des expériences

Le plan factoriel admet que la réponse est linéaire quand un facteur passe d'un niveau minimal à un niveau maximal symbolisé par les signes (-1, +1) et définissant la valeur basse et haute de chaque facteur respectivement. Ainsi les facteurs choisis ont été analysés à trois niveaux : la concentration minimale, la moyenne et la maximale ce qui donne respectivement -1, 0, +1 (Goupy, 1999). La concentration en amidon a été fixée au centre du domaine à 10 g/l, celle de l'extrait de levure à 4 g/l, le peptone à 2 g/l et pH à 7. Un total de 16 expériences a été livré par ce modèle avec un dix-septième au centre du domaine comme le montre le tableau V ci-dessous :

Tableau V : Matrice donnée par le plan factoriel complet pour l'optimisation du milieu MEM

Milieux MEM	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1
11	-1	+1	-1	+1

12	+1	+1	-1	+1
16	-1	-1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1
15	-1	+1	+1	+1
16	+1	+1	+1	+1
17	0	0	0	0

x_1 : amidon, x_2 : extrait de levure, x_3 : Peptone x_4 : pH

Le modèle mathématique postulé est un modèle à 16 coefficients, il s'écrit sous la forme suivante :

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_4 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{14}x_1x_4 + b_{23}x_2x_3 + b_{24}x_2x_4 + b_{34}x_3x_4 + b_{123}x_1x_2x_3 + b_{124}x_1x_2x_4 + b_{134}x_1x_3x_4 + b_{234}x_2x_3x_4 + b_{1234}x_1x_2x_3x_4 \quad (9)$$

x_1, x_2, x_3 et x_4 sont des variables sans dimensions correspondant respectivement à Z_1, Z_2, Z_3 et Z_4 .

Chapitre III

Résultats et discussions

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Mycologie de l'université A. Mira de Bejaia, de la période allant du 02/2014 au 03/2014, sous la direction de M^{me} BOUDRIES et M^{me} ARKOUB.

Dans cette partie, les résultats de l'influence des différents paramètres de cultures des deux souches d'actinomycètes (S₁₀ et S₁₉) pour la production d'antimicrobiens seront présentés. Nous allons également décrire les étapes de l'élaboration du modèle mathématique décrivant les variations de l'activité antimicrobienne en fonction des conditions opératoires par le biais d'un plan factoriel complet avec interactions.

I. Macromorphologie

Au bout du 8^{ème} jours d'incubation à 28°C, des boîtes de Pétri ensemencées avec les deux souches S₁₀ et S₁₉ sur les 17 milieux MEM. La souche S₁₀ a présenté une bonne croissance ainsi qu'une bonne sporulation sur 14 milieux MEM (1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16 et 17). Tandis qu'une lente croissance de cette souche est notée sur le milieu MEM₈. Cependant, aucune croissance n'est observée sur les milieux MEM₇ et MEM₁₂. Quant à la souche S₁₉, elle a présenté une bonne croissance sur tous les milieux.

Les tableaux VI, VII donnés en annexe II, illustrent l'aspect macromorphologique de la croissance des souches S₁₀ et S₁₉ respectivement ; sur les différents milieux MEM ; au 8^{ème} jour à 28 °C. D'après ces observations, la variation de la concentration des composés du milieu MEM s'avère influencer la croissance des deux souches étudiées .

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

L'activité antimicrobienne est mise en évidence par la technique des cylindres d'agar. Ce test est réalisé sur le milieu Mueller-Hinton vis-à-vis de cultures fraîche des germes cibles : *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Lesteria innocua* CLIP 74915, SARM ATCC 43300, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Candida albicans*. Après 24 h d'incubation des bactéries à 37 °C et 48h pour la levure à la même température, le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré autour des cylindres des 17 milieux pour les deux isolats S₁₀ et S₁₉.

➤ La souche S₁₀

La souche S₁₀ a présenté une activité antibactérienne vis-à-vis de : SARM sur le milieu MEM₃ et MEM₁₅ avec un diamètre de la zone d'inhibition de (9,66 et 13,68 mm)

respectivement, *Listeria innocua*, sur le milieu MEM₂ et MEM₄ avec des zones de (9,59 et 10,39 mm) respectivement et de *Bacillus subtilis* sur le MEM₄ dont le diamètre est de (8,35 mm). Cette souche s'est révélée inactive sur *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. Quand à l'activité antifongique à l'égard de *Candida albicans*, elle est décelée sur tous les milieux (sauf le MEM₇ et le MEM₁₂ car ils n'ont pas marqué de croissance) ainsi que sur le milieu MEM₃, la plus importante zone d'inhibition été marquée sur le milieu MEM₁₁ avec une zone d'inhibition de 25,42 mm.

➤ **La souche S₁₉**

Son activité est notée vis-à-vis de : SARM avec les milieux MEM₁₃, MEM₁₄, MEM₁₆ dont les diamètres des zones d'inhibitions sont de 12,28, 9,02 et 9,81 mm respectivement ,de *Staphylococcus aureus* avec les milieux MEM₁₂ et MEM₁₄ avec des zones de 13,38 et 8,91 mm et enfin une activité antifongique à l'égard de *Candia albicans* sur les milieux MEM₇, MEM₈, MEM₉, MEM₁₀ MEM₁₁ MEM₁₂ avec des diamètres de zones d'inhibitions de 7,83, 11,74, 20,48, 9,10, 10,57 et 9,53 mm respectivement. Cependant aucune activité n'est observée sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et *listeria innocua*. Ces résultats restent insuffisants pour la modélisation donc l'activité de cette souche ne peut pas être modélisée.

Ces résultats montrent que les conditions optimales pour la production des antibiotiques ne sont pas forcément identiques à celles permettant une bonne croissance. Les résultats du test d'activités des souches S₁₀ et S₁₉ vis-à-vis des germes cibles sont représentés dans les figures 2 et 3 ci-dessous.

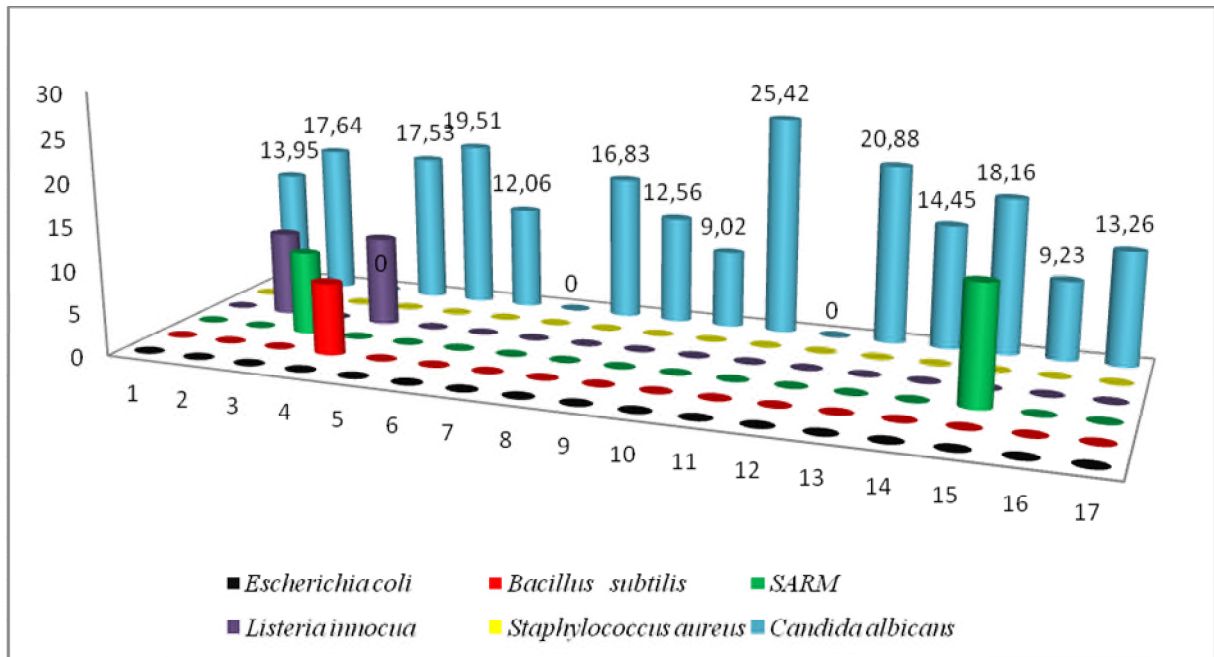


Figure 2 : Activité antimicrobienne de la souche S₁₀ à l'égard des germes cibles sur les 17 milieux MEM

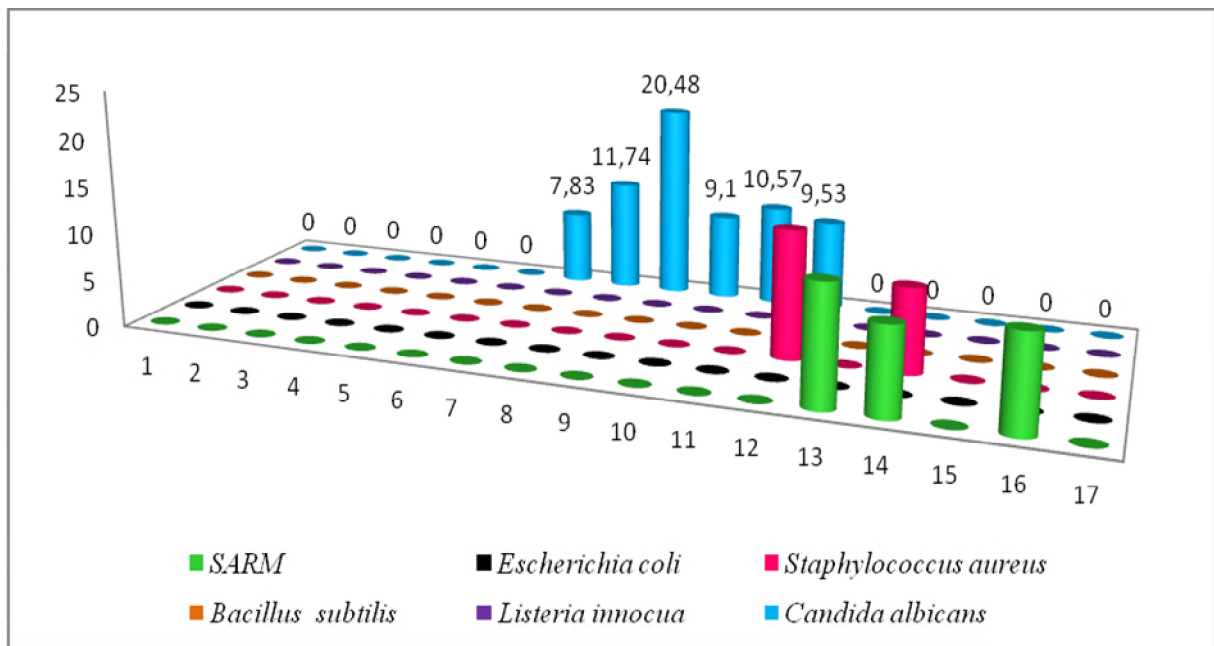


Figure 3 : Activité antimicrobienne de la souche S₁₉ à l'égard des germes cibles sur les 17 milieux MEM.

D'après les résultats obtenus, l'activité de la souche S_{10} s'avère insuffisante sur les bactéries pour la modélisation. Toutefois l'activité contre la levure *Candida albicans* est suffisante pour construire le modèle décrivant ces variations en fonction des différents paramètres opératoires considérés.

