

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA-Béjaïa
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

Mémoire de fin de cycle

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

Thème

Optimisation de la production de l'actinomycine D par la souche *Streptomyces* sp. GSBNT10 en utilisant les plans d'expérience

Réalisé par :

M^{elle} : CHABOUR Melisa Noel

Devant le jury :

Président :	M ^{me} BOUCHERBA Nawal	MCB
Examineurs :	M ^{me} IDRES K. Badria	MAA
	M ^{me} MOUCI Kahina	MCB
Promoteur :	M ^{elle} DJINNI Ibtissem	MAA
Co-Promoteur :	M ^{me} ARKOUB Warda	MCB

Promotion: Juin 2014

Dédicaces

Je dédie ce travail à ma chère maman qui m'a tant soutenu tous le long de mon parcours. Aucun hommage ni remerciement ne saurait être suffisant.

Ainsi que mon défunt père paix a son âme.

A mes grands parents que Dieux les protèges.

A mon cher frère Rabah et ma sœur Nora à qui je souhaite beaucoup de réussite.

A toute ma famille.

A toutes mes cousines et à tous mes ami(e) pour leur soutien, leur présence et leur aide précieuse, à qui je souhaite beaucoup de succès.

Remerciement Cette étude n'aurait jamais été entreprise ni

achevée sans la patiente assistance, les conseils et orientations, les méticuleux contrôles et suivis, que m'a prodigués mon directeur de mémoire, m^{elle} DJINNI ibtissem, qui a accepté de m'accueillir dans le Laboratoire de mycologie. Je lui témoigne, ma gratitude et ma reconnaissance.

Mes remerciements s'adressent à M^{me} ARKOUB warda, mon Co-promoteur. Qui m'a prodigé de précieux conseils.

Je tiens à remercier vivement les membres du jury :, d'accepter de juger, d'évaluer ce travail et d'y avoir consacré de leur temps.

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

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

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction1

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I. Les actinomycètes : Taxonomie, écologie et cycle de développement

1. Généralités sur les actinomycètes	3
2. Systématique et critères d'identification	3
2.1. Taxonomie des actinomycètes	3
2.2. Critères d'identification	3
2.2.1. Critères morphologique	3
2.2.2. Critères chimiotaxonomiques.....	4
2.2.3. Critères physiologiques (numérique)	4
2.2.4. Critères moléculaires.....	5
1.3. Ecologie des actinomycètes.....	5
4. Cycle de développement du genre <i>Streptomyces</i>	5

II. Production d'antibiotiques par les actinomycètes

1. Actinomycines D, historique et structure.....	6
2. Mode d'action.....	6

III. Effet des paramètres de cultures sur la production d'antibiotiques et la croissance

1. Influence des sources de carbone et d'azote.....	7
2. Influence des sels minéraux.....	7
3. Influence du pH et de la température.....	7

IV. Les plans d'expériences

1. Définition	8
2. Avantages d'un plan d'expérience.....	8
3. La modélisation.....	8
4. Modèle polynomial de premier degré.....	9
4.1. Plan factoriel complet à deux niveaux 2^k	9
4.2. Variable centrée réduite	9
4.3. Calcul des coefficients du modèle	10

Sommaire

Chapitre II : Matériel et méthodes

I. Matériel	11
1. Matériel analytique	11
2. Matériel biologique.....	11
2.1. Microorganisme étudié « Actinomycète »	11
2.2. Germes cibles utilisée	11
II. Méthodes	11
1. Etude morphologique de la souche sélectionnée GSBNT10.....	11
2-1. Caractères macromorphologiques	11
2-2. Caractères micromorphologiques	12
2. Choix du milieu de production de l'actinomycine D.....	12
2.1. Standardisation de l'inoculum de la souche cible	12
2.2. Test d'activité antibactérienne	12
3. Modélisation de la production de l'actinomycine D de la souche GSBNT10	13
4. Etude de la cinétique de croissance de la souche GSBNT10	15
4.1. Préparation de la suspension de spore.....	15
4.2. Méthode des spots	15

Chapitre III : Résultats et discussions

1. Etude morphologique de la souche selectionnee GSBNT10.....	16
1.1. Caractère macromorphologiques	16
1.2. Caractéristiques micromorphologiques	17
2. Choix de milieu de production de l'actinomycine D.....	17
3. Modélisation de l'activité antifongique de la souche GSBNT10 par un plan factoriel complet avec interactions.....	18
3.1. Caractéristiques morphologiques de la souche étudiée.....	18
3.2. Evaluation de l'activité antibactérienne	20
3.3. Calcul des coefficients du modèle	21
3.4. Analyse statistique de l'équation de régression.....	22
3.4.1. Vérification de la signification des coefficients	22
3.4.2. Teste de validation de l'équation de régression.....	23
1. Recherche de biais.....	23

Sommaire

2. Test de signification de la régression	24
3. calcul du coefficient de détermination.....	24
4. Analyse des résidus.....	25
4. Etude des effets et des interactions des différents paramètres	26
4.1. Effets linaires	26
4.2. Etude des interactions.....	26
5. Optimisation.....	27
7. Etude de la croissance de la souche GSBNT10	31
Conclusion et perspectives.....	34
Références bibliographiques.	
Annexes.	

Liste des figures

Numéro	Description	Page
Figure 1	Photographies au microscope électronique d'isolats d'actinomycètes non mobiles monosporulés et à sporanges	4
Figure 2	Croissance d'une colonie d'actinomycètes sur milieu solide	6
Figure 3	Structure moléculaire de l'actinomycine D ainsi que le chromophore : phenoxazinone	7
Figure 4	Mise en évidence de l'activité antibiotique des isolats d'actinomycètes sur milieu Mueller-Hinton par la méthode des cylindres d'agar	13
Figure 5	Colonies de l'isolat GSBNT10 sur milieu Czapeck	16
Figure 6	Micromorphologie de la souche GSBNT10 cultivées pendant 7 jours à 28°C sur milieu Czapeck, vu au microscope optique : des filaments du mycélium aérien. (x100)	17
Figure 7	Activité de la souche GSBNT10 à l'égard des germes cibles sur 3 milieux différent	18
Figure 8	Diagramme des résidus	25
Figure 9	représentation graphique de l'interaction 1-2 [amidon]-[NaNO ₃] pour l'activité antifongique de la souche GSBNT10	27
Figure 10	Courbe isoréponse et surface de réponse pour: $x_3= 0, x_4= 0$	28
Figure 11	Courbe isoréponse et surface de réponse pour: $x_3= -1, x_4= -1$	29
Figure 12	Courbe isoréponse et surface de réponse pour: $x_3= +1, x_4= +1$	30
Figure 13	Courbe isoréponse et surface de réponse pour : $x_3= +1, x_4= -1$	30
Figure 14	Courbe isoréponse et surface de réponse pour: $x_3= -1, x_4= +1$	31
Figure 15	Cinétique de croissance de la souche GSBNT10 sur différents milieux Czapeck pendant 14 jours d'incubation à 28°C.	32
Figure 16	Variation de la vitesse de croissance de la souche GSBNT10 en fonction de la composition des milieux de culture	33

Liste des tableaux

Numéro	Description	page
Tableau I	Valeurs extrêmes des paramètres opératoires étudiés	13
Tableau II	Matrice des expériences pour $k = 4$ et $N = 16$ (2^k)	14
Tableau III	Caractéristiques macromorphologiques de la souche GSBNT10 après 21 jours d'incubation	16
Tableau IV	Caractères morphologique de la souche GSBNT10 au 7 ^{ème} jours de croissance sur les différents milieux Czapeck	19
Tableau V	Matrice des expériences pour $k = 4$ et $N = 16$ (2^k)	21
Tableau VI	Valeurs des coefficients de régression	21
Tableau VII	Valeurs de t_j calculées	22
Tableau VIII	Calcul des résidus	25
Tableau IX	Valeurs moyennes du diamètre de la zone d'inhibition du couple 1-2 Concentration en Amidon-concentration en NaNO_3	Annexe V

Introduction

Introduction

Le milieu naturel est à l'origine d'environ 70% des médicaments et des anti-infectieux actuels (Newman *et al.*, 2003). Les antibiotiques naturels sont produits en majorité par les microorganismes qui sont la source de nombreuses molécules utilisées en thérapeutique humaine (pénicilline, érythromycine, vancomycine, streptomycine, amphotéricine, ...etc.) (Misato *et al.*, 1982 ; Mc Manus *et al.*, 2002).

Parmi les microorganismes, les actinomycètes, sont les plus grands producteurs de substances antimicrobiennes (Sanglier *et al.*, 1993 ; Suzuki *et al.*, 1994 ; Takahashi et Omura, 2003 & Kitouni *et al.*, 2005). Environ 75 % des antibiotiques découverts entre 1971 et 1980, proviennent de ce groupe (Seong *et al.*, 2001).

D'autre part, la résistance aux antibiotiques a connu une augmentation fulgurante durant cette dernière décennie. Ce phénomène alarmant est d'autant plus problématique particulièrement dans les environnements hospitaliers où des bactéries multi-résistantes apparaissent telles que *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (Demain et Lancini, 2006).

Des solutions sont nécessaires pour venir à bout de ce problème, notamment la mise en œuvre de stratégies de recherche de nouvelles molécules qui sont orientées vers l'isolement de nouvelles souches et espèces de différents écosystèmes particuliers, souvent peu exploités, avec une variété de nouvelles cibles (Cragg *et al.*, 1997; Hegde *et al.*, 2001 & Phoebe *et al.*, 2001).

Les actinomycètes sont de grands producteurs d'antibiotiques, toutefois, des études d'optimisation doivent être réalisées afin d'améliorer cette production, ceci en déterminant les conditions physiologiques et nutritionnelles amenant à une production maximale (Singh *et al.*, 2009 ; Vijayakuma *et al.*, 2010).

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

Ce travail s'inscrit globalement dans cette problématique. Nous nous sommes fixés pour objectif l'optimisation de la production de l'actinomycine D par une souche d'actinomycète en utilisant la méthode des plans d'expériences.

Pour ce faire, nous avons adopté l'approche méthodologique suivante :

La première partie de ce manuscrit est consacrée à une synthèse bibliographique sur les actinomycètes et l'actinomycine D. Des notions fondamentales relatives aux plans d'expériences seront également présentées.

La deuxième partie est expérimentale et concerne dans un premier temps, l'étude morphologique de la souche étudiée GSBNT10 sur différents milieux de culture, suivi par la mise en évidence de son activité antibiotique permettant le choix du meilleur milieu de production de cette dernière. Il s'en ai suivi la réalisation de la modélisation de l'activité antibiotique par le biais d'un plan factoriel complet avec interactions dans le but de déterminer les conditions optimales des variables choisies. D'autre part, l'étude de la cinétique de croissance de l'isolat a été entreprise.

Enfin la troisième partie présente les résultats obtenus ainsi que leur discussion.

*Chapitre I : Synthèse
bibliographique*

I. Les actinomycètes : Taxonomie, écologie et cycle de développement

1. Généralités sur les actinomycètes

Les actinomycètes sont des procaryotes à Gram positif (Williams et al. 1993; Sanglier et Trujillo, 1997) dont le coefficient de Chargaff (G+C%) est généralement compris entre 60 et 75% (Chun *et al.* 1997). Leur croissance est lente et peuvent produire des filaments ramifiés de 0,5-1,0 μm de diamètre (Eunice, 1983). Les actinomycètes sont généralement chimioorganotrophes, utilisant une grande variété de sources d'énergie y compris les polymères complexes, d'autres espèces sont chimioautotrophes (Mariat et Sebald, 1990; Ensignet *al.* 1993). Préférant un pH neutre ou peu alcalin, ils sont généralement mésophiles, d'autres sont thermophiles tolèrent des températures avoisinant les 50°C pouvant même aller jusqu'à 60°C (Omura, 1992). Ce sont les microorganismes le plus largement distribué dans la nature (Narayana et *al.* 2008). En effet, c'est un groupe microbien qui manifeste une diversité considérable à mode de sporulation complexe, mais également grâce à leur capacité de produire un large éventail de métabolites secondaires (Bouix, 1993).

