

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE BLIDA -1-



FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

En : **Biologie**

Option : **Microbiologie / Bactériologie**

Présenté par

Fatma Zohra OUALI & Hibatallah BEZARI

**Mise en évidence et amélioration de la production de
molécules bioactives d'une souche d'actinobactérie
Saccharotrix tamanrassentensis SA 198 isolée d'un sol saharien.**

Soutenu le : **juin 2016** devant le jury :

M. BENYAHIA N.	Maitre assistant à U.S.D Blida	Président
Mme. BAKOUR. KERAMANE L.	Maître assistante à E.N.S.V Alger	Promotrice
Mme. MEKLAT A.	Maître de Conférences à U.S.D Blida	Co-promotrice
Mme. BOUKRITA S.	Maitre assistant à U.S.D Blida	Examinatrice

Promotion: 2015-2016

L'incidence élevée des infections microbiennes, et l'augmentation inquiétante du nombre de bactéries pathogènes multirésistantes aux antibiotiques pose un véritable problème thérapeutique. Plusieurs de ces antibiotiques sont devenus peu ou non efficaces. De ce fait, diverses stratégies de recherche ont été mises en œuvre afin de garantir dans le futur la disponibilité d'antibiotiques efficaces (Meyer *et al.*, 2004; Islam *et al.*, 2008).

La source la plus utilisée pour la recherche de nouvelles molécules bioactives est le milieu naturel, notamment à partir des microorganismes (Daniel, 2004; Demain, 2009; Genilloud *et al.*, 2011; Solecka *et al.*, 2012). Les actinobactéries continuent d'être le groupe le plus exploité dans ce sens, en particulier, pour ces dernières années, les souches appartenant à des genres rares ou pas très fréquents (autres que le genre *Streptomyces*) et provenant d'écosystèmes extrêmes et particuliers (Donadio *et al.*, 2002; Gupte *et al.*, 2002). Pour s'adapter à ces environnements extrêmes (de température, de salinité, de pH, etc.), ces actinobactéries rares disposent d'un système enzymatique et d'un métabolisme particuliers leur permettant de produire des métabolites secondaires originaux dont les antibiotiques antibactériens et antifongiques, avec près de deux tiers des molécules actives commercialisées à leur actif (Solanki *et al.*, 2008; Genilloud *et al.*, 2011).

Plusieurs travaux (Hacène *et al.*, 1994; Sabaou *et al.*, 1998; Zitouni, 2005; Meklat, 2012) ont montré la richesse des sols sahariens algériens en actinobactéries, ces sols sont plus diversifiés en genres et en espèces des plus fréquents comme *Streptomyces*, aux plus rares tels que *Actinomadura*, *Nocardiopsis*, *Nonomuraea*, *Planobispora*, *Planomonospora*, *Saccharothrix*, *Spirillospora*, *Streptosporangium*, etc... (Boudjella, 1994; Sabaou *et al.*, 1998; Lazzarini *et al.*, 2000; Naidenova et Vladimirova, 2002; Barakate *et al.*, 2002; Donadio *et al.*, 2002; Moncheva *et al.*, 2002).

Les chercheurs du Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM), ont isolé à partir des sols sahariens plusieurs souches d'actinobactéries et beaucoup d'entre-elles se sont révélées comme étant de nouvelles espèces capables de produire un bon nombre de molécules bioactives (Lamari *et al.*, 2002a,b; Zitouni *et al.*, 2004a,b et 2005; Badji *et al.*, 2005; 2006 et 2007; Boudjella *et al.*, 2010; Bouras *et al.*, 2008; Merrouche *et al.*, 2010; 2011; Meklat *et al.*, 2012; Boubetra *et al.*, 2013).

Une fois la souche productrice sélectionnée, des approches d'optimisation doivent être réalisées afin d'améliorer cette production et cela en déterminant les conditions physiologiques et nutritionnelles amenant à une production maximale des molécules d'intérêt

(Singh *et al.*, 2009; Vijayakumar *et al.*, 2010). Ainsi, l'utilisation d'une source nutritionnelle donnée permet de diriger la production vers de nouvelles molécules. Dans ce travail, ces approches ont été abordées et font suite aux travaux menés par Boubetra (2013) et Laassami (2015) au Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'étude d'une souche d'actinobactérie (SA 198), isolée par Zitouni (1995) à partir d'un échantillon de sol du Hoggar, et identifiée dans un travail récent, comme une nouvelle espèce de *Saccharothrix* nommée *Saccharothrix tamanrassetensis* (Boubetra *et al.*, 2014). La souche SA 198 produit sept antibiotiques en milieu complexe ISP2. Ces antibiotiques sont à activités antifongique et/ou antibactérienne (Boubetra, 2013 et Boubetra *et al.*, 2013). Ces mêmes travaux ont permis aussi de déterminer la structure de trois des antibiotiques produits, les quels se sont avérés originaux.