Les résultats du test des cylindres d'agar sur *Candida albicans* pour la s_{10} sont illustrés dans la figure 4.

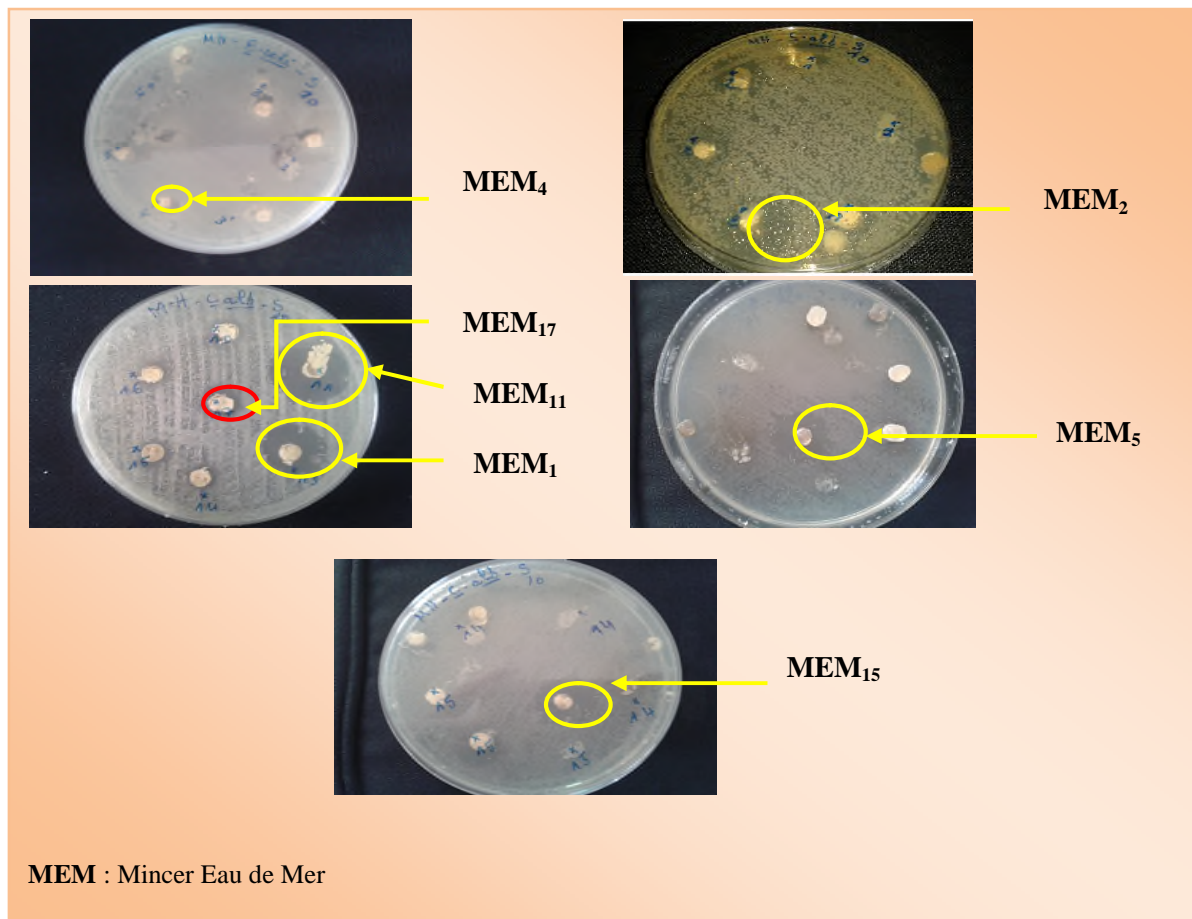


Figure 4 : Photographies des résultats du test d'antagonisme de la souche S_{10} vis-à-vis de *Candida albicans*

III. Modélisation de l'activité antifongique de la souche S_{10} par un plan factoriel complet avec interactions

Les paramètres opératoires (Z_1 , Z_2 , Z_3 et Z_4) considérés pour la modélisation de l'activité de la souche S_{10} à l'égard de *Candida albicans* sont respectivement : la

concentration en amidon, la concentration en extrait de levure, la concentration en peptone et le pH du milieu, dont leurs valeurs sont fixées à celles indiquées sur le tableau VIII.

Tableau VIII : Valeurs extrêmes des paramètres opératoires étudiés

Paramètres opératoires	Notation	Niveau minimal	Niveau maximal
La concentration en amidon (g/l)	Z ₁	6	14
La concentration en extrait de levure (g/l)	Z ₂	3	5
La concentration en peptone (g /l)	Z ₃	1,25	2,75
Le pH du milieu	Z ₄	5	9

Les résultats de l'activité de la souche S₁₀ à l'égard de *Candida albicans* sur les 16 milieux MEM avec des concentrations variables de source de carbone, d'azote et de pH où les valeurs des variables naturelles Z_j codées par x_j des différents paramètres opératoires ainsi que l'activité obtenue pour chaque essai sont regroupés dans le tableau X représentant la matrice des expériences. Le diamètre de la zone d'inhibition (y) est la moyenne des trois zones obtenues à partir des trois disques déposés sur le même germe cible.

Dans notre cas le nombre N de combinaisons possibles des quatre facteurs (k) sur deux niveaux est égal à $2^k = 16$.

Tableau IX : Matrice d'expériences pour k = 4 et N=16

Milieux MEM	Z ₁ (g/l)	Z ₂ (g/l)	Z ₃ (g/l)	Z ₄	x ₀	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	y (mm)
01	6	3	1,25	5	+1	-1	-1	-1	-1	13,95
02	14	3	1,25	5	+1	+1	-1	-1	-1	17,64
03	6	5	1,25	5	+1	-1	+1	-1	-1	0

04	14	5	1,25	5	+1	+1	+1	-1	-1	17,53
05	6	3	2,75	5	+1	-1	-1	+1	-1	19,51
06	14	3	275	5	+1	+1	-1	+1	-1	12,06
07	6	5	2,75	5	+1	-1	+1	+1	-1	0
08	14	5	2,75	5	+1	+1	+1	+1	-1	16,83
09	6	3	1,25	9	+1	-1	-1	-1	+1	12,56
10	14	3	1,25	9	+1	+1	-1	-1	+1	9,02
11	6	5	1,25	9	+1	-1	+1	-1	+1	25,42
12	14	5	1,25	9	+1	+1	+1	-1	+1	0
13	6	3	2,75	9	+1	-1	-1	+1	+1	20,88
14	14	3	2,75	9	+1	+1	-1	+1	+1	14,45
15	6	5	2,75	9	+1	-1	+1	+1	+1	18,16
16	14	5	2,75	9	+1	+1	+1	+1	+1	9,23

x_0 : variable fictive, x_1 : Amidon, x_2 : Extrait de levure, x_3 : Peptone et x_4 : pH

La moyenne des zones d'inhibitions (réponses) des 16 milieux est $\bar{y} = 12,95$ mm.

Le nombre (n_0) d'expériences au centre du domaine expérimental ([Amidon] = 10 g/l, [Extrait de levure] = 4 g/l, [Peptone] = 2 g/l et pH = 7) sont au nombre de 3, les diamètres des zones d'inhibitions ainsi obtenues sont rassemblés dans le tableau X.

Tableau X : Valeurs des zones d'inhibition au centre du domaine d'étude

n_0	1	2	3
y_0 (mm)	13,10	13,50	13,18

La moyenne des zones d'inhibition au centre du domaine est : $\bar{y}_0 = 13,26$ mm.

III.1. Calcul des coefficients du modèle

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

Tableau XI : Valeurs des coefficients de régression

Terme constant	Effets linéaires			
b_0	b_1	b_2	b_3	b_4
12,95	-0,86	-2,06	0,94	0,76

Effets d'interactions										
b_{12}	b_{13}	b_{14}	b_{23}	b_{24}	b_{34}	b_{123}	b_{124}	b_{134}	b_{234}	b_{1234}
0,86	0,11	-4,68	-0,78	1,54	1,03	1,86	-3,91	1,59	-0,69	0,56

III.2. Analyse statistique de l'équation de régression

Après avoir trouvé les coefficients du modèle, on procède à l'analyse statistique des résultats.

III.2.1. Vérification de la signification des coefficients par le test de Student

L'intérêt de ce test est de déterminer si parmi les coefficients du modèle, il existe des coefficients non significatifs, lesquels seront éliminés de l'équation de régression car leur influence sur l'activité antifongique 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** : elle est estimée par celle calculée au centre du domaine expérimental et qui est donnée par la relation suivante :

$$S_{\text{rep}}^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n_0} (y_i - \bar{y}_0)^2}{n_0 - 1} \quad (10)$$

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

\bar{y}_0 : Moyenne des 3 essais au centre ; $\bar{y}_0 = 13,26$ mm

On aura alors : $S_{\text{rep}}^2 = 0,0448$

➤ **le rapport t_j** : Pour identifier les coefficients non significatifs par le test de Student, on

détermine les valeurs de t_j pour chaque coefficient ; $t_j = \frac{|b_j|}{S_{b_j}}$ (11)

Avec : S_{b_j} est l'écart quadratique moyen défini par : $S_{b_j} = \frac{S_{\text{rep}}}{\sqrt{N}} = 0,053$

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

Tableau XII : Valeurs de t_j

Terme constant	Effets linéaires			
t_0	t_1	t_2	t_3	t_4
244,78	16,20	38,86	17,72	14,41

Effets d'interactions										
t_{12}	t_{13}	t_{14}	t_{23}	t_{24}	t_{34}	t_{123}	t_{124}	t_{134}	t_{234}	t_{1234}
16,23	2,08	88,49	14,72	29,17	19,42	35,22	73,82	30,05	13,11	10,56

En utilisant la table de Student relative à un test bilatéral (Annexe IV), on lit la valeur t_α (f) pour un degré de liberté $f = n_0 - 1 = 2$ et pour un niveau de signification $\alpha = 5\%$ est égale à 4,3. D'après les résultats du tableau précédent, on remarque que la valeur de t_{13} (2,08) est inférieure à la valeur tabulée (4,3), alors le coefficient correspondant (x_{13}) n'est pas significatif et il sera donc éliminé de l'équation de régression.

III.2.2. Test de validation de l'équation de régression

a. Recherche du biais

Avant d'accepter le modèle postulé, nous devons vérifier l'absence du biais. Pour cela, on calcule la variance résiduelle qui sera comparée à la variance de reproductibilité par le test de Fisher Snedecor qui permet de conclure (ou non) à l'égalité de ces deux variances (équation 12).

$$F = \frac{S_{\text{rés}}^2}{S_{\text{rep}}^2} \quad (12)$$

La variance résiduelle est donnée par la relation : $S_{\text{rés}}^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N - \ell}$ (13)

\hat{y}_i : Valeur du diamètre de la zone d'inhibition pour chaque milieu donné par le modèle.