2. Systématique et critères d'identification

2.1. Taxonomie des actinomycètes

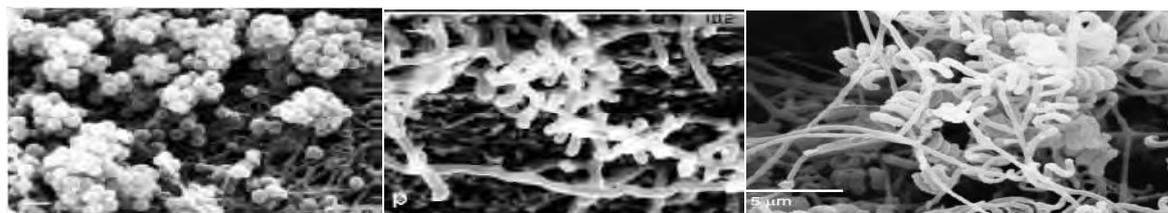
La taxonomie des actinomycètes est basée sur plusieurs critères : morphologiques, chimique, physiologique et moléculaires. L'identification des genres est facilitée par les études morphologiques et chimiques tandis que les critères physiologiques et moléculaires (ex : hybridation ADN-ADN) séparent les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

2.2. Critères d'identification

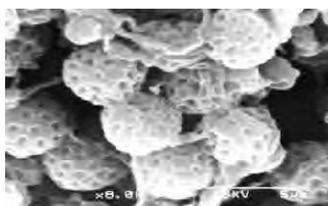
2.2.1. Critères morphologique

Les critères macro et micromorphologiques importants

- La couleur du mycélium aérien (MA) et mycélium du substrat (MS) ainsi que l'aspect des colonies.
- La formation de spores exogènes sur le MA et/ou sur le MS, leur forme, leur taille et leur agencement (isolées, en chaînes); la surface des spores (lisse, rugueuse, épineuse ou chevelue) ;
- La présence de spores mobiles (ex : *Planomonospora*, *Planobispora*, *Spirillospora*, *Actinoplanes*) ou non mobiles (ex : *Streptomyces*, *Streptosporangium*, *Micromonospora*, ainsi que de nombreux autres genres...) etc... (figure 1)



(a) *Micromonosporasp.* (b) *Saccharomonosporasp.* (c) *Streptomycesviolaceusniger*



(d) *Streptosporangiumsp*

Figure 1: Photographies au microscope électronique d'isolats d'actinomycètes non mobiles monosporulés et à sporanges (Hayakawa *et al.*, 2004 et Hayakawa, 2008; Ara et Kudo, 2007).

2.2.2. Critères chimiotoxonomiques

La composition de la paroi cellulaire en acides aminés, glucides et lipides constituent le principal caractère utilisé en chimiotoxonomie. Les deux acides aminés pariétaux taxonomiquement importants sont l'acide diaminopimelique (DAP), et la glycine qui peut être présente ou absente (Lechevalier et Lechevalier, 1970). Le DAP peut être parfois remplacé par la lysine, l'ornithine et l'acide diaminobutyrique (DAB) (Becker *et al.* 1965).

Les sucres ayant une importance taxonomiques sont principalement les couples « arabinose-galactose », « xylose-arabinose », « rhamnose-galactose », ou encore le madurose (ou 3-0-méthylgalactose) (Lechevalier et Gerber, 1970).

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

2.2.3. Critères physiologiques

En plus des caractères morphologiques, la détermination des espèces se base également sur les caractères physiologiques. Ceux-ci consistent en des tests de dégradation de différents composés glucidiques, lipidiques et protidiques, polymères complexes, etc. D'autres tests interviennent parfois dans la détermination des espèces, comme la résistance à certains agents antimicrobiens et la tolérance à des conditions extrêmes (température, pH, salinité, etc).

2.2.4. Critères moléculaires

Vers le début des années 1980, la biologie moléculaire a fait son apparition. Parmi les principales techniques moléculaires utilisées en taxonomie, l'analyse des séquences de l'ADN codant pour l'ARN ribosomique 16S (ADNr 16S), l'hybridation ADN-ADN, la détermination du pourcentage de guanine-cytosine (GC%),...etc.

Selon le *Bergey's Manual* de 2012, ces microorganismes sont classés actuellement dans le règne des *Prokaryotae*, le phylum des *Actinobacteria* et la classe des *Actinobacteria* également. Cependant, l'ordre des *Actinomycetales* a été subdivisé en plusieurs ordres (*Actinomycetales*, *Streptomycetales*, *Streptosporangiales*, *Micromonosporales*, *Micrococcales*, etc). Les *Actinobacteria* sont classées, depuis 2012, en 15 ordres, 43 familles et 203 genres (Goodfellow et al., 2012).

3. Ecologie des actinomycètes

Les actinomycètes constituent un groupe microbien largement répandu dans la nature. Ces microorganismes peuvent être rencontrés dans des habitats inhabituels comme les milieux aquatiques et salins, les déserts...etc (Meklat, 2011).

Les actinomycètes sont des microorganismes ubiquitaires rencontrés sur tous les substrats naturels tels que la cellulose (Sanglier et al., 1993 ; Mason et al., 2001), la lignine (Mason et al., 2001), la pectine (Demain et Solomon, 1985 ; Sanglier et al., 1993). Bien que les premières souches d'actinomycètes aient été isolées de sources humaines et animales, respectivement par Cohn en 1875 et Nocard en 1888, c'est la source tellurique (sol) qui représente le réservoir le plus riche, à partir duquel ces microorganismes peuvent envahir de nombreux biotopes. Ils sont généralement moins nombreux que les autres bactéries mais plus nombreux que les champignons (Bouix, 1993).

4. Cycle de développement du genre *Streptomyces*

La diversité morphologique est un caractère remarquable des actinomycètes chez lesquels des formes multiples sont observées, depuis la cellule coccoïde ou bacillaire jusqu'au mycélium complexe générateur de spores enveloppées dans un sporange chez certains genres. Cette diversité morphologique se traduit le plus souvent par une différenciation importante et l'existence d'un cycle biologique semblable à celui de certains eucaryotes (Figure 2). Ainsi, les actinomycètes les plus différenciées sur un milieu gélosé présentent une masse d'hyphes mycéliens répartis en deux couches distinctes : le mycélium du substrat et le mycélium aérien. Selon les cas, des spores peuvent se former sur le mycélium aérien ou sur le mycélium du substrat ou les deux à la fois permettant la propagation de la souche (Bouix, 1993).

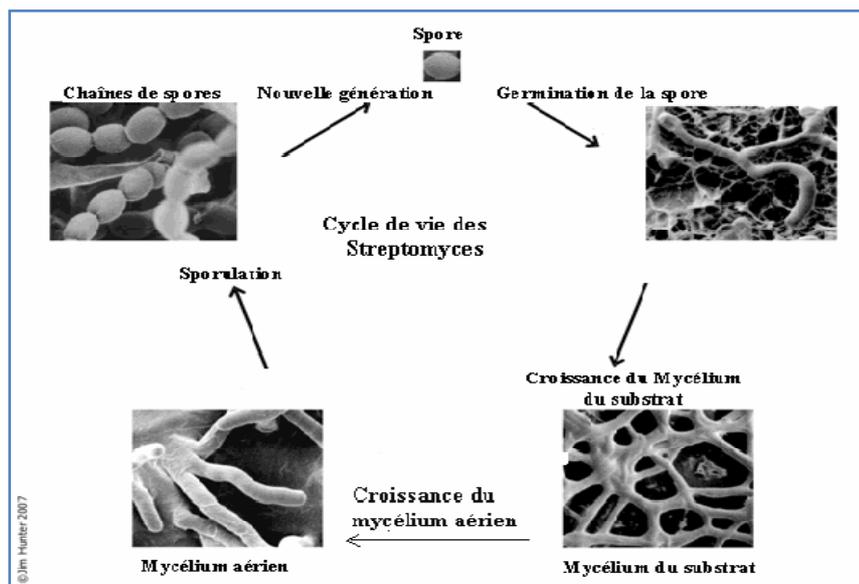


Figure2: Croissance d'une colonie d'actinomycètes sur milieu solide (Saci., 2011)

II. Production d'antibiotiques par les actinomycètes

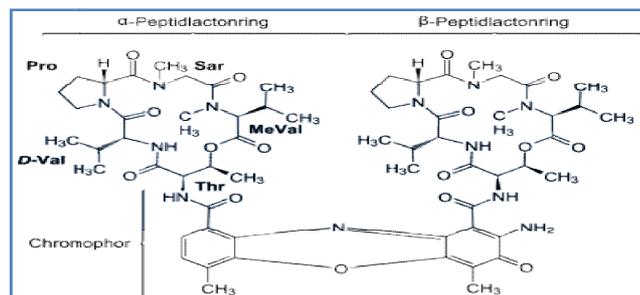
1. Actinomycines D, historique et structure

Les actinomycines sont des antibiotiques appartenant à la famille des chromopeptides lactone (figure 3), représentant une importante classe de produits naturels qui en dépit de leur première découverte il y'a plus de 70 ans, continuent d'être une priorité dans de nombreux domaines de recherche, notamment, en biologie et en médecine. Parmi la famille, l'actinomycine D a été la plus étudiée et est largement utilisée pour le traitement des tumeurs malignes, telle que la tumeur de Wilms (Farberet *al.*, 2002).

La première actinomycine a été isolée en 1940 à partir de l'espèce de *streptomycesantibioticus*, elle a été décrite comme une substance rouge, cristalline, active vis à vis des microorganismes Gram-positifs, mais sa toxicité a exclu son utilisation clinique comme antibiotique. L'intérêt pour les actinomycines a été rétabli en 1952 où l'activité antitumorale d'une autre actinomycine (C) sur des tumeurs de souris et de rat a été décelé par Hackmann et Schulte a rapporté les premières études cliniques (Farberet *al.*, 2002).

2. Mode d'action

L'activité biologique des actinomycines est exercée par inhibition de la synthèse de l'ARN, qui empêche de ce fait la synthèse des protéines. L'effet est expliqué par la forte liaison de



l'actinomycine à l'ADN double-brin. Ce complexe est généralement détecté par une absorption spectroscopique ou par élévation de la température de dénaturation thermique de l'ADN (Wang *et al.* 2012). Elle a été utilisée comme agent thérapeutique pour le traitement du SIDA, car c'est un puissant inhibiteur du VIH (Guo *et al.*, 1998).

Figure 3 : Structure moléculaire de l'actinomycine D ainsi que le chromophore : phenoxazinone

III. Effet des paramètres de cultures sur la production d'antibiotiques et la croissance

1. Influence des sources de carbone et d'azote

Le choix de la source du carbone influence fortement le métabolisme secondaire et par conséquent la production d'antibiotique (Martin et Demain, 1980; Doull et Vining, 1990; Spizec et Tichy, 1995). Les substrats rapidement métabolisés tels que le glucose peuvent souvent réaliser des taux de croissance cellulaire maximal, mais sont connus pour inhiber la production de nombreux métabolites secondaires.

La source d'azote régule le métabolisme secondaire comme la source de carbone. Les niveaux élevés d'azote répriment la production d'antibiotiques pendant l'idiophase (Ahronowitz, 1980; Doull et Vining, 1990; Spizec et Tichy, 1995).

2. Influence des sels minéraux

Plusieurs oligoéléments (Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo), cofacteurs de la croissance des microorganismes, sont nécessaires à des concentrations très faibles (environ 10^{-7} M). Certains jouent un rôle important, quantitativement et qualitativement, dans la biosynthèse des antibiotiques (Strub, 2008).

3. Influence du pH et de la température

La gamme de pH optimale pour les *Streptomyces* se situe entre 6,5 et 8. Les conditions de pH peuvent intervenir sur la production des métabolites secondaires (James et al, 1991). Par exemple la culture de *S. coelicolor* A3 sans contrôle de pH produit de l'actinorhodine.

Dans les mêmes conditions de culture, lorsque le pH est maintenu à une valeur de 7,2, la culture produit un autre métabolite l'undecylprodigiosine (Elibol, 2002)

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

IV. Les plans d'expériences

1. Définition

Un plan d'expériences n'est pas une série d'essais au hasard ni sélectionnés pas la seule intuition, mais 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).

De manière générale, la méthode des plans d'expériences cherche à déterminer et à établir les liens existants entre deux types de variables :

La réponse et les facteurs : grandeur de sortie ou grandeur étudiée

Les facteurs : grandeurs physiques modifiables par l'expérimentateur, sensées influé sur les variations de la réponse. Tous les facteurs susceptibles d'influencer le phénomène doivent être énumérés avant l'expérimentation. Ceux dont on ne désire pas étudier l'influence seront maintenus constants à un niveau donné (Goupy, 1999 ; Goupy, 2005).

Pour cela, la solution proposée consiste dans tous les cas à établir un modèle, exprimant la réponse en fonction des facteurs. Pour bâtir ce modèle, c'est-à-dire de plusieurs configurations pour lesquelles les valeurs des facteurs sont différentes (Goupy, 2001).

2. Avantages d'un plan d'expérience

Un plan d'expériences a pour avantage :

- La diminution de nombre d'essais
- La déduction des paramètres influents
- La possibilité d'évaluer les effets des interactions entre les paramètres
- Une meilleure précision des résultats
- La modélisation mathématique de l'expérience
- La prédiction et l'optimisation (Goupy, 1999 ; Antony, 2003).

3. La modélisation

La modalisation 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 (Goupy, 1999 ; G.E.P.Boxetal., 1978)

Toute réponse expérimentale peut être écrite sous la forme suivante :

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

y : réponse expérimentale

Z_k : facteurs contrôlés

ε : erreur expérimentale

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

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

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

Où x_j sont les coordonnées des facteurs Z_j exprimées en variables centrées réduites, ($j = 1, \dots, k$). \hat{y} est l'estimé (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 (Benoit et al., 1994 ; Goupy, 1999) :

$$y_i = \hat{y}_i + \varepsilon_i$$

On appelle les coefficients :

b_0 : Terme constant de l'équation de régression.

b_j : Effets linéaires.

$b_{u,j}$: Effets d'interactions.

$b_{j,j}$: effets quadratiques

4. Modèle polynomial de premier degré

4.1. 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 (Benoit et al., 1994 ; Goupy, 1999 ; Antony, 2003). Le nombre d'expériences (N) à réaliser est fonction du nombre (k) de paramètres (facteurs) : $N = 2^k$.