Dans ce travail nous proposons de sélectionner un milieu de base permettant d'obtenir les meilleures activités antagonistes dirigées contre deux bactéries et un champignon, de détecter les paramètres influençant la production, et enfin d'optimiser ces paramètres pour un meilleur rendement en activité antibiotique.

Ce manuscrit compte trois chapitres. Le premier consiste en une synthèse bibliographique sur les actinobactéries, leur importance et leur écologie, nous consacrons aussi un volet sur les antibiotiques en général et les facteurs de culture pouvant influencer la production de biomolécules. Le genre *Saccharothrix* et ses antibiotiques sont présentés, ainsi que des notions fondamentales relatives aux plans d'expériences.

La partie « matériel et méthodes » décrite dans le chapitre II, regroupe l'ensemble des techniques et méthodologies utilisées pour la réalisation de ce travail.

Les résultats obtenus sont présentés et interprétés dans le troisième chapitre.

La conclusion du travail réalisé ainsi que les perspectives qui en découlent clôturent ce manuscrit.

I. MICROORGANISMES

1. Souche d'actinobactérie

La souche SA 198 de *Saccharothrix tamanrassetensis* provient du Laboratoire de Microbiologie de l'École Normale Supérieure de Kouba (Alger). Elle a été isolée en 1995 par Zitouni lors d'un criblage de souches d'actinobactéries productrices d'activités antimicrobiennes provenant des sols du Hoggar, dans la région de Tamanrasset (Algérie), en utilisant le milieu «chitine-vitamines B-agar» (Hayakawa et Nonomura, 1987) additionné d'actidione (50 µg/mL). La souche SA 198 est conservée à 4°C, sur milieu ISP2 (International *Streptomyces* Project 2) incliné ou liquide (en tubes à vis), dont la composition est la suivante: Glucose, 4 g; extrait de malt, 10 g; extrait de levure, 4 g; agar, 15 g; eau distillée q.s.p., 1000 ml; pH 7,2 ≈ 7,4.

2. Souche de microorganismes-cibles

Les microorganismes cibles utilisés proviennent de la collection du LBSM et sont des bactéries (Gram + et Gram -), des levures et des champignons. Ils sont conservés à 4°C par repiquages sur milieu ISP2. Le **tableau 4** regroupe l'ensemble des germes testés lors de notre travail.

Tableau 4. Liste des microorganismes cibles testés.

	Microorganismes-cibles
Bactéries à Gram +	SARM ATCC 25923, SARM 639C, SARM ATCC 43300, SARM ATCC 25922, <i>Clostridium beijerinckii</i> ATCC 6014, <i>Ureaplasma parvum</i> ATCC 27813, <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 30300, <i>Enterococcus sp</i> , <i>Streptococcus hemophilus</i> , <i>Listeria innocua</i> CLIP 74915.
Bactéries à Gram -	E.52 <i>Escherichia coli</i> multirésistante aux antibiotiques, <i>Escherichia coli</i> multirésistante aux antibiotiques ATCC 8739, <i>Klebsiella pneumoniae</i> , E.40 <i>Klebsiella pneumoniae</i> multirésistante aux antibiotiques, <i>Agrobacterium sp</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27856.
Levures	<i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida guilliermondii</i> , <i>Candida albicans</i> M3, <i>Candida albicans</i> IPA200, <i>Candida albicans</i> IPA988, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .
Champignons	<i>Fusarium solani</i> , <i>Fusarium sporotrichoides</i> , <i>Fusarium oxysporumf sp albedinis</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Fusarium proliferatum</i> , <i>Fusarium oxysporumf.sp.lini</i> , <i>Fusarium oxysporumf.sp.radicalislycopersici</i> , <i>Fusarium moniliforme</i> , <i>Umbelopsis ramanniana</i> NRRL 1829, <i>Fusarium equiseti</i> , <i>Penicillium glabrum</i> , <i>Penicillium expansum</i> , <i>Aspergillus carbonarius</i> , <i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Trichoderma.sp</i> , <i>Alternaria Sp</i> .