Pour $N = 16$ et $\ell = 15$ (ℓ est le nombre de coefficients significatifs), $S_{\text{rés}}^2 = 0,157$

Ce qui donne $F = \frac{0,157}{0,0448} = 3,511$

En utilisant la table de Fisher (Annexe IV) on a la valeur tabulée du test de Fisher pour $F_{0,95}(N - \ell, n_0 - 1) = F_{0,95}(1, 2)$ égale à 18,5 ; comme cette valeur est supérieure à celle calculée $F_{0,95}(3,511)$, alors le modèle est sans biais. Ce qui signifie que tous les paramètres influençant la réponse sont pris en considération par le modèle.

b. Test de signification de la régression

Le modèle étant sans biais, nous pouvons donc effectuer le test de Fisher pour la signification

de la régression par la relation suivante : $F = \frac{\sum_{i=1}^N (\hat{y}_i - \bar{y})^2 / \ell - 1}{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2 / N - \ell} = 402,23$ où

$$\bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^N y_i}{N} = 12,95 \text{ mm}$$

La valeur tabulée du test Fisher pour $F_{0,95}(\ell - 1, N - \ell) = F_{0,95}(14, 1)$ est entre 244 et 246, comme $F_{\text{cal}} > F_{\text{tab}}$ alors le modèle est valide à 95%.

L'équation du modèle s'écrit comme suit :

$$\hat{y} = 12,95 - 0,86x_1 - 2,06x_2 + 0,94x_3 + 0,76x_4 + 0,86x_1x_2 - 4,68x_1x_4 - 0,78x_2x_3 + 1,54x_2x_4 + 1,03x_3x_4 + 1,86x_1x_2x_3 - 3,91x_1x_2x_4 + 1,59x_1x_3x_4 - 0,69x_2x_3x_4 + 0,56x_1x_2x_3x_4$$

c. Validation du modèle par le point au centre

Dans cette étape, on compare la valeur de la zone d'inhibition déterminée par le modèle $\hat{y}(0, 0, 0, 0) = 12,95$ mm à la moyenne des expériences au centre, soit $\bar{y}_0 = 13,26$ mm.

Comme l'erreur relative entre ces deux valeurs est de 2,39 % qui est inférieure à 5 %, on conclut que le modèle linéaire choisi est valide.

d. calcul du coefficient de détermination

Appelé aussi coefficient de corrélation, il est défini par :

$$R^2 = \frac{\text{variation due à la régression}}{\text{variation totale}} ; \quad R^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2} \quad (14)$$

Lorsque l'échantillon est d'étendue assez faible, il est nécessaire d'apporter une correction pour l'erreur systématique. L'estimation de la force de la liaison par le coefficient de corrélation multiple est d'autant plus exagérée que le nombre de degrés de liberté de l'échantillon $f = N - \ell$ est plus petit. La formule de correction est :

$$\bar{R}^2 = R^2 - (1 - R^2) \frac{\ell - 1}{N - \ell} \quad (15)$$

Où \bar{R}^2 est la valeur corrigée du coefficient de régression multiple (Adjabi, 2003 ; Antony, 2003).

➤ La valeur du coefficient de détermination R^2 égal à 1,00.

➤ La valeur corrigée du coefficient de régression multiple \bar{R}^2 égal à 1.

Les valeurs obtenues nous permettent de conclure que le modèle choisi est adéquat.

IV. Etude des effets linéaires et d'interactions des différents paramètres

IV.1. Effets linéaires

D'après le modèle obtenu par l'application d'un plan factoriel complet avec interactions, on remarque que les facteurs opératoires qui ont une influence positive sur l'activité antifongique sont la concentration en peptone (x_3) avec un effet de (+ 0,94) et le pH (x_4) avec un effet de (+0,76), le signe positif de ces derniers indique que leur augmentation favorise l'accroissement de l'activité antifongique.

D'après les travaux de Usha, (2014), l'auteur a trouvé qu'une concentration en peptone de 10 g/l permet d'avoir une très bonne production d'antibiotiques par *Streptomyces tritolerans* DAS 165T, des résultats similaires ont été trouvés par Oskay, (2011) pour la souche *Streptomyces* sp KGG32 et aussi par Usha, (2012) pour la souche *Streptomyces cheonanensis* VUK-A.

Concernant l'effet de pH, nos résultats ont montrés que le pH idéal à notre souche pour la production de métabolites antifongiques est égal à pH 9. Ce résultat concorde avec celui de Singh et al., (2009) qui a conclu que la production maximale d'antibiotiques par la souche *Streptomyces tanashiensis* A2D est obtenue à pH 8 et qui peut même atteindre un pH 9. Il a déjà été démontré que les souches de *Streptomyces* produisaient des antibiotiques contre les bactéries, levures et champignons à des pH alcalins (Basilio et al, 2009). Contrairement à ce qui a été trouvé avec la souche *Streptomyces afghaniensis* VPTS3-1, cette dernière a montré une activité microbienne plus élevée à pH 7 contre *Bacillus subtilis* Vijayakumar et al., (2010), aussi la production d'antibiotiques par la souche *Streptomyces tritolerans* DAS 165T a été obtenue à pH voisin de la neutralité qui est de 7,5 Usha, (2014). Les milieux à pH 7,5 ont été sélectionnés pour une meilleure production d'antibiotiques par *Streptomyces* sp 201 Thakur et al, (2009) et *Streptomyces* sp KGG32 Oskay, (2011).

Toutefois, les facteurs opératoires qui ont une influence négative sur la réponse sont la concentration en amidon (x_1) et celle de l'extrait de levure (x_2).

Le facteur qui a plus d'influence sur l'activité antifongique est la concentration en extrait de levure (x_2) avec un effet négatif de (- 2,06), Le signe négatif de ce dernier indique que l'augmentation de la concentration en extrait de levure de sa valeur minimale (3 g/l) à sa valeur maximale (5 g/l) fait diminuer l'activité antifongique. L'effet négatif obtenu de

l'augmentation de la concentration de l'extrait de levure sur l'activité antifongique à l'égard de *Candida albicans* concorde avec les travaux de Hong et *al.*, (2009) qui ont montré par l'application d'un plan de Plaquette et Burman (PBD) et la méthodologie de surface de réponse (RSM), que l'extrait de levure est un facteur important à effet négatif, et qu'un excès de ce dernier peut bloquer la synthèse d'ivermectine B1a produite par *Streptomyces avermitilis* 14-12A . En ce qui concerne l'effet de la concentration de l'amidon, nos résultats montrent que ; lorsqu'on augmente cette dernière de son niveau minimum (6 g/l) à son niveau maximum (14 g/l) on remarque une légère baisse de l'activité antifongique ce qui implique une diminution de la production de substances antifongiques. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Polpass, (2013) lorsqu'il augmente la concentration de l'amidon de 2 g/l à 15 g/l il a remarqué une légère diminution de la production d'antibiotiques par *Streptomyces* sp JAJ06 ces résultats été obtenus en utilisant RSM qui lui a montré qu'une production d'antibiotiques de 26,8 % peut être atteinte en optimisant son milieu.

IV.2. Etude des interactions

Les interactions entre les différentes concentrations des composants du milieu MEM s'avèrent influencer sur l'activité antifongique. On note que l'interaction la plus importante est celle entre le couple [amidon] (x_1)-pH (x_4), puis vient celle du couple [extrait de levure] (x_2)-pH (x_4), [peptone](x_3)-pH (x_4). Pour les couples [amidon] (x_1)-[extrait de levure] (x_2) et [extrait de levure] (x_2)-[peptone] (x_3) une faible influence est notée par ces interactions.

Les effets d'interactions sont représentés par des diagrammes, qui sont particulièrement commodes pour déterminer la zone du domaine expérimental où l'optimum (la plus forte activité avec une plus grande zone d'inhibition) doit être recherché.

IV.2.1. Interaction 1-2 ([amidon]-[extrait de levure])

Le tableau XIV présenté en annexe IV regroupe les valeurs moyennes des résultats des mesures obtenus pour le couple x_1 - x_2

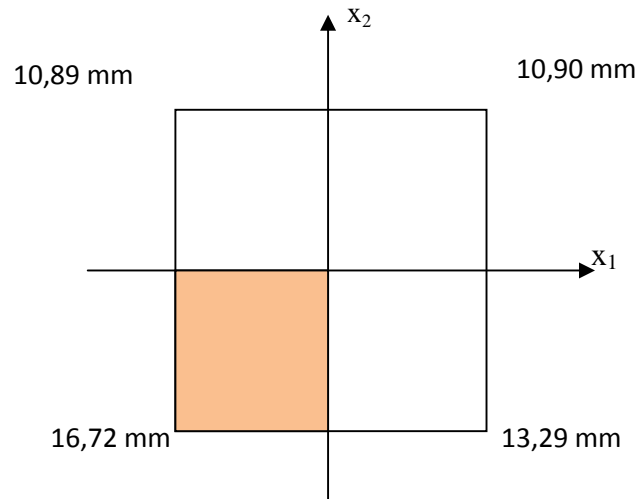


Figure 5 : Représentation graphique de l'interaction 1-2 ([amidon]-[extrait de levure]) pour l'activité antifongique de la souche S_{10}

L'examen du diagramme de l'interaction 1-2 indique qu'un milieu à faible concentration en amidon (6 g/l) et en extrait de levure (3 g/l) conduit à une meilleure activité antifongique (16,72 mm).

IV.2.2. Interaction 1-4 ([amidon]-pH)

Le tableau XVI présenté en annexe IV regroupe les valeurs moyennes des résultats des mesures obtenus pour le couple x_1 - x_4 .

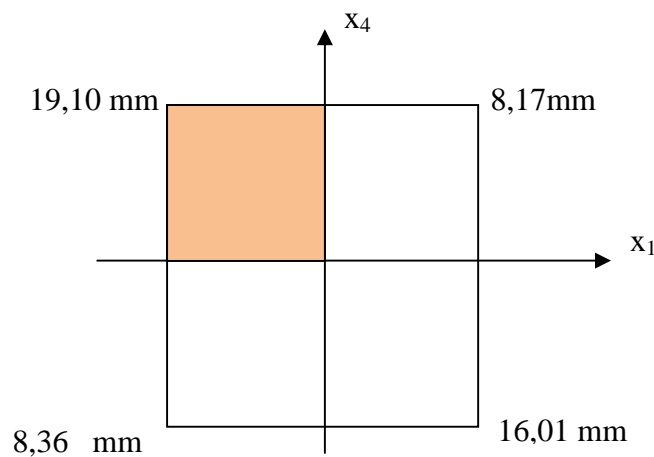


Figure 6 : Représentation graphique de l'interaction x_1 - x_4 ([amidon]-pH) pour l'activité antifongique de la souche S_{10}

A partir du modèle obtenu, nous avons trouvé que l'interaction la plus importante est celle entre la concentration de l'amidon et le pH. En effet, la meilleure activité anti-*Candida albicans* est obtenue avec une faible concentration en amidon (6 g/l) et un pH basique (pH 9).

IV.2.3. Interaction 2-3 ([extrait de levure]-[peptone])

Le tableau XVII présenté en annexe IV regroupe les valeurs moyennes des résultats des mesures obtenus pour le couple x_2 - x_3 .

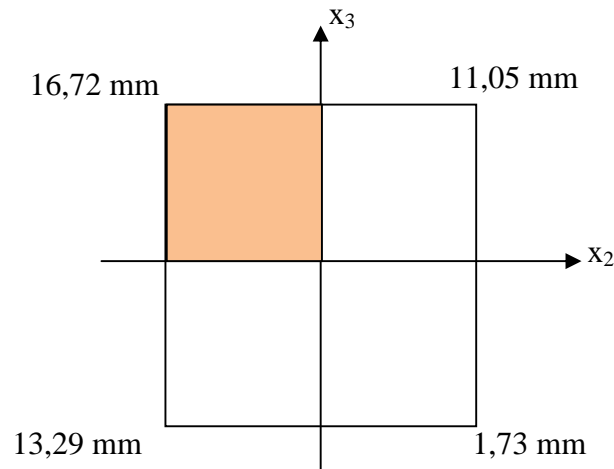


Figure 7 : Représentation graphique de l'interaction x_2 - x_3 ([extrait de levure]-[peptone]) de l'activité antifongique de la souche S_{10}

Il ressort de la représentation graphique de la figure 7 que l'activité antifongique la plus importante est obtenue pour des concentrations minimales en extrait de levure (3 g/l) et de peptone (1,25 g/l).