4.2. Variable centrée réduite

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

Grace a cette représentation, les différentes variable se transforme en variables centrées réduites, ce qui permet de comparer des variables de grandeur totalement différentes (Ozil, 1997 ; Goupy ;2005 ; Benoit et *al.*, 1994 ; Antony, 2003).

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

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

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

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

Le point de coordonnées $(Z_1^0, Z_2^0, \dots, Z_k^0)$ est dénommé centre du plan ; 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.

4.3. Calcul des coefficients du modèle

On calcule pour chaque coefficient, le produit scalaire de la colonne y par la colonne x_j correspondante, divisé par le nombre d'essais N . Ainsi pour les effets linéaires, les valeurs des coefficients sont déterminées par (Sado et Sado, 1991 ; Antony, 2003).

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

et celles des coefficients d'interaction par :

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

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)

Chapitre II :
Matériel et méthodes

I. Matériel

1. Matériel analytique : Le matériel utilisé dans ce travail est résumé en annexe I.

2. Matériel biologique

2.1. Microorganisme étudié « Actinomycète »

La souche d'actinomycète notée GSBNT10 utilisée dans cette étude appartient à la collection du laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA) de l'Université A. Mira de Bejaia, elle a été isolée à partir d'un échantillon de sol salin (Sebkha) prélevé dans le Sud Algérien, dans la région de Béni Abbes (wilaya de Bechar). Suite à un criblage préliminaire basé sur la détermination de l'effet antagoniste vis-à-vis de microorganismes cibles, bactérien et fongique, cet isolat a été sélectionnée et retenu pour la présente étude.

La souche GSBNT10 a fait objet d'une étude préalable en 2012, de ces métabolites secondaires. C'est derniers ont été purifiés à l'aide de méthodes de séparation (CCM analytique et préparative et HPLC) et structurellement caractérisés par des techniques spectrales (spectroscopie UV-visible, infrarouges, résonance magnétique nucléaire (RMN) et spectrométrie de masse (SM)). Les résultats obtenus ont permis d'identifier et de rattacher les molécules produites comme appartenant à la famille des actinomycines.

2.2. Germes cibles utilisés

Les microorganismes cibles retenus pour cette étude sont :

Bactéries à Gram positif : *Staphylococcus aureus* ATCC 29522 et *Staphylococcus aureus* résistant à la méthiciline (SARM) ATCC 43300, *Listeria innocua* CLIP 74915.

Bactérie à Gram négatif : *Escherichia coli* ATCC 29523.

II. Méthodes

1. Etude morphologique de la souche sélectionnée GSBNT10

1.1. Caractères macromorphologiques

Cette étude consiste à déterminer la couleur des mycélium aérien et du substrat, l'aspect général des colonies ainsi que les pigments solubles produits sur trois milieux de culture différents (le milieu Starch-Casein-Agar (SCA), Czapeck et le milieu Gause).

La composition de ces milieux est donnée en annexe II.

1.2. Caractères micromorphologiques

L'isolat obtenu sur les différents milieux cités précédemment est observé à l'aide d'un microscope optique à deux grossissements (x100) et (x400) après 14 jours d'incubation.

Ces observations sont réalisées directement sur les boîtes de Pétri et ce pour étudier les mycéliums en place sans en altérer les structures. Elles consistent à voir également la sporulation caractéristique ainsi que leur agencement (Williams *et al.*, 1989).

2. Choix du milieu de production de l'actinomycine D

Dans le but de déterminer le meilleur milieu de production de la molécule antibiotique (actinomycine D), trois milieux de culture de compositions différentes ont été utilisés à savoir les milieux cités précédemment.

2.1. Standardisation de l'inoculum de la souche cible

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

2.2. Test d'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de la souche GSBNT10 a été évaluée par la méthode des cylindres d'agar sur le milieu Mueller Hinton (Bastide *et al.*, 1986).

Technique des cylindres d'agar

Cette méthode consiste à ensemencer la souche GSBNT10 sur les trois milieux étudiés et incubé pendant 7 à 10 jours à 28°C. Après incubation, des cylindres de gélose de 6 mm de diamètres sont découpés stérilement à l'aide d'un emporte pièce à partir de ces milieux et déposés à la surface du milieu Mueller Hinton préalablement ensemencé par le germe cible (figure 4).

Remarques

- Le mycélium doit être en contact direct avec la gélose Mueller Hinton.
- L'inoculum ne doit pas être utilisé au delà de 15 minutes après sa préparation.

Les boîtes ensemencées sont maintenues à 4°C pendant 2h avant d'être incubées pour permettre la diffusion des substances actives tout en empêchant momentanément la croissance des microorganismes cibles. Les zones d'inhibition sont mesurées après 24h d'incubation à 37°C.

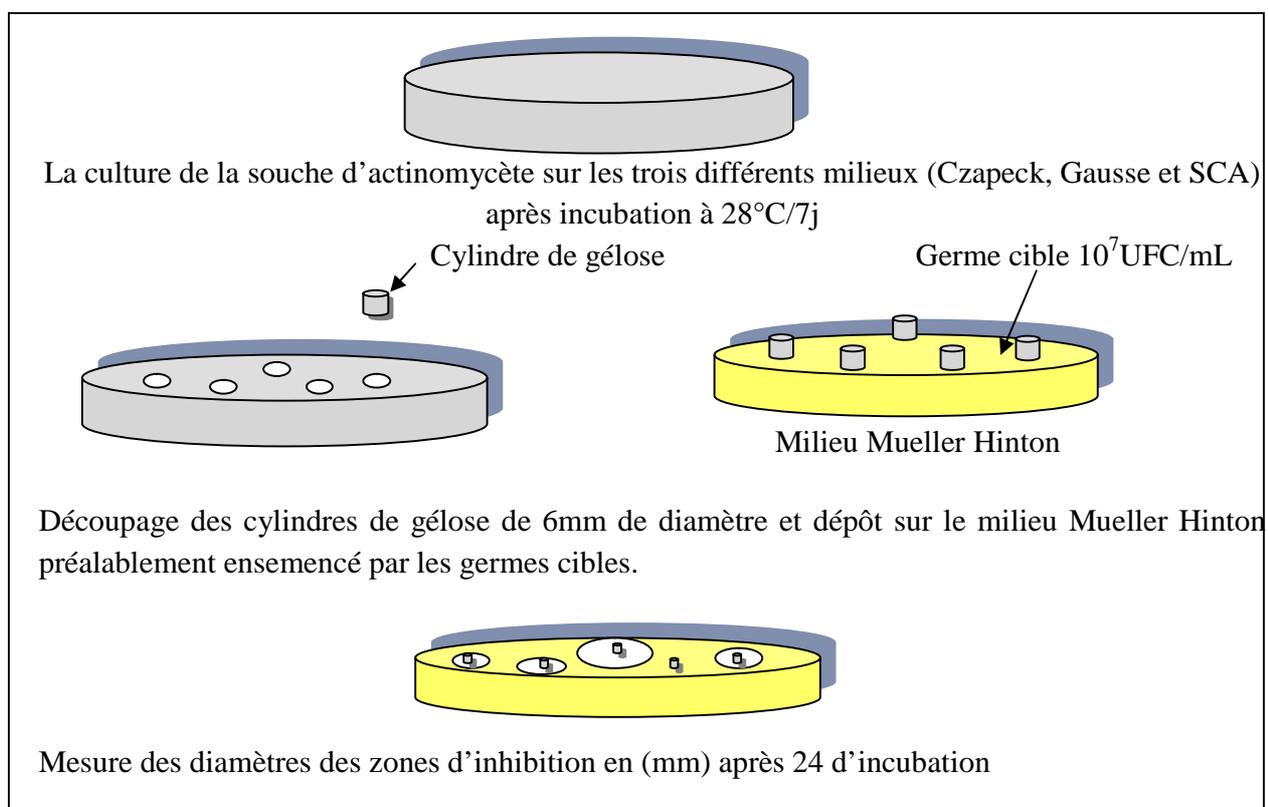


Figure 4 : Mise en évidence de l'activité antibiotique de l'isolat d'actinomycète sur milieu Mueller-Hinton par la méthode des cylindres d'agar (Bastide *et al.*, 1986).

3. Modélisation de la production de l'actinomycine D de la souche GSBNT10

Les paramètres opératoires (Z_1 , Z_2 , Z_3 , Z_4) considérés pour la modalisation de l'activité antibactérienne sont respectivement : la concentration initiale en amidon, en NaNO_3 , K_2HPO_4 , et le pH du milieu. Les valeurs extrêmes de ces derniers sont résumées dans le tableau I ci-dessous.

Tableau I : Valeurs extrêmes des paramètres opératoires étudiés

Paramètres opératoires	Notation	Niveau minimal (-1)	Niveau maximal (+1)
Concentration de la source de carbone (Amidon) (g/l)	Z_1	5	15
Concentration de la source d'azote (NaNO₃) (g/l)	Z_2	2	4
Concentration de la source minérale (K₂HPO₄) (g/l)	Z_3	0,5	1,5
pH	Z_4	5	9

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

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

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 .

Les valeurs des variables naturelles Z_j et X_j des différents paramètres opératoires sont regroupés dans le tableau II ci dessous, que représente la matrice des expériences.

Tableau II : Matrice des expériences pour $k = 4$ et $N = 16 (2^k)$

N° D'essai	Z_1 (g/L)	Z_2 (g/L)	Z_3 (g/L)	Z_4	x_0	x_1	x_2	x_3	x_4
C ₁	5	2	0,5	5	1	-1	-1	-1	-1
C ₂	15	2	0,5	5	1	1	-1	-1	-1
C ₃	5	4	0,5	5	1	-1	1	-1	-1
C ₄	15	4	0,5	5	1	1	1	-1	-1
C ₅	5	2	1,5	5	1	-1	-1	1	-1
C ₆	15	2	1,5	5	1	1	-1	1	-1
C ₇	5	4	1,5	5	1	-1	1	1	-1
C ₈	15	4	1,5	5	1	1	1	1	-1
C ₉	5	2	0,5	9	1	-1	-1	-1	1
C ₁₀	15	2	0,5	9	1	1	-1	-1	1
C ₁₁	5	4	0,5	9	1	-1	1	-1	1
C ₁₂	15	4	0,5	9	1	1	1	-1	1
C ₁₃	5	2	1,5	9	1	-1	-1	1	1
C ₁₄	15	2	1,5	9	1	1	-1	1	1
C ₁₅	5	4	1,5	9	1	-1	1	1	1
C ₁₆	15	4	1,5	9	1	1	1	1	1
C ₁₇	10	3	1	7	0	0	0	0	0

La mise en évidence de l'activité antibiotique de la souche étudiée sur les 17 milieux de culture a été réalisée suivant la méthode des cylindres d'agar citée plus haut.

4. Etude de la cinétique de croissance de la souche GSBNT10

4.1. Préparation de la suspension de spore

L'isolat étudié a été ensemencé à la surface du milieu Czapeck par stries serrées et mis à incuber pendant 7 à 10 jours à 28 °C. La période d'incubation écoulée, la boîte de Pétri contenant la culture a été inondée avec 5 mL d'eau physiologique stérile, la surface de cette dernière a été légèrement grattée afin de récupérer le mycélium contenant les chaînes de spores. La suspension est par la suite récupérée puis vortexée afin de casser et de séparer les chaînes de spores puis conservée à 4°C.

4.2. Méthode des spots

Cette technique consiste à déposer un volume de 10µL de la suspension de spores à la surface des 17 milieux de culture Czapeck donnée par la matrice d'expérience et cela au centre de chaque boîte et incubée à 28°C pendant 14 jours. La croissance des souches est mesurée par l'évaluation des diamètres des colonies (exprimée en mm) chaque 2 jours jusqu'au 14^{ème} jour (Mahyudin, 2008).

Les vitesses de croissance sont alors calculées selon la relation :

$$\text{Croissance de la souche (mm/jour)} = dx/dt,$$

tel que $dx = (\text{diamètre de la colonie au jour 14} - \text{diamètre de la colonie au jour 0})$

$dt = \text{Période d'incubation : 14 jours.}$

*Chapitre III : Résultats
et discussions*

Dans ce qui suit, seront abordés les résultats et la discussion des parties de ce travail relatifs à l'influence des différents paramètres de culture de la souche d'actinomycète GSBNT10 en vue de produire l'actinomycine D. 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.

1. Etude morphologique de la souche sélectionnée GSBNT10

Celle-ci a porté sur des critères macromorphologiques et micromorphologiques.

1.1. Caractères macromorphologiques

Les propriétés culturales de l'isolat GSBNT10 cultivés sur différents milieux de culture à 28°C pendant 14 jours sont présentées dans le tableau III.

Trois milieux de culture ont été utilisés ; la souche a présenté une bonne croissance sur la totalité des milieux.

Le mycélium aérien (MA) est gris sur les trois milieux utilisés avec toutefois une légère différence dans la couleur du mycélium du substrat (MS). Celui-ci varie selon le milieu utilisé, du jaune clair au gris foncé, avec formation d'un pigment diffusible de couleur jaune.

La croissance de l'isolat GSBNT10 sur milieu Czapeck est représentée dans la figure 5.