II. CRIBLAGE DE L'ACTIVITE ANTIBIOTIQUE DE LA SOUCHE SA 198

1. Mise en évidence sur milieu solide par la méthode des stries croisées

L'activité antimicrobienne de la souche SA 198 a été évaluée par la technique des stries croisées sur le milieu ISP2 solide (Waksman, 1945; Williston *et al.*, 1947). La souche est ensemencée en un seul trait à la surface du milieu et en bordure de la boîte de Pétri (D=9mm) (**Figure 3**). Après incubation de 8 à 10 jours à 30°C, les microorganismes cibles sont inoculés par stries perpendiculaires à l'actinobactérie. La lecture des résultats est effectuée après 24 à 48 h d'incubation et consiste en la mesure de la zone d'inhibition entre le bord de l'actinobactérie et le germe cible, comme cela est illustré sur la **figure 3**.

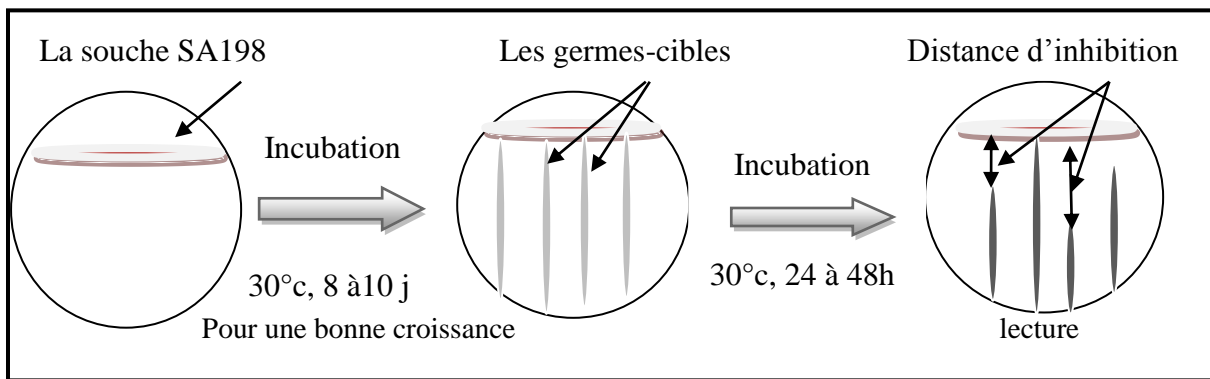


Figure 3. Schéma représentatif de la méthode des stries croisées.

2. Mise en évidence sur milieu solide par la méthode des cylindres d'agar

La technique des cylindres d'agar recommandé par Bastide *et al.* (1986), est une autre méthode d'évaluation du pouvoir antagoniste sur milieu solide. Dans notre cas nous l'avons testé uniquement contre les trois germes les plus sensibles révélés lors de test des stries croisées. L'inoculum des germes cibles est standardisé en utilisant la méthode des suspensions dilutions qui consiste en la mesure de la densité optique à différentes longueurs d'onde. Après un balayage au spectrophotomètre des longueurs d'ondes ont été fixées. Pour les suspensions bactériennes (SARM ATCC 43300, *Bacillus subtilis* ATCC 30300), l'absorbance est lue à la longueur d'onde de 625 nm, et doit être comprise entre 0,08 et 0,13; ce qui correspond à l'étalon 0,5 de la gamme de Mc Farland, soit approximativement $1-2 \times 10^8$ CFU/mL. La suspension fongique (*Umbelopsis ramanniana* NRRL 1829) est également ajustée à 0,5 de Mc Farland, en amenant l'absorbance à une valeur comprise entre 0,15 et 0,17 à la longueur d'onde de 530 nm et qui correspond à $0,4-5 \times 10^6$ CFU/mL (EUCAST, 2013).