IV.2.4. Interaction 2-4 ([extrait de levure]-pH)

Le tableau XIX présenté en annexe IV regroupe les valeurs moyennes des résultats des mesures obtenus pour le couple x_2 - x_4

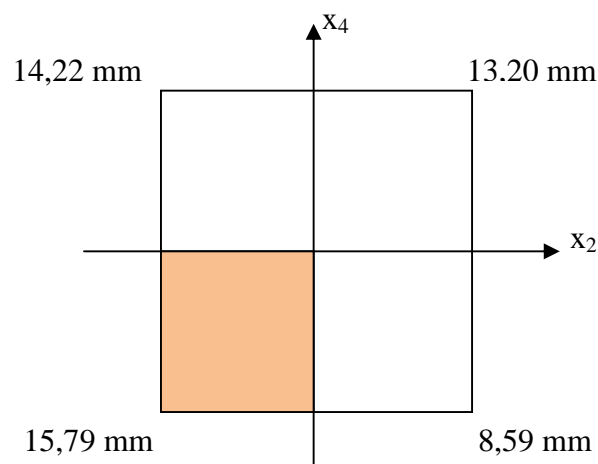


Figure 8 : Représentation graphique de l'interaction x_2 - x_4 ([extrait de levure]-pH) de l'activité antifongique de la souche S_{10}

Le diagramme de la figure 8 montre qu'une forte activité antifongique est obtenue à la faible concentration en extrait de levure (1,25 g/l) et à faible pH (pH 5).

IV.2.5. Interaction 3-4 ([peptone]-pH)

Le tableau XIX présenté en annexe IV regroupe les valeurs moyennes des résultats des mesures obtenus pour le couple x_3 - x_4 .

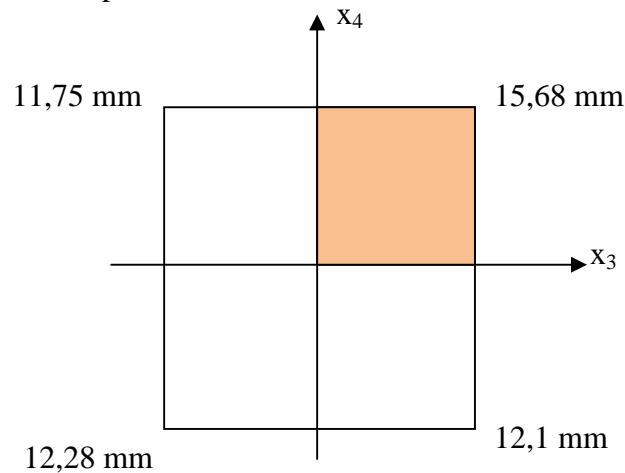


Figure 9 : Représentation graphique de l'interaction x_3 - x_4 ([peptone]-pH) de l'activité antifongique de la souche S_{10}

La représentation graphique montre qu'une forte activité vis-à-vis de *Candida albicans* est obtenue avec un milieu composé de la concentration maximale en peptone (2,75 g/l) et à pH 9.

En comparant les résultats obtenus sur les 16 milieux préconisés par le modèle et ceux obtenus avec le milieu (MEM_{17}) au centre, nous remarquons que les plus importantes activités sont notées avec les milieux ayant l'amidon et/ou l'extrait de levure à leur concentrations faibles (6 g/l et 3 g/l respectivement) il s'agit des milieux MEM (1, 2, 5, 13, 14 et 15) ce qui est confirmé par les résultats des effets linaires. Quant à la concentration du peptone et le pH, les meilleures activités anti-*Candida albicans* (20,88, 14,45 et 18,16 mm) été notées à la concentration maximale du peptone (2,75 g/l) et à pH égale 9, il s'agit des milieux MEM (13, 14, et 15) ceci est démontré dans le résultat des effets linaires ; en augmentant ces paramètres l'activité augmente car ils ont un effet positif.

Tous les facteurs choisis pour les milieux s'avèrent influencer sur l'activité antifongique à l'égard de *Candida albicans*. Ces facteurs sont la source de carbone, d'azote et pH et ils sont généralement considérés comme des facteurs importants du métabolisme, et plusieurs

exemples d'optimisation de la production de métabolites dans différents milieux sont décrites dans la littérature (Purama et Goyal, 2008 ; Yuan et *al.*, 2008).

V. Optimisation

Après l'étape de la modélisation qui a permis d'aboutir à un modèle du premier degré traduisant de manière fiable l'effet de variation des différents paramètres opératoires (la concentration de l'amidon, de l'extrait de levure, du peptone, et le pH) sur l'activité antifongique de la souche S_{10} , on procède à l'optimisation qui consiste à déterminer les valeurs de ces facteurs qui entraînent une meilleure activité de l'opération. En effet, c'est le tracé des courbes isoréponses ou des surfaces de réponses qui permettent de localiser la région du domaine d'étude où cet optimum apparaît, ainsi que toutes les conditions opératoires menant à ce dernier.

➤ Recherche de l'optimum

Rappelons l'équation de régression donnant le diamètre de la zone d'inhibition de l'activité antifongique (\hat{y}) en fonction des différentes concentrations, de l'amidon, de l'extrait de levure, du peptone et de pH différent correspondant respectivement aux variables codées x_1 , x_2 , x_3 et x_4 .

$$\hat{y} = 12,95 - 0,86x_1 - 2,06x_2 + 0,94x_3 + 0,76x_4 + 0,86x_1x_2 - 4,68x_1x_4 - 0,78x_2x_3 + 1,54x_2x_4 + 1,03x_3x_4 + 1,86x_1x_2x_3 - 3,91x_1x_2x_4 + 1,59x_1x_3x_4 - 0,69x_2x_3x_4 + 0,56x_1x_2x_3x_4$$

À partir de cette équation, nous sommes en mesure de déterminer les valeurs optimales des paramètres opératoires conduisant à une zone d'inhibition maximale de l'activité anti *Candida albicans*.

Les surfaces de réponses sont tracées dans le plan (x_1 - x_4) dans le modèle qui correspond à l'interaction la plus importante et cela à l'aide du logiciel MATLAB 7.0. Les autres variables (x_3 , x_4) sont fixées à différents niveaux comme suit :

➤ Pour : $x_2=0$, $x_3=0$

$$\hat{y} = 12,95 - 0,86x_1 + 0,76x_4 - 4,68x_1x_4$$

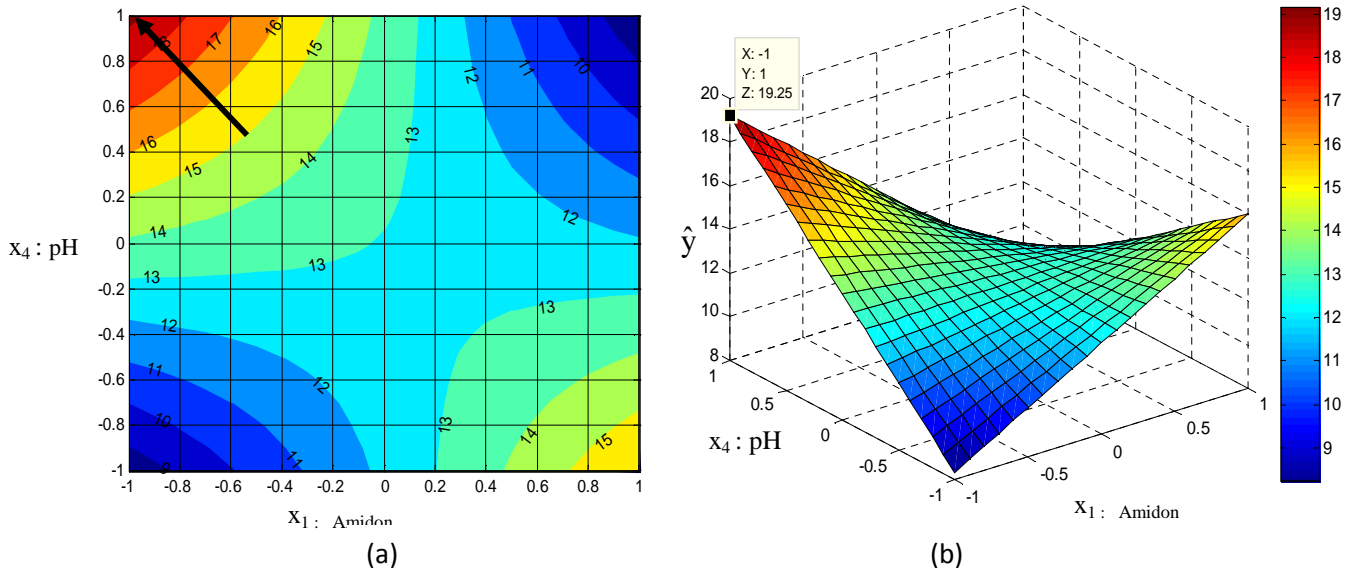


Figure 10 : Courbe isoreponse (a) et surface de réponse (b) pour $x_2=0, x_3=0$

L'analyse de la courbe isoreponse montre que l'activité antifongique augmente dans le sens de l'augmentation du pH (x_4) et de la diminution de la concentration de l'amidon (x_1) comme c'est indiqué par la flèche sur cette courbe. La surface de réponse correspondante montre qu'une activité de 19,25 mm peut être atteinte pour $x_1= -1$ et $x_4= +1$ correspondant respectivement à [amidon] = 6 g/l et pH 9.

➤ Pour : $x_2= -1, x_3= -1$

$$\hat{y} = 13,28 + 0,14x_1 - 2,5x_4 - 1,81x_1x_4$$

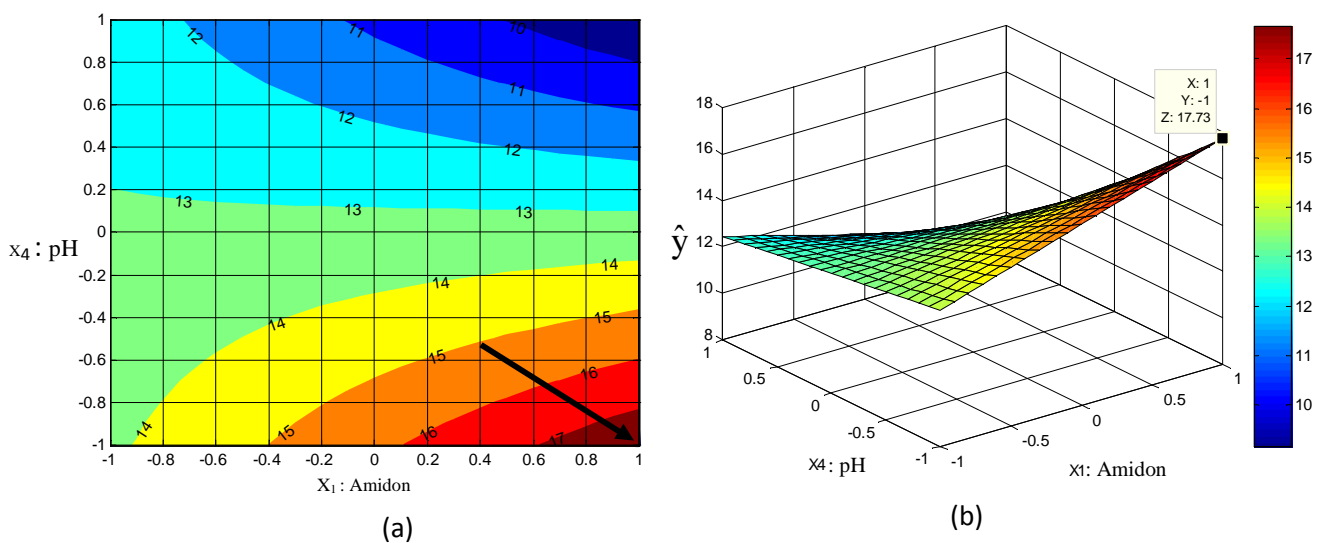


Figure 11 : Courbe isoreponse (a) et surface de réponse (b) pour : $x_2= -1, x_3= -1$

La flèche sur la courbe isoréponse (a) indique que l'augmentation de l'activité antifongique va dans le sens de l'augmentation de la concentration de l'amidon (x_1) et de la diminution de pH (x_4), et la surface de réponse (b) montre que pour une concentration de 14 g/l en amidon ($x_1=1$) et un pH de 7 ($x_4=-1$) une activité de 17,73 mm est obtenue.