Tableau III: Caractéristiques macromorphologiques de la souche GSBNT10 après 21 jours d'incubation

Milieux	Croissance	Mycélium aérien	Mycélium du substrat	Pigments diffusibles	Aspect des colonies
SCA	Moyenne	Gris-crème	Jaune clair	Jaune	Rugueux
Gausse	Bonne	Gris foncé	Gris foncé	Jaune	Spongiforme
Czapeck	Bonne	Gris clair	Gris foncé	Jaune	Spongiforme



Figure 5 : Colonies de l'isolat GSBNT10 sur milieu Czapeck

1.2. Caractéristiques micromorphologiques

Les filaments du mycélium aérien de l'isolat sont non cloisonnés, fins sans formes caractéristiques et se fragmentent en de longues chaînes de spores sphériques et/ou en bâtonnets.

Les sporophores, les sporanges, les spores mobiles, les synnemata et les sclérotés sont absents.

La figure 6 représente le mycélium aérien de la souche étudiée au microscope optique (x100).

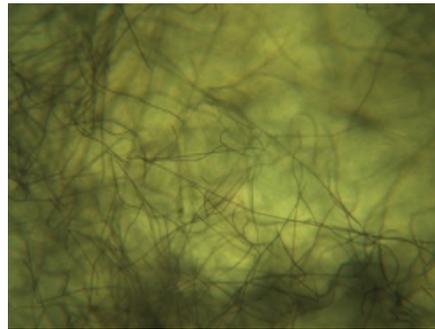


Figure 6 : Micromorphologie de la souche GSBNT10 cultivées pendant 7 jours à 28°C sur milieu Czapeck, vu au microscope optique : des filaments du mycélium aérien. (x100).

En se basant sur les caractéristiques morphologiques de la souche étudiée, il a été possible de la rattacher au genre *Streptomyces*. En effet, les bactéries appartenant à ce genre actinomycetale présente des caractéristiques typiques et facilement reconnaissables, particulièrement la forme des colonies ainsi que leurs aspect (présence du MA et du MS) mais également la disposition des chaînes de spores et leur agencement.

2. Choix du milieu de production de l'actinomycine D

Dans le but de sélectionner le meilleur milieu de culture permettant une production maximale de l'antibiotique, trois milieux de culture ont été utilisés : SCA, Gausse et Czapeck.

La souche a été cultivée pendant 7 jours à 28°C et la mise en évidence de l'activité antibactérienne a été réalisée par la méthode des cylindres d'agar. Le milieu pour lequel la souche a présenté une production maximale de l'antibiotique exprimée en termes de zones d'inhibition a été sélectionné pour la suite de notre travail.

Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 7 ci-dessous.

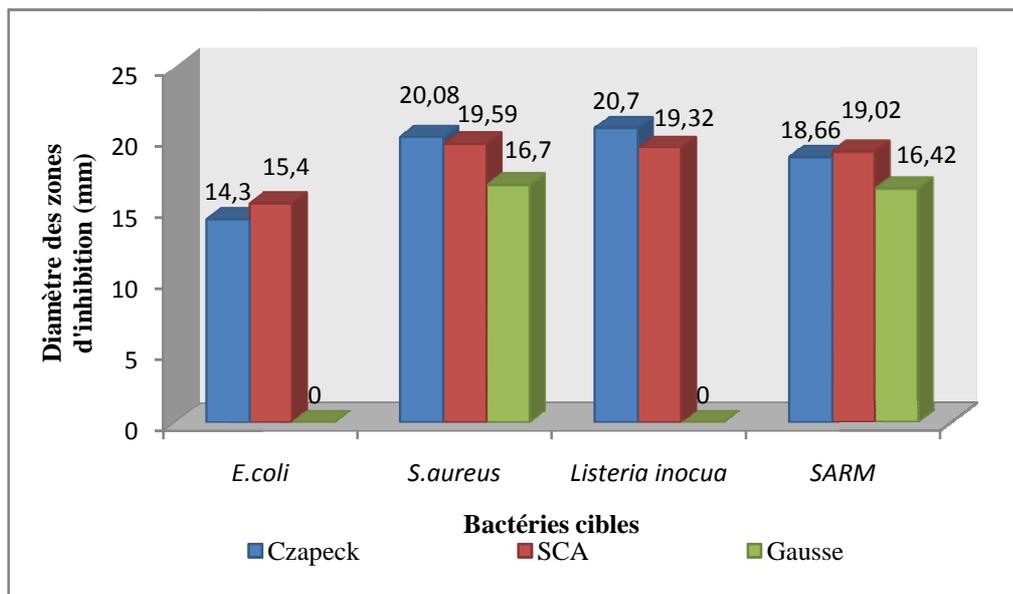


Figure 7 : Activité antagoniste de la souche GSBNT10 à l'égard des germes cibles en utilisant 3 milieux de culture différents

D'après les résultats obtenus et illustrés dans la figure 7, la souche étudiée présente des activités antibactériennes relativement importantes aussi bien vis-à-vis des bactéries à Gram positif que des bactéries à Gram négatif, avec toutefois, un meilleur antagonisme vis-à-vis des bactéries à Gram positif. En effet, les diamètres des zones d'inhibition varient entre 0-15,40mm à l'encontre d'*E.coli* et de 16,7-20,8 mm vis-à-vis de *S. aureus*.

D'autre part, les activités les plus importantes ont été enregistrées en utilisant le milieu Czapek, avec des diamètres de 14,3 vis à vis de *E coli*, 20,8 mm vis-à-vis de *S.aureus*, 20,70 mm vis à vis de *Listeria innocua* et 18,66 mm vis à vie du SARM comparativement aux deux autres milieux de culture utilisés SCA et Gausse.

Suite à ces résultats, le milieu Czapek a été sélectionné comme étant le meilleur milieu de production de l'actinomycine D et pour ce fait a été retenu pour la suite du travail.

3. Modélisation de l'activité antibiotique de la souche GSBNT10 par un plan factoriel complet avec interactions

3. 1. Caractéristiques morphologiques de la souche étudiée

Après avoir préparé les 17 milieux de culture nécessaires à l'étude, à partir de la matrice générée par le plan d'expérience, la souche étudiée a été ensemencées sur ces derniers et ces caractères morphologique ont été relevés et présentés dans le tableau IV.

Tableau IV : Caractères morphologique de la souche GSBNT10 au 14^{ème} jours de croissance sur les différents milieux Czapeck

Milieux	Aspect des colonies	Aspect du MA	Aspect du MS	Pigments diffusibles	Croissance
C ₁	Petites taille à aspect rayonnant	Gris foncé	Gris clair	-	Faible
C ₂	Petites taille, bombées rugueuses	Gris clair	Gris clair	-	Bonne
C ₃	Petites taille, bombées rugueuses	Gris foncé	Gris clair	-	Moyenne
C ₄	Petites taille, bombées à aspect poudreux	Gris clair	Gris clair	-	Bonne
C ₅	Petites taille, bombées	Gris clair	Gris clair	-	Faible
C ₆	Petites taille, bombées	Gris clair	jaune clair	-	Moyenne
C ₇	Petites taille, bombées	Gris clair	Crème	-	Faible
C ₈	Petites taille, bombées	Gris clair	Gris clair	-	Moyenne
C ₉	Petites taille, bombées	Gris à crème	Crème	-	Bonne
C ₁₀	Petites taille, bombées	Crème	Marron orangé	Marron	Bonne
C ₁₁	Petites taille, bombées	Gris	Marron foncé	Marron foncé	Bonne
C ₁₂	Petites taille, bombées	Crème	Orange	Orange	Bonne
C ₁₃	Petites taille, bombées	Crème	Marron clair orange	-	Faible
C ₁₄	Petites taille, bombées	Crème	Violet	Violet	Bonne
C ₁₅	Petites taille, bombées	Crème	Marron- violet	Marron violet	Bonne
C ₁₆	Petites taille, bombées	Crème	Crème	-	Faible
C ₁₇	Petites taille, bombées	Crème	Violet	Violet	Bonne

C : milieu Czapeck de composition différente

Le tableau IV nous renseigne sur le caractère morphologique de la souche GSBNT10 observée sur les 17 milieux Czapeck. Sur pratiquement tous les milieux, les colonies sont de petites tailles et bombées, avec toutefois des différences notables sur certains tels que les

milieux C₂ et C₃ et C₄ où les colonies présentaient un aspect plutôt rugueux et poudreux et un aspect rayonnant sur C₁.

Concernant la couleur du mycélium aérien, des différences ont été soulevées : il est gris foncé sur les milieux C₁, C₃, gris clair sur les milieux C₂, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₁₁, gris à crème sur le milieu C₉ et crème sur les milieux C₁₀, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇. D'autre part, le mycélium du substrat a également présenté des couleurs variées selon le milieu considéré. En effet, il est gris clair sur les milieux C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, jaune clair sur C₆, crème sur C₇, C₉, C₁₆, marron foncé sur le milieu C₁₁, marron clair sur le milieu C₃, marron violet sur C₁₅ et enfin marron-orange sur le milieu C₁₀ et C₁₃.

D'autre part, la souche produit des pigments diffusibles, nous avons noté du marron sur le milieu C₁₀, du marron foncé sur le milieu C₁₁, du marron violet sur le milieu C₁₅, orange sur le C₁₂ et violet sur le C₁₇, et aucun pigment diffusible n'a été observé chez les autres milieux.

Enfin, la croissance de l'isolat a également été observée, elle est relativement faible sur les milieux C₁, C₅, C₇, C₁₃, C₁₆, moyenne sur les milieux C₃, C₆, C₈, et plutôt bonne sur les milieux restant.

3.2. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de la souche GSBNT10 a été évaluée par la méthode des cylindres d'agar sur le milieu Mueller Hinton. Après 24h d'incubation des bactéries à 37 °C, le diamètre des zones d'inhibition a été mesuré.

Les résultats de l'activité de la souche GSBNT10 à l'égard de *S.aureus* et du SARM sur les 16 milieux Czapeck avec diverses concentrations 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 V représentant la matrice des expériences. Le diamètre de la zone d'inhibition (y) est la moyenne des trois valeurs des diamètres obtenus.

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

Tableau V: Matrice des expériences pour $k = 4$ et $N = 16$ (2^k)

N° D'essai	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 (%) <i>S.aureus</i>	y (%) SARM
C ₁	5	2	0,5	5	1	-1	-1	-1	-1	9,93	9,88
C ₂	15	2	0,5	5	1	1	-1	-1	-1	14,47	13,27
C ₃	5	4	0,5	5	1	-1	1	-1	-1	17,94	17,06
C ₄	15	4	0,5	5	1	1	1	-1	-1	12,49	11,88
C ₅	5	2	1,5	5	1	-1	-1	1	-1	11,22	10,98
C ₆	15	2	1,5	5	1	1	-1	1	-1	14,20	13,13
C ₇	5	4	1,5	5	1	-1	1	1	-1	11,34	10,56
C ₈	15	4	1,5	5	1	1	1	1	-1	12,66	10,88
C ₉	5	2	0,5	9	1	-1	-1	-1	1	14,29	9,11
C ₁₀	15	2	0,5	9	1	1	-1	-1	1	15,31	12,37
C ₁₁	5	4	0,5	9	1	-1	1	-1	1	12,08	10,79
C ₁₂	15	4	0,5	9	1	1	1	-1	1	12,47	10,60
C ₁₃	5	2	1,5	9	1	-1	-1	1	1	10,03	8,68
C ₁₄	15	2	1,5	9	1	1	-1	1	1	12,72	11,27
C ₁₅	5	4	1,5	9	1	-1	1	1	1	23,04	12,22
C ₁₆	15	4	1,5	9	1	1	1	1	1	11,31	8,28
C ₁₇	10	3	1	7	0	0	0	0	0	19,30	14,79

x_0 :variable fictive, x_1 :Amidon, x_2 :NaNO₃, x_3 :sel minéraux et x_4 : pH

Dans le but de modaliser l'activité antibactérienne de la souche GSBNT10, nous avons été contraint de sélectionner les réponses obtenues vis à vis du SARM uniquement au détriment des résultats vis-à-vis de *S. aureus*. Ce choix a été pris en raison du manque de temps qui nous a été préjudiciable, d'une part, mais également au fait que nous avons jugé plus intéressant de modaliser une souche résistante aux antibiotiques.

La moyenne des zones d'inhibitions (réponses) des 16 milieux a l'égare de SARM est de $\bar{y} = 11,31\text{mm}$.

3.3. Calcule des coefficients du modèle

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

Tableau VI : Valeurs des coefficients du modèle

Terme constant	Effets linéaires			
b_0	b_1	b_2	b_3	b_4
11,31	0,15	0,224	-0,56	-0,895

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}
-1,274	-0,01	0,065	-0,489	-0,166	0,257	0,229	0,026	-0,542	0,569	-0,614

3.4. Analyse statistique de l'équation de régression

3.4.1. Vérification de la signification des coefficients

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

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

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

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 ; $\bar{y}_0 = 14,793333\text{mm}$

On aura alors : $S_{rep}^2 = 0,2609333$

Pour identifier les coefficients non significatifs pas le test de student, on détermine les valeurs

de t_j pour chaque coefficient ; $t_j = \frac{|b_j|}{S_{bj}}$

Avec : S_{bj} est l'écart quadratique moyen défini par : $S_{bj} = \frac{S_{rep}}{\sqrt{N}} = 0,12770409$

Les résultats des calculs effectués, sont rassemblés dan le tableau VII ci-dessous :

Tableau VII : Valeurs de t_j calculées

Terme constant	Effets linéaires			
	t_1	t_2	t_3	t_4
t_0	1,175	1,752	4,385	7,008
88,564	1,175	1,752	4,385	7,008

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
9,974	0,078	0,509	3,827	1,302	2,016	1,791	0,206	4,248	4,454	4,806

En utilisant la table de Student relative à un test bilatéral (Annexe III), 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 les valeurs de $t_1, t_2, t_{13}, t_{14}, t_{23}, t_{24}, t_{34}, t_{123}, t_{124}, t_{134}$ sont inférieures à la valeur tabulée (4,3), alors les coefficients correspondants ne sont pas significatifs, et ils seront donc éliminés de l'équation de régression du modèle.