➤ **Pour : $x_2=1, x_3=1$**

$$\hat{y} = 11,06 + 1,86x_1 + 2,64x_4 - 6,43x_1x_4$$

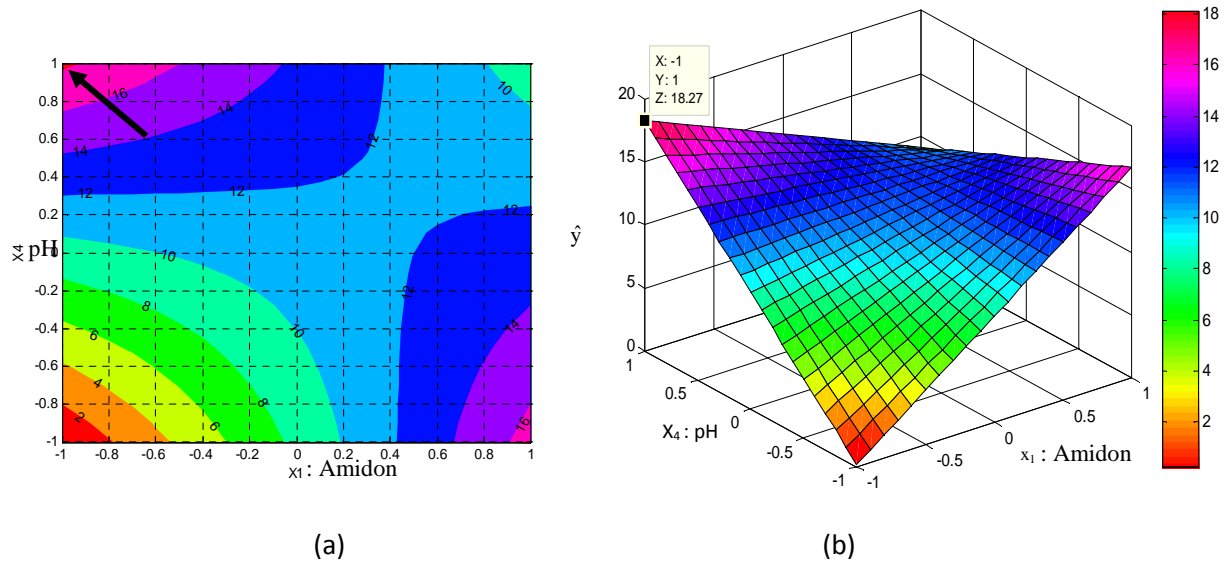


Figure 12 : Courbe isoréponse (a) et surface de réponse (b) pour : $x_2=1, x_3=1$

D'après la courbe isoréponse (a) ainsi que la surface de réponse (b) on remarque que la région du domaine expérimental où l'optimum en activité antifongique est atteint se concentre pour les conditions où le pH augmente et atteint son niveau maximal (+1) (pH = 9) et la [amidon] diminue et atteint son niveau minimum (-1) ([amidon] = 6 g/l). Sous ces conditions la réponse obtenue est égale à 18,27 mm.

➤ **Pour : $x_2=1, x_3=-1$**

$$\hat{y} = 10,74 - 1,86x_1 + 1,96x_4 - 10,73x_1x_4$$

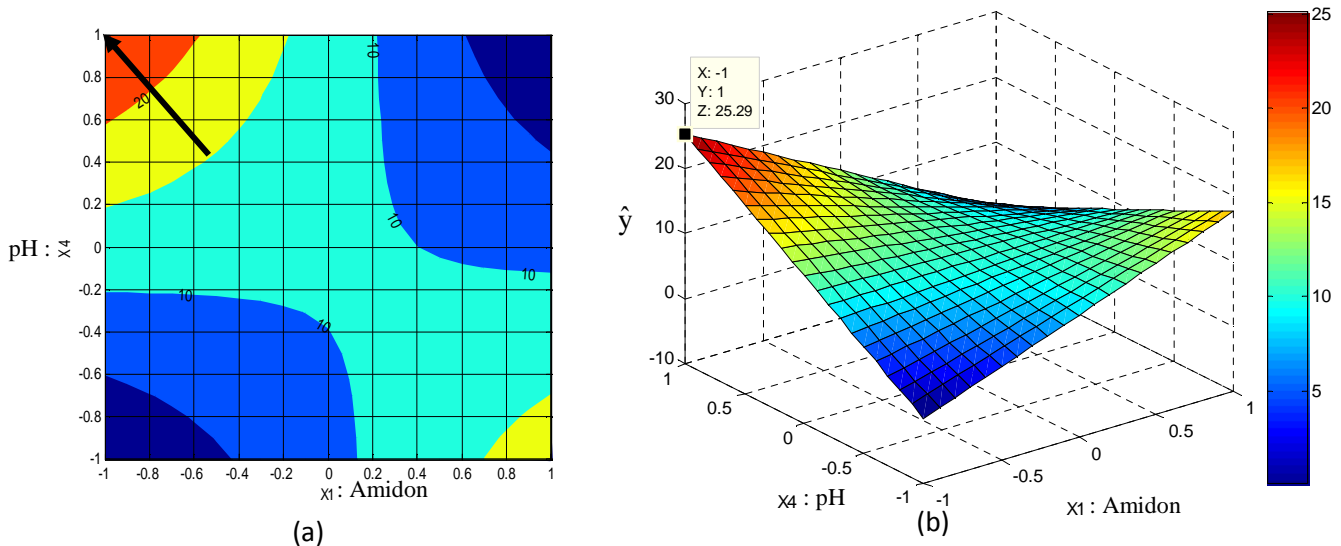


Figure 13 : Courbe isoréponse (a) et surface de réponse (b) pour : $x_2=1, x_3=-1$

Il ressort de la courbe isoréponse (a) que le maximum de l'activité antifongique est obtenu entre les niveaux de pH (0,6 jusqu'à 1) correspondant à un intervalle de pH (8,4 à 9) et pour une concentration en amidon de niveau (-0,4 à -1) correspondant à 6,8 g/l jusqu'à 6 g/l (sens de la flèche). La surface de réponse (b) montre qu'une activité de 25,29 mm est obtenue quand le pH (x_4) est à son niveau maximal (pH 9) et [amidon] (x_2) à son niveau minimal soit 6 g/l.

➤ **Pour : $x_2=-1, x_3=1$**

$$\hat{y} = 16,72 - 3,58x_1 + 0,94x_4 + 0,25x_1x_4$$

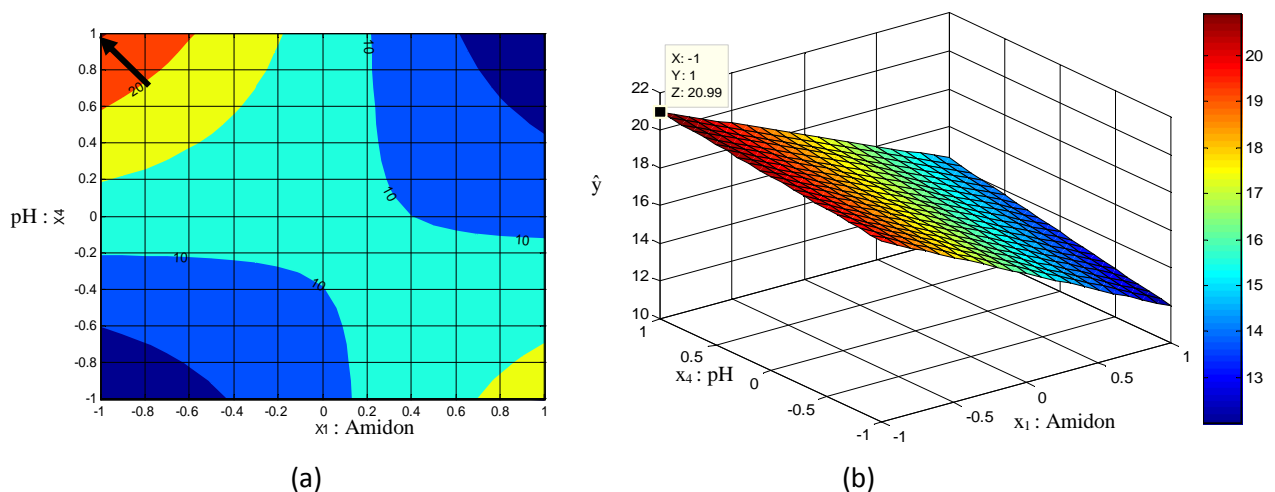


Figure 14 : Courbe isoréponse (a) et surface de réponse (b) pour : $x_2=-1, x_3=1$

La figure 14 montre en suivant le sens de la flèche que l'activité augmente en diminuant la concentration de l'amidon (x_1) à 6 g/l et en augmentant le pH à son niveau maximum pH 9. La surface de réponse indique qu'une activité de 20,99 mm est obtenue sous ces conditions.

D'après toutes les courbes tracées précédemment, on peut conclure que la meilleure activité antifongique ($y = 25,29$ mm) peut être obtenue pour les conditions suivantes des différents paramètres opératoires :

$x_1 = -1$ \longrightarrow [amidon] = 6 g/l.

$x_2 = +1$ \longrightarrow [extrait de levure] = 5 g/l.

$x_3 = -1$ \longrightarrow [peptone] = 1,25 g/l.

$x_4 = +1$ \longrightarrow pH = 9.

Conclusion

Conclusion

Cette étude avait pour objectif principal l'optimisation de la production de substances actives par deux souche d'actinomycètes S₁₀ et S₁₉ sur seize milieux MEM avec diverses concentrations de : l'amidon, de l'extrait de levure, de peptone, et à des pH différents, un dix-septième est réalisé pour des conditions standards ; amidon 10 g/l, extrait de levure 4 g/l, peptone 2 g/l et pH 7.

Après avoir cultivé les deux souches sur les différents milieux MEM, ces dernières ont montrées une très bonne croissance sur la pluparts des milieux MEM et leur activité a été mis en évidence par la technique des cylindres d'agar sur différents germes cibles.

Les résultats obtenus ont montrés que la souche S₁₀ utilisée (*Streptomyces* sp) présente une activité antibactérienne et antifongique vis-à-vis de *Bacillus subtilis*, *Lesteria innocua*, *SARM* et *Candida albicans*. L'activité antifongique pour cette dernière est plus importante.

Quant à la souche S₁₉ elle a montré une activité anti-*Candida albicans* avec les milieux MEM (7, 8, 9, 10, 11, 12), et une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* avec les milieux MEM (12 et 14) et aussi contre SARM avec les milieux MEM₁₃, MEM₁₄, MEM₁₆ ces résultats restent insuffisants et non modélisable, donc elle a été éliminé pour la suite de notre étude.

Les dix sept milieux choisis favorisent la croissance mais pas forcément la production d'antibiotiques.

Une modélisation statistique et mathématique en vue de sélectionner les paramètres les plus influençant ainsi que leurs interactions sur la production d'antifongiques est réalisée. Quatre facteurs ont été choisis comme variables : source de carbone, d'azote et de pH.

La modélisation par le biais d'un plan factoriel complet a montré que le facteur le plus influençant sur l'activité antifongique de la souche S₁₀ est : l'extrait de levure, suivit par le peptone, et enfin vient l'amidon puis le pH. Toutefois l'interaction la plus importante été marquée pour le couple [amidon]-pH.

Les concentrations optimales de ces facteurs ont pu être délimitées par le tracé des courbes isoréponses et les surfaces de réponses et leurs valeurs sont les suivantes : amidon (6 g/l au lieu de 10 g/l), extrait de levure (5 g/l au lieu de 4 g/l), peptone (1,25 g/l au lieu de 2 g/l) et enfin pH (9 au lieu de pH 7).

Conclusion

Le modèle linéaire de premier degré obtenu nous a permis de trouver les conditions des différents paramètres opératoires et prédit une activité de 25,29 mm qui est largement supérieure à celle obtenue au centre du domaine expérimentale qui est de 13,75 mm (MEM₁₇).

L'ensemble des résultats obtenus ont montrés que le plan factoriel complet nous a permis de déterminer :

- ✓ Les effets de chaque constituant du milieu MEM.
- ✓ Les interactions de ces facteurs.
- ✓ L'optimisation des paramètres de culture.
- ✓ Nombres d'essais réduits.

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

- ✓ Vérifier expérimentalement si l'activité antifongique correspond à celle prédite par le modèle (25,29 mm)
- ✓ Essayer d'autres domaines d'études.
- ✓ Elargir la gamme de germes cibles.
- ✓ Optimiser tous les paramètres nutritionnels de cultures.
- ✓ Etudier la cinétique de croissance et de la production des antibiotiques.
- ✓ Tester une large gamme de milieux de culture afin d'optimiser éventuellement ceux sur lesquelles on obtiendrait une meilleure production que sur MEM.
- ✓ Optimiser d'autres paramètres cultureux à savoir : la charge de l'inoculum, la température, le temps d'incubation etc.
- ✓ Passer du milieu solide au milieu liquide.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

- Adjabi S. (2003). Méthode statistique de la prévision . Edition : LAMOS. université de béjaia. 28p.
- Antony J. (2003). Design of Experiments for Engineers and scientists. Edition: Butterworth-Heinemann. Grande brutan.152p.
- Arkoub W. (2012). Simulation dynamique du procédé de cémentation dans un réacteur tubulaire à électrode volumique-corrélation de transfert de matière. Thèse de doctorat en Génie des procédés et génie chimique. Université A Mira. Bejaia. p47.
- Augustine SK, Bhavsar SP, Baserisalehi M et Kapadnis BP. (2004). Isolation, characterization and optimization of antifungal activity of an actinomycete of soil origin. Indian J Exp Biol **42**: 928–932.
- Augustine SK, Bhavsar SP et Kapadnis BP. (2005). Production of a growth dependent metabolite active against dermatophytes by *Streptomyces rochei* AK 39. Indien J Med Res **121**: 164-170.

B

- Badji B, Zitouni A, Lebrihi A, Le Faou A et Sabaou N. (2009). Molécules bioactives sécrétées par *Nonomuraea* sp NM94 (Actinomycetales) d'origine saharienne. Microbiol Ind San et Environn. P. 25-36.
- Baltz RH. (2008). Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. Curr Opin Pharmacol **8**: 1-7.
- Basak K et Majumdar SK. (1973). Utilization of carbon and nitrogen source by *Streptomyces kanamyceticus* for kanamycin production. Antimicrob Agents Chemother **4**:6-10.
- Basilio A, Gonzalez I, Vicente MF, Gorrochategui J, Cabello A, et Gonzalez A. (2003). Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. J Appl Microbiol **95** : 814-23.
- Becker B, Lechevalier MP et Lechevalier HA. (1965). Chemical composition of cell wall preparation from strains of various from-genera of aerobie actinomycetes. App Microbiol biotechnol **13**, 236-243.
- Behal V. (2003). Alternative sources of biologically active substances. Folia Microbiol **48**: 563-571.
- Benoit D, Tourbier Y et Germain S. (1994). Plans d'expériences, construction et analyse. Edition: LAVOISIER. Paris.206p.

Références bibliographiques

- Bergey's Manual, (2012). Systematic of bacteriology. The Proteobacteria Part A Introductory Essays. Second edition. Garrity GM, Bell JA, Lilburn TG, Springer. New York Berlin Heidelberg.
- 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. Bioengineering. **106 (2)**: 148-153.
- Boudjella H. (2007). Etude taxonomiques et des propriétés antagonistes des *Streptosporangium* des sols Sahariens et caractérisation des principaux antibiotiques sécréter par trois souches. Thèse de Doctorat d'Etat. Alger. Algérie.
- Boughachiche f, Reghioua S, Oulmi L, Zerizer H, Kitouni M, Boudemagh A et Boulahrouf A. (2005). Isolement d'Actinomycetales productrices de substances antimicrobiennes à partir de la sebkhah d'Ain Mlila .Sci Technol **23** : 5-10.

C

- Castro JM, Liras P, Cortes J et Martin JF. (1985). Regulation of α -aminoacylcysteine- valine, isopenicillin N synthetase, isopenicillin N isomerase and deacetoxycephalosporin C synthetase by nitrogen sources in *Streptomyces lactamdurans*. Appl Microbiol Biotechnol **22** : 32-40.
- Chun J, Blackall LL, Kang S, Hah YC et Goodfellow M. (1997). A proposal to reclassify *Nocardia pinensis* as *Skermania piniformis* gen. Int J Syst Bact.**47**, 127-131.

D

- Demain AL. (1989). Carbon source regulation of idiolite biosynthesis in actinomycetes. In: Regulation of secondary metabolism in actinomycetes. Shapiro S editor. Boca, Raton,FL: CRC Press. 127-134.
- Doull JL, Ayer SW, Singh AK et Thibault P. (1993). Production of a novel polyketide antibiotic Jadomycin B by *Streptomyces venezuelae* following heat shock. J Antibiot. **46**, 869-871.

E

- Ensign JC. (1978). Formation, properties and germination of actinomycetes spores. Annu Rev Microbiol **32** : 185-219.
- Eunice JA et Prosser JI. (1983). Mycelial growth and branching of *Streptomyces*

Références bibliographiques

Coelicolor A3 (2) on solid medium. J gen Microbial **129** :2029-2036.

F

- Floyd MH, pieper RL et Mert FP. (1987). Sporulation of *Streptomyces roseoporus* in submerged culture. J Ind Microbiol **2** : 235-241.
- Fukunagak K, Misatot T, Asakawa M et Blasticidin. (2008). A new Anti-Phytopathogenic Fungal Substance. Bull Chem Soc Jap **19**: 181-188.

G

- Goupy J. (1999). Plans d'expériences pour surfaces de réponses. Edition : DUNOD. Paris. 409p.
- Goupy J. (2001). Introduction aux planx d'expériences. 2^{ème} édition : DUNOD. Paris. 109p.
- Goupy J. (2005). Pratiquer les plans d'expériences. Edition : DUNOD. Paris. 501p.
- Gazenko SV, Reponen TA, Grinshpun SA et Willeke K. (1998). Analysis of airborne Actinomycetes spores with fluorogenic substrates. Appl Environm Microbiol. **64**(11): 4410-4415.
- Gottlieb D. (1973). General consideration and implication of the actinomycétales. In : Actinomycetales characteristics and practical importance. Edition: G Sykes and FA Skinner. Academic press. London. New York.

H

- Hirvonen MR, Nevalainen A, Makkonen M, Monkkonen J et Savolainen K. (1997). *Streptomyces* spores from moldy houses induce nitricoxide, TNF α and IL-6 secretion from RAW264.7 macrophage cell line without causing subsequent cell death. Environ Toxicol Pharmacol **3**:57-63.
- Hong G, Mei L, Jintao L, Huanqin D, Xianlong Z, Xiangyang L, Ying Z, Wenquan Z et Lixin Z. (2009). Medium optimization for the production of avermectin B1a by *Streptomyces avermitilis* 14-12A using response surface methodology. Bioresour Technol **100**: 4012–4016.
- Hwang BK, Lim SW, Kim BS, Lee JY et Moon SS. (2001). Isolation and in Vivo and in vitro antifungal activity of phénylacetic acid and sodium phenylacetate from *Streptomyces humidus*. Appl environ Microbiol **67** : 3730-3745.

I

Références bibliographiques

- Inoue OO, Netto WS, Padilla G et Facciotti MCR. (2007). Carbon catabolite repression of retamycin production by *Streptomyces olindensis* ICB20. *Braz J Microbiol* **38**: 58-61.

J

- Jinenez JT, Sturdikova M et Sturdik E. (2009). Natural products of marine origin and their perspectives in the discovery of new anticancer drugs. *Acta chimica Slovaca* **2**: 63-74.

K

- Katarou V. (1974). Méthodes cybernétiques et technologie chimique. Edition : MIR Moscou. 98p.

L

- Lacey J. (1973). Actinomycetes in soils, composts and fodders. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser.* **2**, 231-251.
- Lacey J. (1997). Actinomycetes in composts. *Ann Agr Env Med.* **4**, 113-121.
- Lakshmipathy DT et Krishnan K. (2009). A report on the antidermatophytic activity of Actinomycetes. *Inter J Integrative Biol* **6**: 132-136.
- Larpent JP et Sanglier JJ. (1989). Biotechnologie des antibiotiques. Edition :Masson. Paris.481p.
- Lebrihi A, Lefebvre G et Germain P. (1988). Carbon catabolite regulation of cephamycine C and expandase biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **28**: 44-51.
- Lechevalier MP et Lechevalier H. (1970). Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int j Syst Bacteriol.* **20**,435-443.
- Lechevalier HA et Lechevalier MP. (1981). Introduction to the order Actinomycetales. In : The procaryotes. (Eds.), Starr MP, H Stolp, HG Truper, A Ballows and H GSchlegel. Springer Verlag Berlin. **2**, 1915-1922.
- Lechevalier MP et Lechevalier H. (1985). Biology of actinomycetes not belonging to genus *Streptomyces* in: *Biology of industrial microorganisms*. Benjamen Cummings Publishing Company,INC. 315-360..
- Lin JL, Bai Z, Deng et JJ Zhong. (2010). Effect of Ammonium in Medium on Ansamitocin P-3 Production by *Actinosynnema pretiosum*. *Biotechnol Biopro Engineer* **15**: 119-125.