3.4.2. Test de validation de l'équation de régression

1. Recherche de biais

Avant de valider le modèle postulé, nous devons vérifier l'absence du biais, pour cela, on calcule la variance résiduelle qu'on va comparer à la variance de reproduction par le test de Fisher Snedecor :

$$F = \frac{S_{\text{rés}}^2}{S_{\text{rep}}^2}$$

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

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

Pour $N = 16$ et $\ell = 6$ (ℓ est le nombre de coefficients significatifs), $S_{\text{rés}}^2 = 1,2112525$

Ce qui donne $F = \frac{1,2112525}{0,260933} = 4,6419999$

En utilisant la table de Fisher (Annexe IV) on a la valeur tabulée du test de Fisher pour $F_{0,95}(N-1, n_0-1) = F_{0,95}(10, 2)$ égale à 19,4 comme cette valeur est supérieure à celle calculée $F_{0,95}(4,642)$, alors le modèle est sans biais. Ce qui signifie que tous les paramètres influençant la réponse sont pris en considération par le modèle.

2. 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 : $F = \frac{\sum_{i=1}^N (\hat{y}_i - \bar{y})^2 / \ell - 1}{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2 / N - \ell} = 9,08079447$

$$\text{Où } \bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^N y_i}{N} = 11,31 \text{ mm}$$

La valeur tabulée du test Fisher pour $F_{0,95}(\ell - 1, N - \ell) = F_{0,95}(5, 10)$ est égale à 3,33 comme la valeur calculée est supérieure aux valeurs tabulées alors le modèle est valide à 95%. L'équation du modèle s'écrit comme suit :

$$\hat{y} = 11,31 - 0,56x_3 - 0,895x_4 - 1,273x_1x_2 + 0,56875x_2x_3x_4 - 0,61375x_1x_2x_3x_4$$

3. Calcul du coefficient de détermination

Appelé aussi coefficient de corrélation, il est défini par :

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

La formule de correction est :

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

Où \bar{R}^2 est la valeur corrigée du coefficient de régression multiple

La valeur du coefficient de détermination R^2 égale à 0,81950753.

La valeur corrigée du coefficient de régression multiple \bar{R}^2 égale à 0,72926129.

Les valeurs obtenues nous permettent de conclure que le modèle choisi peut être considéré valide.

4. Analyse des résidus

L'évaluation de la qualité du modèle peut être faite par une analyse des résidus (tableau VIII).

Tableau VIII : Calcul des résidus

N° D'essais	y(%)	\hat{y} (%)	Résidu e_i (%)
1	9,88	10,30875	0,04159088
2	13,27	14,08375	0,05777936
3	17,06	15,22125	0,12080151
4	11,88	11,44625	0,03789451
5	10,98	11,55375	0,0496592
6	13,13	12,87375	0,01990485
7	10,56	11,73625	0,10022367
8	10,88	10,41625	0,04452178
9	9,11	10,88375	0,16297232
10	12,37	12,20375	0,01362286
11	10,79	11,06625	0,02496329
12	10,6	9,74625	0,08759779
13	8,68	7,39875	0,17317114
14	11,27	11,17375	0,00861394
15	12,22	12,31125	0,00741192
16	8,28	8,53625	0,03001904

➤ **Calcul de la moyenne des résidus :**

$$Moy_{résidus} = \frac{\sum e_i}{N} = 0,0019$$

Avec :

e_i : résidus

N : nombre d'essais

➤ **Diagramme des résidus :**

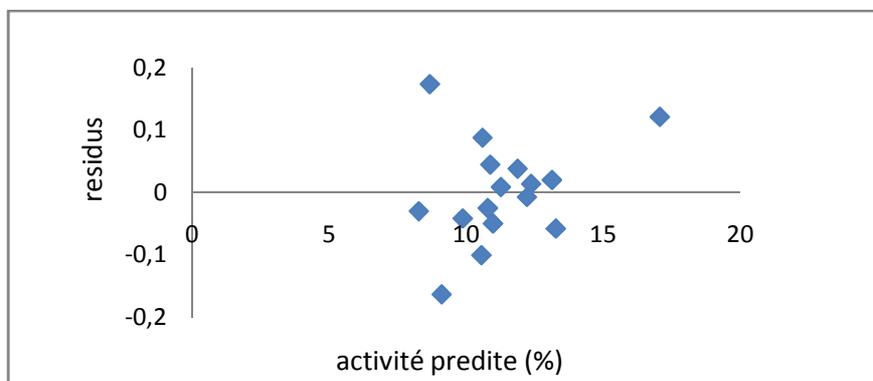


Figure 8 : Diagramme des résidus

Le diagramme des résidus ci-dessus (figure 8) ne laisse apparaître aucune relation entre les valeurs prédites et les résidus, car les points semblent disposés aléatoirement et aussi la valeur moyenne des résidus est $\text{Moy}_{\text{résidus}} = 0,00196929$ elle est proche de 0 (tableau VIII). Ce résultat traduit l'absence d'informations dans les résidus et que tout est expliqué par le modèle de régression obtenu.

En conclusion, le modèle obtenu explique bien les résultats expérimentaux. Les tests d'évaluation le confirment (les tests statistiques et l'analyse des résidus). Nous pouvons donc confirmer que le modèle est adéquat, il sera exploité pour l'optimisation du rendement de la production de l'actinomycine D.

4 Etude des effets linaires et d'interactions des différents paramètres

4.1. Effets linaires

D'après le modèle obtenu par l'application d'un plan factoriel complet avec interactions, on remarque que tous les facteurs opératoires ont une influence négative sur l'activité de l'actinomycine D à savoir la concentration en source minérale (x_3) avec un effet de (-0,56) et le pH (x_4) avec un effet de (-0,895).

Le signe négatif nous indique que l'augmentation de la concentration en K_2HPO_4 de sa valeur minimale (0,5 g/l) à sa valeur maximale (1,5 g/l) fait diminuer l'activité de l'actinomycine D. En ce qui concerne l'effet du pH nos résultats montrent que, lorsqu'on augmente ce dernier de son niveau minimum 5 à son niveau maximum 9 on remarque une légère baisse de l'activité antibactérienne ce qui implique une diminution de la production de l'actinomycine D. Des études similaires effectuées par Vandana Praveen et collaborateurs en 2008, dans le but d'avoir des niveaux élevés d'actinomycine D, en utilisant la méthodologie des surfaces de réponse ont été entrepris en fixant la concentration du K_2HPO_4 à 1 g/l et le pH à 7.

4.2. Etude des interactions

D'après le modèle de régression obtenue, on remarque que la seule interaction qui existe est celle entre la concentration en amidon (x_1) et en NaNO_3 (x_2) avec un effet négatif.

L'effet d'interaction du couple x_1 - x_2 est représenté par un diagramme, ce dernier est particulièrement commode pour déterminer la zone du domaine expérimental où l'optimum (la plus forte activité avec une plus grande zone d'inhibition) doit être recherché.

La figure ci-dessous nous résume le tableau présenté en annexe V qui regroupe les valeurs moyennes des résultats des mesures obtenus pour le couple x_1 - x_2 .

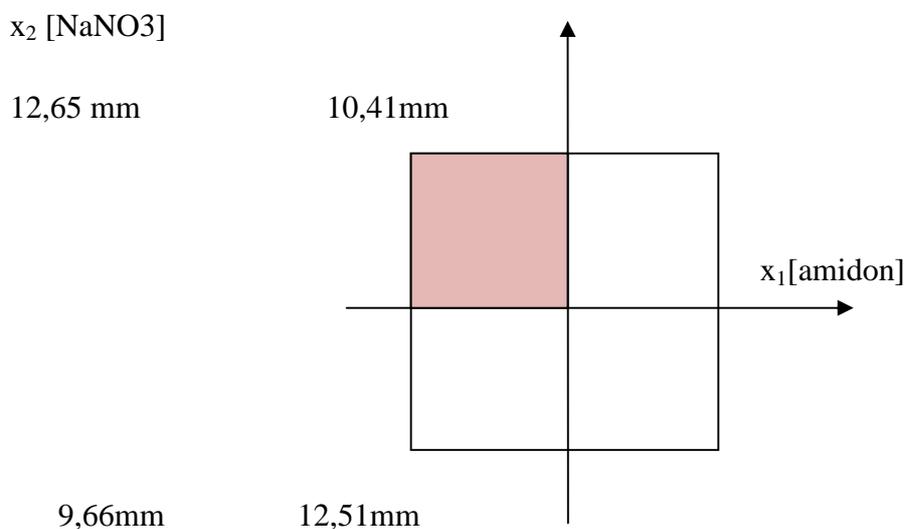


Figure 9: Représentation graphique de l'interaction 1-2 (concentration en amidon-la concentration en NaNO_3) pour l'activité antibactérienne de la souche GSBNT10

Nous remarquons qu'une bonne activité anti-SARM (12,85 mm) est obtenue avec une faible concentration en amidon (5 g/l) (x_1) et une forte concentration en NaNO_3 (4 g/l) (x_2).

Des études similaires ont été réalisées par Vandana Praveen et collaborateurs en 2008, en utilisant la méthodologie des surfaces de réponse, ils ont démontré l'existence d'une interaction positive entre la source de carbone (le fructose) et d'azote (NaNO_3), cette interaction a permis d'avoir des niveaux élevés d'actinomycine D.

Une autre étude menée par Queiroz Sousa et collaborateurs en 2001, stipule que l'interaction entre la source d'azote (L(-) Threonine) à une concentration de 3,57 mg/l avec une source de carbone (D(+)) Fructose nous donne une meilleure production de l'actinomycine D (67,9 mg/l). D'autres travaux réalisés par Hamza et collaborateurs en 2013, ont démontré que l'utilisation de l'amidon comme source de carbone permettait d'avoir des niveaux plus élevés d'actinomycine D (306 mg/l) pour la souche *Streptomyces sp.* AH 11,4. Ces derniers résultats appuient les observations de Lebrihi et collaborateurs en 1988 ainsi que Lounès et collaborateurs en 1995, sur le fait que la production spécifique de métabolites secondaires s'avère souvent meilleure sur une source de carbone complexe, plus difficilement métabolisable comme les polysaccharides (amidon, dextrines).

5. Optimisation

Après l'étape de la modélisation qui a permis d'aboutir à un model du premier degré traduisant de manière fiable l'effet de variation des différents paramètres opératoires (la concentration de l'amidon, NaNO_3 , K_2HPO_4 , et le pH) sur l'activité antibactérienne de la souche GSBNT10, on procède a l'optimisation qui consiste à déterminer les valeurs de ces facteurs qui entraînent une meilleure activité de cette souche. 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 apparait, ainsi que toutes les conditions opératoires menant à ce dernier.

➤ **Recherche de l'optimum**

Rappelons l'équation de régression donnant le diamètres de la zone d'inhibition de l'activité de l'actinomycine D (\hat{y}) en fonction des différents facteurs à savoir, la concentration de l'amidon, de NaNO_3 , de K_2HPO_4 et du pH différent correspondant respectivement aux variables codées x_1 , x_2 , x_3 et x_4 .

$$\hat{y} = 11,31 - 0,56x_3 - 0,895x_4 - 1,273x_1x_2 + 0,56875x_2x_3x_4 - 0,61375x_1x_2x_3x_2$$

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 SARM. Les surfaces de réponses sont obtenues à l'aide du logiciel MATLAB 7.0 en traçant le diamètre de la zone d'inhibition dans le plan x_1 - x_2 à différents niveaux de x_3 , x_4 .