Références bibliographiques

- Liu S, Liu SY et Lu ZX. (2007). Antibacterial activity and property of the fermentation product of marine *Streptomyces* sp GB-2. *Chin J Biotechnol* **23**: 1077-1081
- Long PF et Wildman HG. (1993). Strategy for the use of pretreatments in the isolation of non-streptomycete actinomycetes from soil. *Actinomycetes* **4**:59-64.
- Lopes A, Coelho RR, Meirelles MN I, Branquinha MH et Vermelho AB. (1999). Extracellular serine-proteinases isolated from *Streptomyces alboniger* Partial characterization and effect of aprotinin on cellular structure. *Mem Inst Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro* **94**: 763-770.
- Lounès A, Lebrihi A, Benslimane C, Lefebvre G et Germain P. (1995b). Regulation of valine catabolism by ammonium in *Streptomyces ambofaciens* producer of spiramycin. *Can J Microbiol.* **41**: 800-808.

M

- Mariat F et Sebald M. (1990). Les actinomycètes. in : Bactériologie médicale. (Eds.), Le Minor ,Médecine-Science. Flammarion. France. 935-949.
- Moore BS, Trischman JA, Seng D, Jensen PR et Fenical WS. (1999). Antiinflammatory Depsipeptides from a marine Streptomycetes. *J Org Chem* **64**, 1145-1150.
- Mukai A, Fukai T, Matsumoto Y, Ishakawa J, Hoshino Y, Yazawa K et al. (2006). Transvalencin Z a new antimicrobial compound with salicylic acid residue from *Nocardia transvalensis* IFM 10065. *J Antibot* **59**: 366-9.

N

- Niladevi KN, Rajeev K, Nicemol J, Anisha GS et Prema P. (2009). Optimization of laccase production from a novel strain-*Streptomyces psammoticus* using response surface methodology. *Microbiol resear* **164**: 105-113.

O

- Okami Y et Hotta K. (1988). Search and discovery of new antibiotic in : M Goodfellow, ST Williams and M.Mordanski. (Eds.), *Actinomycetes in biotechnology*. Academic Press. London. pp. 33- 67.
- Omura S, Tanaka Y, Hamada H et Masuma R. (1984). Effect of ammonium ion, inorganic phosphate and amino acids of the biosynthesis of protylonolide, a precursor of tylosin aglycone. *J Antibiot* **37**: 494-502.

Références bibliographiques

- Omura S. (1992). The search for bioactive compounds from microorganisms. Springer Verlag. New York. Inc. 281-303.
- Oskay M. (2011). Effects of some Environmental Conditions on Biomass and Antimicrobial Metabolite Production by *Streptomyces* sp., KGG32. Int J Agric Biol **13(3)**:317- 324.
- Ottow JCG et Glath H. (1968). Rose Bengal-malt extract-agar, a simple medium for simultaneous isolation and enumeration of fungi and actinomycetes from soil. Appl Microbiol **16**:170-171.
- Overbye KM et Barrett JF. (2005). Antibiotics: where did we go wrong?. Drug Discovery Today **10**: 45-52.
- Ozil P. (1997). Plans d'expériences : Méthode de TAGUCHI E N S d'électrochimie et d'Electrometallurgie INPG.

P

- Park YS, Momose I, Tsunoda K et Okabe M. (1994). Enhancement of cephamycin C production using soybean oil as the sole carbon source. Appl Microbiol Biotechnol **140**:773-779.
- Petrosyan P, Gacia-varela M, Madrigal A, Huitron C et Flores ME. (2003). *Streptomyces mexicanus* sp. Nov a xylanolytic microorganism isolated from soil. Inter J Syst Evol Microbio **153**: 269-273.
- Pfefferle C, Theobald U, Gürtler H et Fiedler HP. (2000). Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. J Biotechnol **80**: 135-142.
- Piepersberg W et Distler J. (1997). Aminoglycosides and sugar components in other secondary metabolites. In: Rehm HJ, Reed G, Puhler A and Sadler P. (Eds.), Biotechnology 2nd ed. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim. pp: 397 -488.
- Polpass AJ, Kunjukrishnan KS et Solomon RDJ. (2013). Formulation and Statistical Optimization of Culture Medium for Improved Production of Antimicrobial Compound by *Streptomyces* sp JAJ06 Hindawi Publishing Corporation International. J Microbiol. Article ID 526260. 9p.
- Porter JN. (1971). Prevalance and distribution of an tibiotic producing actinomycetes. Adv Appl Microbiol **14**: 73-92.

R

Références bibliographiques

- Ravikumar K, Pakshirayah K et Gwaninathan T. (2005). Optimisation of batch process parameters using response surface methodology for dye removal by a novel adsorbent. *Chem Eng J*.pp 131-138.
- Ruiz B, Chávez A, Forero A, García-Huante Y, Romero A, Sánchez M, Rocha D, Sánchez B, Rodríguez-Sanoja R, Sánchez S et Langley E. (2010). Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source. *Critical Rev Microbiol.*, **36**: 146– 167.
- Sado G et Sadou MC. (1991). Les plans d'expériences et l'expérimentation à l'assurance qualité. Edition : AFNOR Technique. 90p.
- Sanasam S et Ningthoujam DS. (2010). Screening of local actinomycete isolated in manipur for anticandidal activity. *Asian J Biotechnol* **2**: 139-145.
- Sanchez L et Barana AF. (1996). Cell density influences antibiotic biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Microbiology*.**142**, 1209-1220.
- Sanglier JJ, Wellington EMH, Kamoun A, Kelly C, Mercer DK, Prinzis S et Trigo C. (1993). Novel bioactive compounds from Actinomycetes. *Res Microbiol* **144**: 661-663
- Sanglier JJ et Trujillo M. (1997). Substances bioactives produites par les actinomycetes et stratégie de sélection de souches. *Bull Soc Fr Microbiol*. 12, 13.
- Singh LS, Mazumder S et Bora TC. (2009). Optimisation de la croissance et de la production de metabolite bioactive par *Streptomyces tanashiensis* souche A2D, un actinomycète alcaliphile et tolerant au sel. *J Mycol Méd* **19**: 225-233.
- Singleton P. (1994). Bactériologie. Masson. France.
- Slee AM, Wuonola MA, McRipley RJ, Zajac I, Zawada MJ, Bartholomew PT, Gregory WA et Forbes M .(1987) . Oxazolidinones a new class of synthetic antibacterial agents:in vitro and in vivo activities of DuP 105 and DuP 721. *Antimicrob Agen Chemother*. **31**(11) 1791-7.
- Smaoui S. (2010). Purification et caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse doctorat de l'université de Toulouse. France. p125.
- Solanki R, Khanna M, Lal R. (2008). Bioactive compounds from marine actinomycetes. *Indian J Microbiol* **48**: 410-431.
- Solé M, Rius N et Lorén JG. (2000). Rapid extracellular acidification induced by glucose metabolism in non-proliferating cells of *Serratia marcescens*. *Internat Microbiol* **3**: 39-43.

Références bibliographiques

- Strub C. (2008). Modélisation et Optimisation de la production de thiolutine chez *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de doctorat. Université Toulouse. France, p52.
- Sturdikova M et Sturdik E. (2009). Natural products of marine origin and their perspectives in the discovery of new anticancer. *Acta Chgimica Slovaca* **2** : 63-74.
- Swaney SM, Aoki H, Ganoza MC et Shinabarger DL. (1998). The oxazolidinone linezolid inhibits initiation of protein synthesis in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* **42(12)**:3251-5
- Syed DG, Lee JC, Li WJ, Kim CJ et Agasar D.(2009). Production, characterization and application of keratinase from *Streptomyces gulbargensis*. *Bioresour Technol* **100**, 1868-1871.

T

- Tanaka Y, Taki A, Masuma R, Omura S. (1986). Mechanism of nitrogen regulation of protylonolide biosynthesis in *Streptomyces fradiae*. *J Antibiot* **39**: 813-821.
- Thakur D, Bora TC, Bordoloi GN et Mazumdar S. (2009). Influence of nutrition and culturing conditions for optimum growth and antimicrobial metabolite production by *Streptomyces sp* 201. *J Myco Med.* **19(3)**:161-167.

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.
- Usha KM, Sudhakar P, Krishna N, Vijayalakshmi M. (2012). Influence of cultural conditions for improved production of bioactive metabolites by *Streptomyces cheonanensis* VUK-A isolated from Coringa Mangrove Ecosystem. *Curr Tren Biotechnol Pharm* **6 (1)** : 99-111.
- Usha KM, Vijayalakshmi M, Sudhakar P et Dayanand A.(2014). Optimization of Process Parameters for Improved Production of Bioactive Metabolites by *Streptomyces tritolerans* DAS 165T. *Br Microbiol Res J* **4(4)**: 428-442.

V

- Valan Arasu M, Duraipandiyan V, Agastian P, Ignacimuthu S. (2008). Antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-26 recovered from Western Ghats of Tamil Nadu. *J myco med* **18**: 147-153.
- Vijayakumar R, Panneerselvam K, Muthukumar C, Thajuddin N, Panneerselvam A et Saravanamuthu R. (2010). Optimization of Antimicrobial Production by a Marine

Références bibliographiques

Actinomycete *Streptomyces afghaniensis* VPTS3-1 Isolated From Palk Strait, East Coast of India. Indian J Microbiol.

- Vonothini G, Murugan M, Sivakumar K et Sudha S. (2008). Optimization of protease production by an actinomycete Strain, PS-18A isolated from an estuarine shrimp pond. Afr J Biotechnol. **7(18)**: 3225-3230.

W

- Waksman SA. (1959). The actinomycetes: nature, occurrence and activities, Williams and Wilkins. Company Baltimore. **1**, 29-46.
- Williams ST et Cross T. (1971). Methods in microbiology. Academic press. Londre **4**: 295-334.
- Williams ST, Lanning S, Wellington EMH. (1984). Ecology of Actinomycetales, p. 481-528. In: The Biology of Actinomycetes. Goodfellow M, Moradasski M and Williams ST. (Eds.), Academic Press. London.
- 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.

X

- Xue Q. (2009). Classification et la tolérance au sels des actinomycètes dans l'eau de lac dans Qinghai et le sol salin (lackde). Jof subst devl **2** :107-110.

Z

- Zaitlin B, Watson Sb, Ridal J, Satchwill T et Parkinson D. (2003). Actinomycetes in lake Ontario : Habitats and geosmin and MIB production. Res J Can. **95 (2)**, 113-118.

Annexes

Annexe I

I. Matériels analytique

- ✓ Autoclave.
- ✓ Balance.
- ✓ Bain marrie.
- ✓ Bec benzène.
- ✓ Béchers.
- ✓ Flacons de 250 ml.
- ✓ Tubes à essais.
- ✓ Etuve.
- ✓ pH- mètre.
- ✓ Pied à coulisse.
- ✓ Erlinne mayer de 250 ml.
- ✓ Anse de platine.
- ✓ Micro pipette.
- ✓ Ecouvillons.
- ✓ Vortex.

I. Les milieux de culture

➤ Milieu Muller-Hinton(MH)

Extrait de viande : 3g ; Hydrolysate de caséine : 17,5g ; amidon : 1,5g ; agar : 16g ; pH : 7,3(Williams et Kuster, 1964).

➤ Mincer Eau de Mer (MEM) modifié





Amidon : 10g ; extrait de levure : 4g ; peptone : 4g ; agar : 18g ; eau distillée : 500ml, eau de mère : 500ml et pH : 7(Williams et Kuster, 1964).