- Pour $x_4=0$, $x_3=0$

$$\hat{y} = 11,31 - 1,273x_1x_2$$

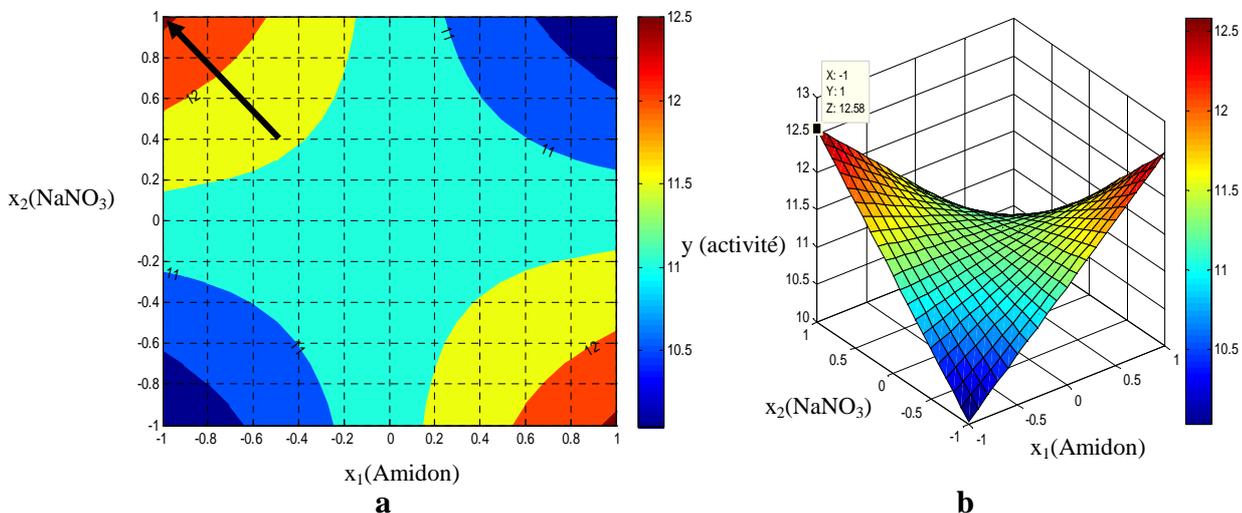


Figure 10 : Courbe isoréponse et surface de réponse pour : $x_3=0, x_4= 0$

L'analyse de la courbe isoréponses (a) montre que l'activité de l'actinomycine D augmente dans le sens de l'augmentation de la concentration de $\text{NaNO}_3(x_2)$ 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 réponses (b) correspondante nous informe qu'une activité de 12,58 mm peut être atteinte pour une concentration en $\text{NaNO}_3= 4 \text{ g/l}$ ($x_2= +1$) et en amidon = 5 g/l ($x_1= -1$).

- Pour $x_3=-1, x_4=-1$

$$\hat{y} = 12,765 + 0,569x_2 - 1,887x_1x_2$$

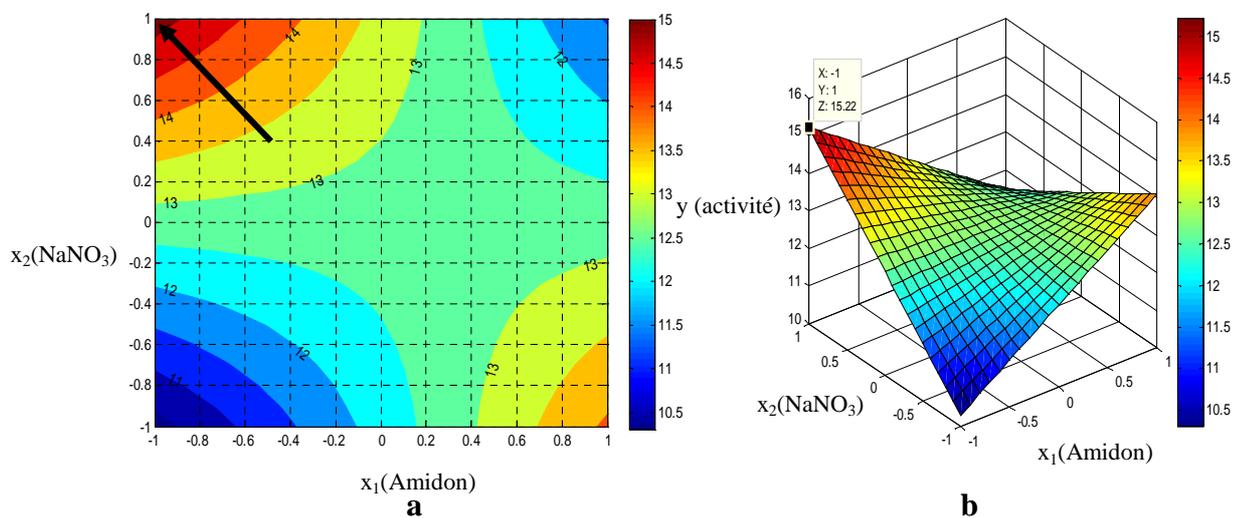


Figure 11 : courbe isoréponse et surface de réponse pour : $x_3=-1, x_4= -1$

Il ressort de cette courbe isoréponse (a) que l'activité de l'actinomycine D augmente dans le sens de l'augmentation de la concentration de $\text{NaNO}_3(x_2)$ et de la diminution de la concentration de l'amidon (x_1) comme l'indique la flèche sur cette courbe. La surface de réponses (b) correspondante montre qu'une activité de 15,22 mm peut être atteinte pour une concentration en $\text{NaNO}_3= 4 \text{ g/l}$ ($x_2= +1$) et en amidon = 5 g/l ($x_1= -1$).

- Pour $x_3=+1, x_4= +1$

$$\hat{y} = 9,855 + 0,569x_2 - 1,887x_1x_2$$

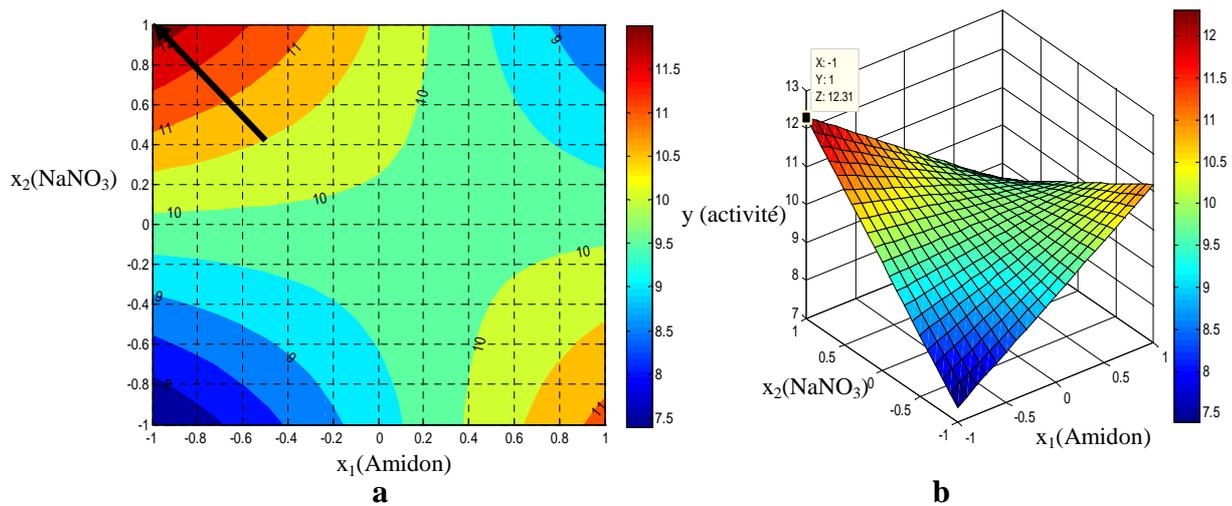


Figure 12 : courbe isoréponse et surface de réponse pour : $x_3=+1, x_4=+1$

Selon le sens de la flèche indiquée sur la courbe isoréponse (a), l'activité de l'actinomycine D augmente dans le sens de l'augmentation de la concentration de $\text{NaNO}_3(x_2)$ et de la diminution de la concentration de l'amidon (x_1). La surface de réponses (b) correspondante nous renseigne qu'une activité de 12,31 mm peut être atteinte pour une concentration en $\text{NaNO}_3 = 4 \text{ g/l}$ ($x_2=+1$) et une concentration en amidon = 5 g/l ($x_1=-1$).

- Pour $x_3=+1, x_4=-1$

$$\hat{y} = 11,645 + 0,569x_2 - 0,659x_1x_2$$

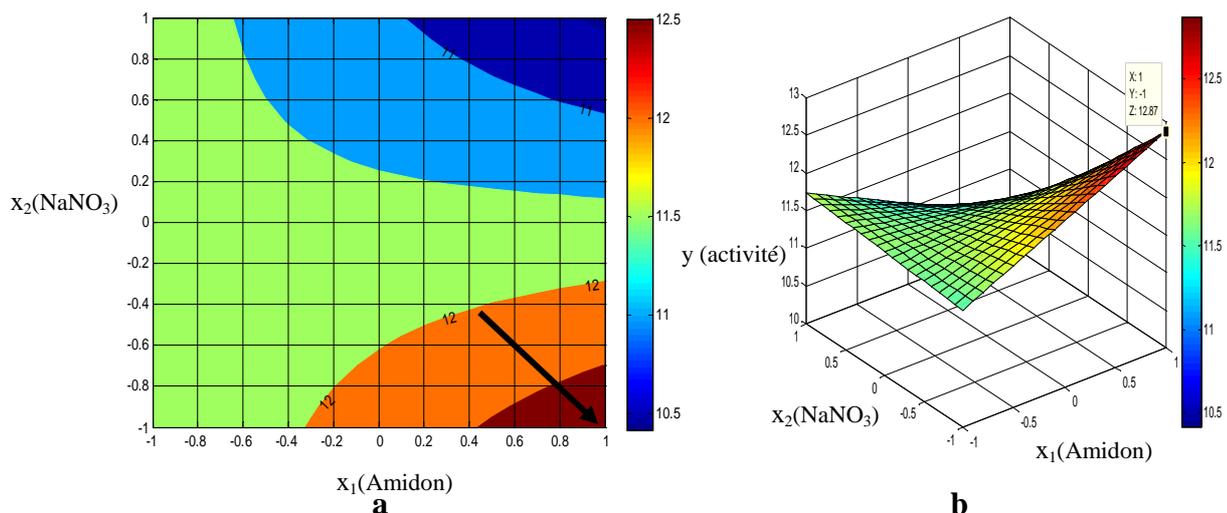


Figure 13: courbe isoréponse et surface de réponse pour : $x_3=+1, x_4=-1$

La flèche sur la courbe isoréponse (a) indique que l'augmentation de l'activité de l'actinomycine D va dans le sens de l'augmentation de la concentration de l'amidon (x_1) et de

la diminution de la concentration de NaNO_3 (x_2), la surface de réponse (b) montre que pour une concentration de 15 g/l en amidon($x_1=1$)et une concentration en $\text{NaNO}_3=2$ ($x_2=-1$) une activité de 12,87 mm est obtenue.

- Pour $x_3=-1$, $x_4=+1$

$$\hat{y} = 10,975 - 0,569x_2 - 0,659x_1x_2$$

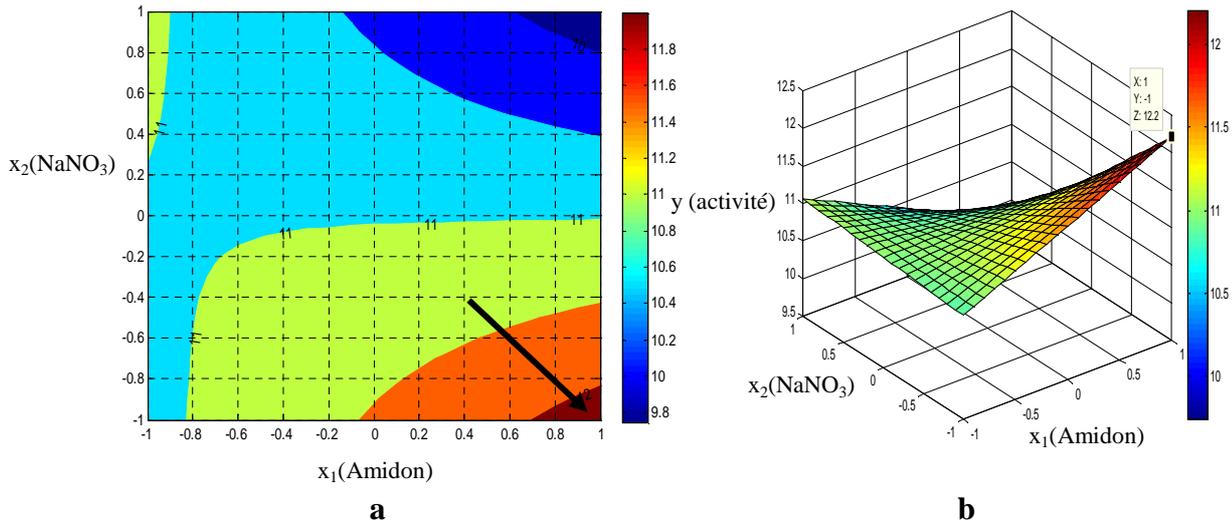


Figure 14: courbe isoréponse et surface de réponse pour : $x_3=-1$, $x_4=+1$

La figure 16 nous montrent quela flèche sur la courbe isoréponse (a) indique une augmentation de l'activité de l'actinomycine D dans le sens de l'augmentation de la concentration de l'amidon (x_1) et la diminution de la concentration de NaNO_3 (x_2), la surface de réponse (b) montre que pour une concentration de 15 g/l en amidon($x_1=1$) et une concentration en $\text{NaNO}_3=2$ ($x_2=-1$) une activité de 12,02 mm est obtenue.

Daprès toutes les courbes tracées précédemment, on peut conclure que la meilleure activité antibactérienne ($y= 15,22$ mm) peut être obtenue pour les conditions suivantes des différents paramètres opératoires :

- | | | |
|------------|--------|----------------------------------------|
| $x_1 = -1$ | —————> | [amidon] = 5 g /l |
| $x_2 = +1$ | —————> | [NaNO_3] = 4 g/l |
| $x_3 = -1$ | —————> | [K_2HPO_4] = 0,5 g/l |
| $x_4 = -1$ | —————> | pH = 5 |

7. Etude de la croissance de la souche GSBNT10

Dans le but d'étudier la croissance de la souche GSBNT10 sur différents milieux et d'en déterminer ainsi le meilleur milieu permettant une croissance optimale, nous avons procédé à

la culture de l'isolat, en utilisant la composition des 17 milieux de culture obtenus à partir de la matrice générée par le plan d'expérience.