Annexe II

Tableau VII : Caractères morphologiques de la souche S₁₀, au 8^{ème} jours de croissance sur les différents milieux MEM à 28 °C

Milieux	Figure	Aspect
MEM ₁		Très bonne croissance, virage du milieu vers le brun
MEM ₂		Très bonne croissance, virage du milieu vers le brun foncé.
MEM ₃		Très bonne croissa virage du milieu vers le brun.
MEM ₄		Bonne croissance, virage du milieu au brun foncé.
MEM ₅		Très bonne croissance, virage du milieu vers le brun.
MEM ₆		Très bonne croissance, virage du milieu brun foncé.
MEM ₇		Absence de croissance.
MEM ₈		Croissance lente

Annexe II




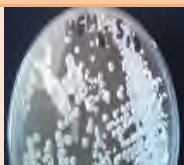

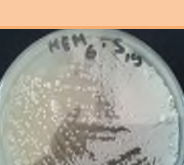
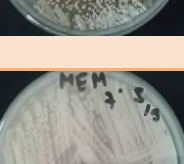
MEM₉		Très bonne croissance, virage du milieu au brun.
MEM₁₀		Très bonne croissance, virage du milieu au brun foncé.
MEM₁₁		très bonne croissance, virage du milieu au brun foncé.
MEM₁₂		Absence de croissance.
MEM₁₃		Très bonne croissance, virage du milieu au verdâtre.
MEM₁₄		Très bonne croissance, virage du milieu vers le brun.
MEM₁₅		Très bonne croissance, virage du milieu vers le brun.
MEM₁₆		Très bonne croissance, virage du milieu au brun foncé.

Annexe II


MEM₁₇		Bonne croissance, virage du milieu au brun.
-------------------------	---	---

Annexe II



Tableau VIII : Caractères morphologiques de la souche S₁₉, au 8^{ème} jours de croissance sur les différents milieux MEM à 28 °C

Milieux	Figure	Aspect
MEM ₁		Très bonne croissance, virage du milieu vers le brun.
MEM ₂		Très bonne croissance, virage du milieu vers le brun.
MEM ₃		Très bonne croissance, virage du milieu au verdâtre.
MEM ₄		Très bonne croissance, virage du milieu vers un brun foncé.
MEM ₅		Très bonne croissance, virage du milieu au verdâtre.
MEM ₆		Très bonne croissance, virage du milieu vers un brun foncé.
MEM ₇		Très bonne croissance, virage du milieu vers un brun clair.

Annexe II

MEM₈		Très bonne croissance, virage du milieu au verdâtre.
MEM₉		Très bonne croissance, virage du milieu au verdâtre.
MEM₁₀		Très bonne croissance, virage du milieu vers un brun foncé.
MEM₁₁		Très bonne croissance, virage du milieu au verdâtre.
MEM₁₂		Très bonne croissance, virage du milieu au verdâtre.
MEM₁₃		Très bonne croissance, virage du milieu au verdâtre.
MEM₁₄		Très bonne croissance, virage du milieu au verdâtre.

Annexe II

MEM₁₅		Très bonne croissance, virage du milieu au verdâtre.
MEM₁₆		Très bonne croissance, virage du milieu au verdâtre.
MEM₁₇		Très bonne croissance, virage du milieu au verdâtre.

Annexe III

Table de Student

Unilatéral	0,01	0,05	0,025	0,01	0,005
Bilatéral	0,20	0,10	0,05	0,02	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 III

Table de Fischer

Valeur des 95ièmes centiles (niveau 0,05)

$F_{0,95}$ pour la distribution F

$v_1 \rightarrow$ $v_2 \downarrow$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	40	60	120	∞
1	161	200	216	225	230	234	237	239	241	242	244	246	248	249	250	251	252	253	254
2	18,5	19,00	19,2	19,20	19,3	19,3	19,4	19,4	19,4	19,4	19,4	19,4	19,4	19,5	19,5	19,5	19,5	19,5	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	8,59	8,57	8,55	8,53
4	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,09	6,04	6,00	5,96	5,91	5,86	5,80	5,77	5,75	5,72	5,69	5,66	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	4,46	4,43	4,40	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	3,77	3,74	3,70	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	3,34	3,3	3,27	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	3,04	3,01	2,97	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	2,83	2,79	2,75	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	2,66	2,62	2,58	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	2,53	2,49	2,45	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	2,43	2,38	2,34	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	2,34	2,30	2,25	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	2,27	2,22	2,18	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	2,20	2,16	2,11	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	2,15	2,11	2,06	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	2,1	2,06	2,01	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	2,06	2,02	1,97	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	2,03	1,98	1,93	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	1,99	1,95	1,90	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	1,96	1,92	1,87	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	1,94	1,89	1,84	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	1,91	1,86	1,81	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	1,89	1,84	1,79	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	1,87	1,82	1,77	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	1,85	1,8	1,75	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	1,84	1,79	1,73	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	1,82	1,77	1,71	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	1,81	1,75	1,70	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	1,79	1,74	1,68	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	1,69	1,64	1,58	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	1,59	1,53	1,47	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	1,50	1,43	1,35	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	1,39	1,32	1,22	1,00

v_1 degrés de liberté au numérateur

v_2 degrés de liberté au dénominateur

Annexe IV

Tableau XIV : Valeurs moyennes du diamètre de la zone d'inhibition du couple 1-2

[Amidon]-[extrait de levure]

x₁	x₂	x₃	x₄	y_i (mm)	y (mm)
-1	-1	-1	-1	13,95	16,72
-1	-1	+1	-1	19,51	
-1	-1	-1	+1	12,56	
-1	-1	+1	+1	20,88	
+1	+1	-1	-1	17,53	10,90
+1	+1	+1	-1	16,83	
+1	+1	-1	+1	0	
+1	+1	+1	+1	9,23	
-1	+1	-1	-1	0	10,89
-1	+1	+1	-1	0	
-1	+1	-1	+1	25,42	
-1	+1	+1	+1	18,16	
+1	-1	-1	-1	17,64	13,29
+1	-1	+1	-1	12,06	
+1	-1	-1	+1	9,02	
+1	-1	+1	+1	14,45	

Annexe IV

Tableau XVI : Valeurs moyennes du diamètre de la zone d'inhibition du couple 1-4
[amidon]-pH

x₁	x₂	x₃	x₄	y_i (mm)	y (mm)
-1	-1	-1	-1	13,95	8,36
-1	+1	-1	-1	0	
-1	-1	+1	-1	19,51	
-1	+1	+1	-1	0	
+1	-1	-1	+1	9,02	8,17
+1	+1	-1	+1	0	
+1	-1	+1	+1	14,45	
+1	+1	+1	+1	9,23	
-1	-1	-1	+1	12,56	19,10
-1	+1	-1	+1	25,42	
-1	-1	+1	+1	20,88	
-1	+1	+1	+1	18,16	
+1	-1	-1	-1	17,64	16,01
+1	+1	-1	-1	17,53	
+1	-1	+1	-1	12,06	
+1	+1	+1	-1	16,83	

Annexe IV

Tableau XVII : Valeurs moyennes du diamètre de la zone d'inhibition du couple 2-3 [extrait de levure]-[peptone]

x₁	x₂	x₃	x₄	y_i (mm)	y (mm)
-1	-1	-1	-1	13,95	13,29
+1	-1	-1	-1	17,64	
-1	-1	-1	+1	12,56	
+1	-1	-1	+1	9,02	
-1	+1	+1	-1	0	11,05
+1	+1	+1	-1	16,83	
-1	+1	+1	+1	18,16	
+1	+1	+1	+1	9,23	
-1	-1	+1	-1	19,51	16,72
+1	-1	+1	-1	12,06	
-1	-1	+1	+1	20,88	
+1	-1	+1	+1	14,45	
-1	+1	-1	-1	0	10,73
+1	+1	-1	-1	17,53	
-1	+1	-1	+1	25,42	
+1	+1	-1	+1	0	

Annexe IV

Tableau XIII : Valeurs moyennes du diamètre de la zone d'inhibition du couple 2-4 [extrait de levure]-pH

x_1	x_2	x_3	x_4	y_i (mm)	y (mm)
-1	-1	-1	-1	13,95	15,79
+1	-1	-1	-1	17,64	
-1	-1	+1	-1	19,51	
+1	-1	+1	-1	12,06	
-1	+1	-1	+1	25,42	13,20
+1	+1	-1	+1	0	
-1	+1	+1	+1	18,16	
+1	+1	+1	+1	9,23	
-1	-1	-1	+1	12,56	14,22
+1	-1	-1	+1	9,02	
-1	-1	+1	+1	20,88	
+1	-1	+1	+1	14,45	
-1	+1	-1	-1	0	8,59
+1	+1	-1	-1	17,53	
-1	+1	+1	-1	0	
+1	+1	+1	-1	16,83	

Annexe IV

Tableau XIX : Valeurs moyennes du diamètre de la zone d'inhibition du couple 3-4 [peptone]-pH

x₁	x₂	x₃	x₄	y_i (mm)	y (mm)
-1	-1	-1	-1	13,95	12,28
+1	-1	-1	-1	17,64	
-1	+1	-1	-1	0	
+1	+1	-1	-1	17,53	
-1	-1	+1	+1	20,88	15,68
+1	-1	+1	+1	14,45	
-1	+1	+1	+1	18,16	
+1	+1	+1	+1	9,23	
-1	-1	+1	-1	19,51	12,1
+1	-1	+1	-1	12,06	
-1	+1	+1	-1	0	
+1	+1	+1	-1	16,83	
-1	-1	-1	+1	12,56	11,75
+1	-1	-1	+1	9,02	
-1	+1	-1	+1	25,42	
+1	+1	-1	+1	0	

Résumé

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'optimisation de la production d'antibiotiques de deux souches d'actinomycète isolées à partir d'un échantillon d'eau polluée de la wilaya de Bejaia dénommées S₁₀ et S₁₉ rattachées au genre *Streptomyces*, seize milieux de culture MEM à différentes concentrations aux quelles s'ajoutent trois essais réalisés au centre, ont été utilisés pour la culture de ces souches. Afin de mettre en évidence leur activité antimicrobienne, cinq bactéries (quatre à Gram positif et une à Gram négatif) et une levure sont testées.

La souche S₁₀ s'est révélée la meilleure pour la modélisation par le biais d'un plan factoriel complet avec interactions. Quatre facteurs opératoires sont étudiés à savoir : l'amidon, l'extrait de levure, le peptone et le pH (source de carbone, d'azote et le pH). Les concentrations optimales de ces paramètres ont été déterminées ; Amidon 6 g/l, extrait de levure 5 g/l, peptone 1,25 g/l et cela par le tracé des courbes isoréponses et les surfaces de réponses.

Mots clés : Actinomycètes, Antibiotiques, Optimisation, Plan factoriel complet, Activité antimicrobienne, *Streptomyces*.

Abstract

The aimed of this study is the optimization of the antibiotics production of two isolated actinomycetes strains isolated from polluted water in Bejaia, called S₁₀ and S₁₉. These strains has been related to the genus *Streptomyces*. Sixteen culture media MEM with different concentrations and with three essays realized at the center were used for these strains culture (growth), in order to highlight their antimicrobial activity. Five bacteria (for Gram-positive and one Gram-negative) and one yeast were tested.

The strain S₁₀ seems to be the best one for the modeling by full factorial design. The sixteenth media MEM have undergone a statistical optimization for forth factors: starch, yeast extract, peptone and pH (source of carbon, of nitrogen and pH). The optimal concentrations of these four parameters were determined: starch 6 g/l, yeast extracts 5 g/l, peptone 1.25 g/l and pH 9 and that by the layout of the isoresponses curves and response of surfaces.

Key words: Actinomycetes, Antibiotiques, Optimization, Full factorial design, Antimicrobial activity, *Streptomyces*.