La souche a étéensemencée à la surface des milieux en utilisant la méthode des spots. Le diamètre des colonies a été mesuré durant 14 jours et les vitesses de croissance calculées. La variation des diamètres des colonies en fonction de la composition des milieux de culture pendant 14 jours d'incubation est illustrée sur la figure 15

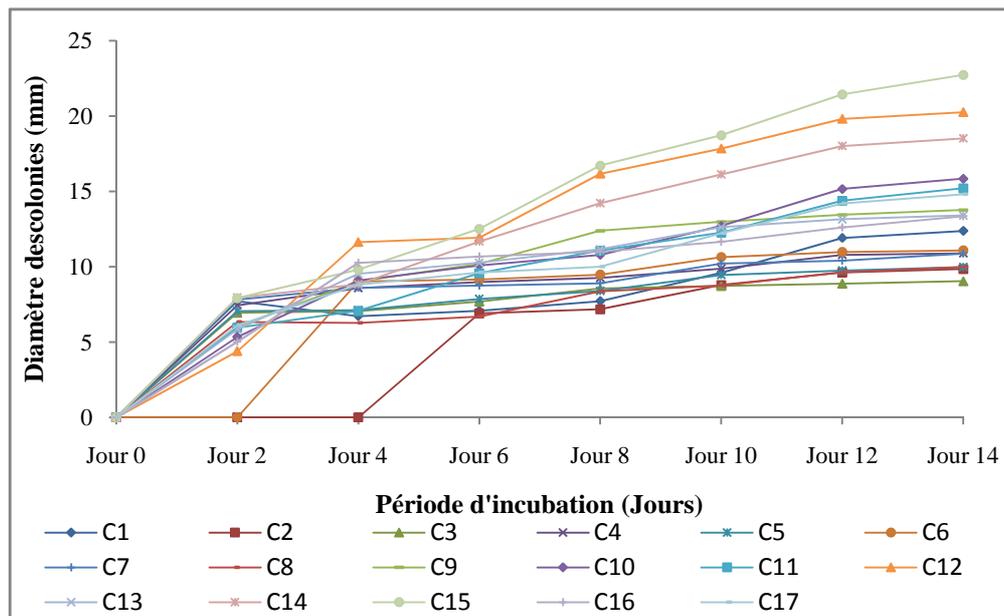


Figure15: Cinétique de croissance de la souche GSBNT10 sur différents milieux Czapeck pendant 14 jours d'incubation à 28°C.

D'après les résultats obtenus, on remarque que la croissance débute pour pratiquement tout les milieux utilisés à partir du 2^{ème} jour d'incubation, mis à part pour les milieux C₂ et C₆ pour lesquels la croissance a débuté, respectivement, à partir du 4^{ème} et du 6^{ème} jour d'incubation, en déduire que la phase de latence de la souche est relativement longue sur ces deux milieux de culture.

Après 6 à 8 jours d'incubation, une croissance minimale a été observée sur le milieu C₂ et une croissance maximale sur milieu C₁₅. Ceci peut être dû à la concentration en amidon qui est de 5g/l au lieu de 15g/l ou à la concentration de NaNO₃ qui est de 4g/l au lieu de 2g/l ou du PH qui est de 9 au lieu de 5 ou bien alors de source minéral 1,5g/l au lieu de 0,5g/l.

Ceci est dû aux différentes concentrations des constituants des deux milieux C₂ et C₁₅. Les concentrations pour la croissance maximale sont : amidon (5 g/l), NaNO₃ (4 g/l), K₂HPO₄

(1,5g/l) et à pH 9, au lieu des concentrations qui nous donnent une croissance minimale qui sont de 15g/l en amidon, 2g/l en NaNO_3 , 2g/l, K_2HPO_4 de 0,5g/l à pH 5.

Du 8^{ème} au 14^{ème} jours d'incubation, on remarque que la souche présente une croissance optimale sur milieu C₁₅ suivi des milieux C₁₂, C₁₄, C₁₀, C₁₁, C₁₇, C₉, C₁₆, C₁₃, C₁, C₆, C₄, C₇, C₅, C₂, C₃ respectivement.

Concernant les vitesses de croissance les résultats obtenus sont présentés dans la figure 18 ci-dessous

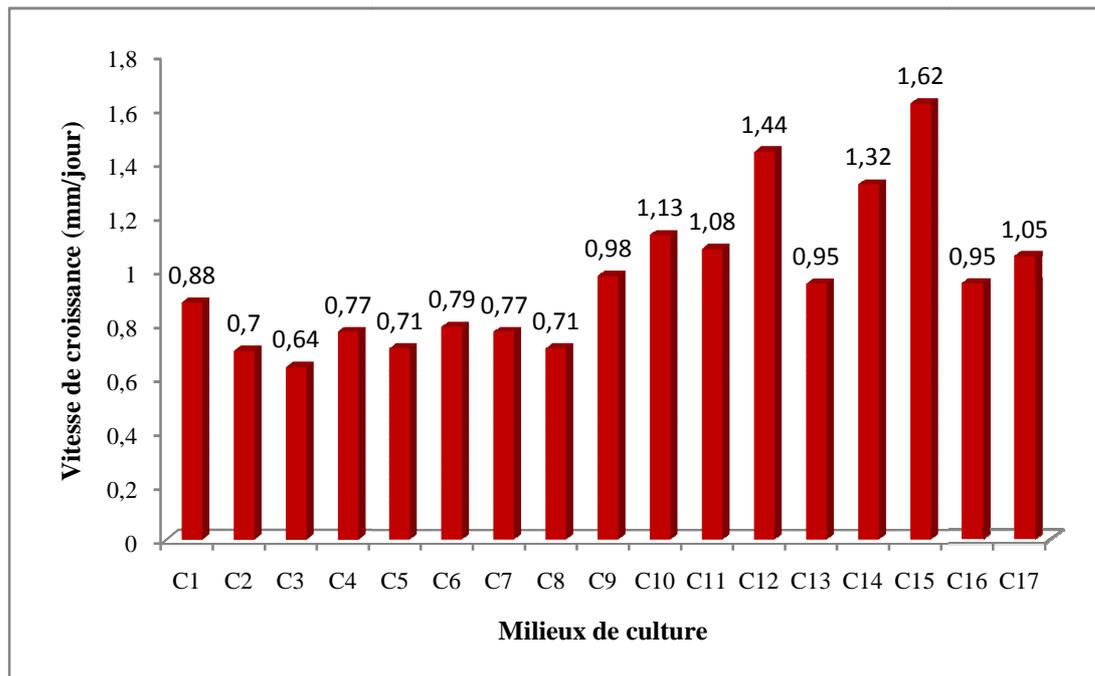


Figure16: Variation de la vitesse de croissance de la souche GSBNT10 en fonction de la composition des milieux de culture après 14 jours d'incubation

La figure 16 montre clairement que la vitesse de croissance de la souche sur le milieu C₁₅ est largement supérieure comparée aux autres milieux utilisés, elle est suivie respectivement, par ordre décroissant des milieux C₁₂, C₁₄, C₁₀, C₁₁, C₁₇, C₉, C₁₆, C₁₃, C₁, C₆, C₇, C₄, C₅, C₈, C₂, C₃, à noter que l'intervalle des vitesses est entre 1,62 mm/jour pour la maximale et de 0,64 mm/jour pour la minimale.

A la lumière des résultats obtenus, il nous a été possible de conclure que le milieu optimal pour la croissance de la souche est le milieu C₁₅ dont la composition est de 5g/l d'amidon, 4g/l de NaNO_3 , 1,5g/l de K_2HPO_4 et à pH=9.

Conclusion

Conclusion

Cette étude avait pour principal objectif l'optimisation de la production de l'actinomycine D par une souche d'actinomycete *Streptomyces* sp. GSBNT10, en utilisant la méthode des plans d'expériences.

Suite à un test d'antagonisme de la souche, cultivée sur trois milieux de culture différents vis-à-vis de germes cibles bactériens, le milieu Czapeck a été sélectionné comme étant le meilleur milieu ayant présenté des activités antibactériennes relativement importantes.

La modélisation de la production de l'actinomycine D a été réalisée en sélectionnant quatre facteurs comme variables : l'amidon comme source de carbone, le NaNO_3 comme source d'azote, le K_2HPO_4 comme source minérale et le pH. Une modélisation statistique et mathématique a été entreprise en vue de sélectionner les paramètres influençant cette production, ainsi que leurs interactions et leur optimisation pour une production maximale de l'actinomycine D. Pour ce faire, un plan factoriel complet avec interactions a été utilisé. L'isolat a été cultivé sur 17 milieux dont le dix-septième est mis à des concentrations standards d'amidon (10 g/l), de K_2HPO_4 (1 g/l), de NaNO_3 (3 g/l) et de pH initial (7).

La modélisation par le biais du plan factoriel complet a montré que le facteur influençant le plus l'activité antibactérienne de la souche étudiée est la source d'azote, suivie de la source de carbone (l'amidon), de la source minérale et enfin le pH. Toutefois, l'interaction la plus importante était marquée par le couple [amidon]-[NaNO_3].

Les concentrations optimales de ces dernières ont pu être délimitées par le tracé des courbes isoreponse et leurs valeurs sont les suivantes ; amidon (5 g/l au lieu de 10 g/l), NaNO_3 (4 g/l au lieu de 3 g/l), K_2HPO_4 (0,5 g/l au lieu de 1,5 g/l) et enfin pH (5 au lieu de 7).

Le modèle plan factoriel complet nous a permis de trouver les conditions des différents paramètres au centre du domaine pour atteindre une activité de 15,22 mm qui est supérieure à celle obtenue sur le milieu C_{17} avant optimisation qui est de 14,79 mm.

L'ensemble des résultats obtenus ont montré qu'avec un seul modèle qui est «le plan factoriel complet» on a pu avoir :

- ✓ La réduction du nombre d'essais.
- ✓ Les effets de chaque constituant du milieu Czapeck.
- ✓ Les interactions entre les différents facteurs.
- ✓ L'optimisation des paramètres de culture.

Conclusion

Et à l'issue de ces résultats, nous pouvons souligner les perspectives suivantes :

- ✓ Elargir la gamme de germes cibles.
- ✓ Optimiser tous les paramètres nutritionnels de cultures.
- ✓ Passer du milieu solide au milieu liquide.
- ✓ Vérifier expérimentalement si l'activité antibiotique correspond à celle prédite par le modèle (15,22 mm

*Références
Bibliographiques*

References bibliographiques

A

- Antony J. (2003). *Design of Experiments for Engineers and scientists*. Edition: Butterworth-Heinemann. Grande bruta. 149p.
- Aharonowitz Y. (1980). Nitrogen metabolite regulation of antibiotic biosynthesis. *Annu Rev Microbiol.* **34**, 209-233.
- Ara I, Kudo T. (2007). *Krasilnikovia* gen. nov a new member of the family Micromonosporaceae and description of *Krasilnikoviacinnamonea* sp. nov. *Actinomycetologica*. 21 Suppl **1**, 1–10.

B

- Becker B, Lechevalier M.P et Lechevalier HA. (1965). Chemical composition of cellwall preparations from strain of various form genera of aerobic actinomycetes. *Appl Microbiol.* **13**, 236-242.
- Benoit D, Tourbier Y, Germain S. (1994). *Plans d'expériences, construction et analyse*. Edition : LAVOISIER. Paris.
- Billerbeck VG, Roques C, Vanrière 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 Suppl **2**, 148-153.
- Bouix M, Leveau J-Y. (1993). *Microbiologie industrielle*. Lavoisier, Paris. 612p.
- Bouras N, Klenk H, Lebrihi A, Meklat A, Mathieu F, Sabaou N, Spröer C, Zitouni A. (2011) A novel strain of *Actinopolysporamortivallis* with antibacterial activity isolated from a Saharan soil. *Springer Ann Microbiol.* **10**, 011-0346.
- Box GEP, Hunter WG et Hunter JS. (1978). *Statistics for experimenters*. Editions d'organisation. Paris.

C

- Chun J, Youn HD, Yim YI, Lee H, Kim MY, Hah YC et Kang SO. (1997). *Streptomyces seoulensis* sp. Nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 492–498.
- Cragg GM, Newman DJ, Whipps JM et Ousley MA. (1997). Natural product in drug discovery and development. *J. Nat. Prod.* **60**, 52-60.

D

- Demain, AL et Martin JF. (1980). Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol Rev.***44**, 230-251.
- Demain AL et Solomon NA. (1985). *Biology of industrial microorganisms*. The Benjamin/Cummings publishing company Inc.p. 291-357.
- Doull JC et Vining LC. (1990). Physiology of antibiotic production in actinomycetes and some control mechanisms. *Biotech Adv.* **8**, 141-158.

E

- Elibol M. (2002). Product shifting by controlling medium pH in immobilized *Streptomyces coelicolor*A3 culture. *Process Biochem.* **37 (12)**, 1381-1386.
- Ensign JC, Normand P, Burden JP et Yallop CA. (1993). Physiology of some actinomycetes genera. *Rev Microbiol.***144**, 657-660.
- Eunice JA, Prosser JI. (1983). Mycelial growth and branching of *streptomyces coelicolor*A3 (2) on solid medium. *J. gen. Microbiol.***129**, 2029–2036.

G

- Goupy J. (1999). *Plans d'expériences pour surfaces de réponses*. Edition : DUNOD. Paris. 409p.
- Goupy J. (2001). *Introduction au plan d'expériences*. 2^{ème} édition : DUNOD. Paris.
- Goupy J. (2005). *Pratiquer les plans d'expériences*. Edition : DUNOD. Paris. 501p.

H

- Hamza1 AA, Ali HA, Clark BR, Murphy CD et Elobied EA. (2013). Optimization of fermentation conditions for actinomycin D production by a newly isolated *Streptomyces sp.* AH 11.4.E3 *Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research.*4 Suppl**2**: 29-34.
- Hayakawa H, Yoshida Y et Iimura Y. (2004). Selective isolation of bioactive soil actinomycetes belonging to the *Streptomyces violaceusniger* phenotypic cluster. *J. Appl. Microbiol.* **96**, 973–981.
- Hayakawa M. (2008). Studies on the Isolation and Distribution of Rare Actinomycetes in Soil. *Actinomycetologica.***22**Suppl 1: 12-19.

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

I

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

J

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

K

- Kampfer P. (2012). The genus streptomyces., in: Goodfellow S, editor second edition, Bergey's Manual of systematic of bacteriology. Second edition New York, Springer Vol5, pp. 1455-767.
- Kitouni M, Boudemagh A, Oulmi L, Reghioia S, Boughachiche F, Zerizer H, Hamdiken H, Couble A, Mouniee D, Boulahrouf A et Boiron P. (2005). Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north-east of Algeria. *Journal de Mycologie. Médicale.* **15**, 45-51.
- Küster, E., Williams, S.T. (1964). Selection of media for isolation of Streptomyces. *Nature.* **202**, 928-929.

L

- Lam Kin S. (2006). Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Current Opinion in Microbiology.* **9**, 245-251.
- Larpent JP et Sanglier JJ. (1989). *Biotechnologie des antibiotiques.* (Ed.), Masson. Paris, 48p.
- Lebrihi A, Lamasaid D, Lefebvre G, Germain P. (1992). Effect of ammonium ions on spiramycin biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 382-387.

- Lechevalier HA et Lechevalier MP. (1970). A critical evaluation of genera of aerobic actinomycetes. *In: The Actinomycetales*. Prauser H. (Eds.), G Fisher Verlag, Jena. 393-405.
- Lechevalier M.P et Gerber N. (1970). The identity of madurose with 3-O-methyl-D galactose. *CarbohydrRes.***13**, 451-454.
- Lechevalier MP, De Bievre C et Lechevalier HA. (1977). Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochem. SystEcol.***5**, 249-260.
- Loucif K. (2011). Recherche de substances antibactérienne à partir d'une collection de souches d'actinomycètes caractérisation préliminaire de molécules bioactives. Thèse de Magistère en microbiologie appliquée et biotechnologie microbienne. Université de Mentouri, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Constantine, 21p.
- Lounès A, Lebrihi A, Benslimane C, Lefebvre G et Germain P. (1995). Glyceroleffect on spiramycin production and valine catabolism in *Streptomycesambofaciens*. *Current Microbiology.***31**, 304-311.

M

- Mahyudin NA. (2008). Actinomycetes and fungi associated with marine invertebrates: a potential source of bioactive compounds. Thèse de Doctorat, University of Canterbury. Nouvelle Zélande. 201p.
- Mariat F et Sebald M. (1990). Actinomycètes *In: Bactériologie Médicale*. Le Minor L. et Véron M. (Eds.), 2ème édition, Flammarion. Paris. 935-949.
- Misato T. (1982). Present status and future prospect of agricultural antibiotics. *J Pest. Sci.* **7**,301-30.
- Mason MG, Ishizawa K, Silkstone G, Nicholls P et Wilson MT. (2001). Extracellular heme peroxidases in Actinomycetes : A case of Mistaken identity. *ApplEnvironMicrobiol.***67(10)**, 4512-4519.
- Mc Manus PS, Stockwell VO, Sundin GW et Jones AL. (2002). Antibiotic use in plant agriculture. *Ann Rev Phytopathol.* **40**, 443-465.
- Min T, Kim-Chi H; Mei-Kwei Y; Shu-Feng Y; Wen Shen C. (2007). Polyester-degrading thermophilic actinomycetes isolated from different environment in Taiwan. *Biodegradation.* **18**, 579–583.
- Untrau S, Lebrihi A, Lefebvre G et Germain P. (1994). Nitrogen catabolite regulation of spiramycin production in *Streptomyces ambofaciens*. *CurrMicrobiol.* **28**, 111- 118.

N

- Narayana KJP, Prabhakar P, Vijayalakshmi M, Venkateswarlu Y et Krishna PSJ. (2008). Study on bioactive compounds from *Streptomyces* sp. ANU 6277 PolJ Microbiol. **57(1)**,35 – 39.
- Newman DJ, Cragg GM et Snader KM. (2003). Natural product as sources of new drugs over the period 1981-2002. J. Nat. Prod. **66 (7)**, 1022- 1037.

O

- Omura S. (1992). The search for bioactive compounds from microorganisms. Springer Verlag, New York. Inc.281–303.
- Ouhdouch Y. (2003). Actinomycetes. Laboratoire de microbiologie, Faculté des Sciences Semlalia. Marrakech. Premier atelier national du réseau Nafrinet. Maroc. Institut Scientifique, Maroc, 33-41.
- Ozil P. (1997). Plans d'expériences : Méthode de TAGUCHI. E.N.S d'électrochimie et d'Electrometallurgie INPG.

P

- Phoebe CH, Combie J, Albert FG, Van Tran K, Cabrera J, Correira HJ, Guo Y, Lindermuth J, Rauert N, Galbraith W et Selitrennikoff CP. (2001). Extremophilic organisms as an unexplored source of antifungal compounds. J Antibiot.**54**, 56-65.
- Praveen V, Tripathi D, Tripathi CKM et Bihari V. (2008). Nutritional regulation of actinomycin-D production by a new isolate of *Streptomyces sindenensis* using statistical methods. Indian Journal of Experimental Biology. **46**, 138-144.

Q

- Queiroz Sousa MFV, Lopes CE et Pereira Júnior N. (2001). A Chemically Defined Medium for Production of Actinomycin D by *Streptomyces parvulus*. Brazilian Archives of Biology and Technology. **44(3)**, 227-231.

S

- Saci A. (2011). Production d'alpha-amylase par *Streptomyces* sp. Optimisation d'un milieu de production à base de déchets d'orange. Magister de l'Université Mentouri. Constantine. p 9.
- SADO G, SADOU MC. (1991). Les plans d'expériences et l'expérimentation à l'assurance qualité. Edition : AFNOR Technique.

- 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, Haag TA, Huck TA et Fehr T. (1993). Review of actinomycetes compounds 1990-1995. *Exp. Opin. Invest. Drugs.***5**, 207-223.
- Sanglier JJ et Trujillo M (1997). Substances bioactives produites par les actinomycetes et stratégie de sélection de souches. *Bull Soc Fr Microbiol.* 12-13.
- Seong CN, Choi JH, et Baik KS. (2001). An Improved Selective Isolation of Rare Actinomycetes from Forest Soil. *J Microbiol.***39 (1)**, 17-23.
- Sharon FBS, Daniel RR et Shenbagarathai R. (2014). Optimization of antibiotic production by marine actinomycetes streptomyces Sp. Kod10. *Int J Pharm Pharm Sci.* Vol **6** Suppl 2, 506-510.
- Smaoui S. (2010). Purification et caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse doctorat de l'université de Toulouse. France. 125p.
- Spizek J et Tichy P. (1995). Some aspects of overproduction of secondary metabolites. *Folia Microbiol.***40**, 43-50.
- Strub C. (2008). Modélisation et Optimisation de la production de thiolutine chez *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de doctorat. Université Toulouse. France, p 52.
- Suzuki K, Nagai K, Shimizu Y et Suzuki Y. (1994). A screening system for antiviral compounds against Herpes simplex virus type 1 using the MTT method with L929 cells. *Tohoku J Exp Med.***176**, 163-171.

T

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

W

- 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.

Annexes

AnnexeI

Matériel utilisé

- ✓ Balance analytique (RADWAG référence : PS210/C/2)
- ✓ Ecouillons
- ✓ Etuve à 28 °C et à 37°C (memmert)
- ✓ Loupe binoculaire
- ✓ Micropipette de 10-100µL(Accumax)
- ✓ Microscope optique (WILL wetzlar)
- ✓ Pied à coulisse (STINLESS HARDEND)
- ✓ Pipettes Pasteur
- ✓ Vortex (VELP scientifica référence : ZX³)

AnnexeII

Composition des milieux de culture

Milieu Czapeck

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

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

Amidon.....	10g
Caseine.....	0.3g
KNO ₃	2g
K ₂ HPO ₄	2g
NaCl.....	2g
MgSO ₄ 7H ₂ O.....	0.05g
CaCO ₃	0.02g
FeSO ₄ 7H ₂ O.....	0.01g
Agar.....	18g
H ₂ O.....	1000mL
pH.....	7.2±0.2

Milieu Gause (Ivantiskaya et al. 1978)

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

Annexe

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

AnnexeIV

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

AnnexeV

Tableau X: Valeurs moyennes du diamètre de la zone d'inhibition du couple 1-2[Amidon]-[NaNO₃]

X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	y _i	y
-1	-1	-1	-1	9,88	9,6625
-1	-1	+1	-1	10,98	
-1	-1	-1	+1	9,11	
-1	-1	+1	+1	8,68	
+1	+1	-1	-1	11,88	10,41
+1	+1	+1	-1	10,88	
+1	+1	-1	+1	10,60	
+1	+1	+1	+1	8,28	
-1	+1	-1	-1	17,06	12,6575
-1	+1	+1	-1	10,56	
-1	+1	-1	+1	10,79	
-1	+1	+1	+1	12,22	
+1	-1	-1	-1	13,27	12,51
+1	-1	+1	-1	13,13	
+1	-1	-1	+1	12,37	
+1	-1	+1	+1	11,27	

Résumé

L'objectif à travers cette étude est l'optimisation de la production de l'actinomycine D par une souche d'actinomycète isolée du Sud Algérien. L'étude morphologique de l'isolat a permis son rattachement au genre *Streptomyces* où le nom *Streptomyces* sp. GSBNT10 lui a été attribué. La mise en évidence de son activité antibactérienne sur trois milieux de culture, effectuée par la méthode des cylindres d'agar, a permis la sélection du milieu Czapeck comme le meilleur milieu de production.

La modélisation de la production de l'actinomycine D par le biais du plan factoriel complet a été réalisée en sélectionnant quatre facteurs comme variables : l'amidon le NaNO_3 le K_2HPO_4 et le pH. La modélisation statistique et mathématique entreprise dans le but de sélectionner les paramètres influençant cette production, ainsi que leurs interactions et leur optimisation pour une production maximale de l'actinomycine D a été réalisée, et les résultats obtenus ont montré que le facteur influençant le plus l'activité antibactérienne de la souche étudiée est le NaNO_3 , suivi de l'amidon, du K_2HPO_4 et enfin le pH. Toutefois, l'interaction la plus importante a été marquée par le couple concentration en (amidon- NaNO_3).

Les concentrations optimales de ces dernières ont pu être délimitées par le tracé des courbes isoréponse et leurs valeurs sont les suivantes ; amidon (5 g/l au lieu de 10 g/l), NaNO_3 (4 g/l au lieu de 2 g/l), K_2HPO_4 (0,5 g/l au lieu de 1,5 g/l) et enfin pH (5 au lieu de 9).

Mots-clés : Actinomycine D, *Streptomyces*, Plan d'expérience, Optimisation, Activité antibactérienne, Antibiotiques.

Abstract

The objective of this study is the optimization of actinomycin D production by an actinomycete strain isolated from south Algeria. The morphological study of the alhaved isolate it attached to the *Streptomyces* genus the name *Streptomyces* sp GSBNT10 was assigned. Highlighting its antibacterial activity on three culture media by the agar cylinders method, allowed the selection of Czapeck medium as the best production medium

Modeling the actinomycin D production through full factorial design was performed by selecting for factors as variables: starch, NaNO_3 , K_2HPO_4 and pH. The statistical and mathematical modeling undertaken to select parameters affecting the production and the interactions as well as the optimization for maximum production of actinomycin D was studied and the obtained results was showed that the main factor influencing the antibacterial activity of the studied strain was NaNO_3 followed by starch, and finally the pH and K_2HPO_4 . However, the most important interactions was marked by pair concentration (starch- NaNO_3).

Optimal concentrations of these parameters have been defined by the layout of isoréponse curves and their values are the following ; starch (5 g / l instead of 10 g / l) , NaNO_3 (4 g / l instead of 2 g / l) , K_2HPO_4 (0.5 g / l instead of 1.5 g / l) and finally pH (5 instead of 9) .

Keywords: Actinomycin D, *Streptomyces* , design of experiment , Optimization, antibacterial activity , Antibiotics.