La souche SA 198 a été ensemencée sur milieu ISP2 et incubée pendant 7 à 10 jours à 30°C. Après incubation, des cylindres d'agar de 6 mm de diamètre ont été découpés avec un emporte-pièce stérile puis appliqués à la surface des boîtes de Pétri contenant le milieu Mueller Hinton (MH) préalablement ensemencé par les suspensions bactériennes, et le milieu Sabouraud (SBR) pour la suspension fongique. Les boîtes ensemencées sont ensuite maintenues à 4°C pendant 2 heures pour permettre une bonne diffusion des composés bioactifs. Les zones d'inhibition ont été mesurées après 24 heures d'incubation pour les bactéries et 48h pour le champignon à 30°C (**Figure 4**).

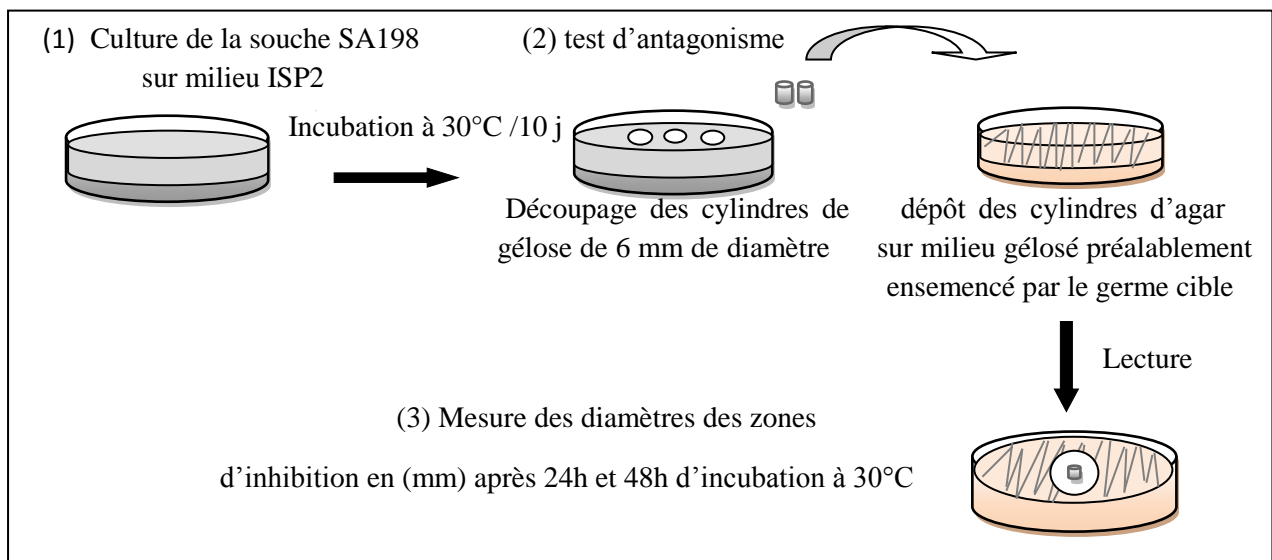


Figure 4. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne de la souche SA198 sur milieu gélosé par la méthode des cylindres d'agar.

III. ÉTUDE DE LA PRODUCTION DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE EN MILIEU LIQUIDE

1. Cinétique de production de l'activité antimicrobienne

Les cinétiques de production des antibiotiques ont été réalisées sur le milieu de culture synthétique de base (MS) (Strub, 2008 modifié), en vue de déterminer les meilleures sources d'azote et de carbone pour la production d'antibiotique. Le milieu MS est composé comme suit: MgSO₄ (7 H₂O) 0,2 g; KH₂PO₄ 0,5 g; K₂HPO₄ 1 g; NaCl 2 g; CaCl₂ 1 g; FeSO₄ (7H₂O) 0,01 g; eau distillée q.s.p. 1000 ml, pH ≈7,2.

Le choix des sources d'azote et de carbone est basé sur les résultats réalisés par Boubetra (2013) et Laassami (2015). Un protocole commun pour les cinétiques est schématisé dans la **figure 5**.

A partir d'un inoculum de la souche, des pré-cultures sont ensemencées, et servent à inoculer les milieux de production. Les cinétiques sont suivies pendant dix jours, et des prélèvements sont effectués toutes les 24 heures pour suivre l'évolution de la production de l'activité antimicrobienne, la croissance et le pH. Les différentes cinétiques sont conduites dans les mêmes conditions à savoir, la taille de l'inoculum, les volumes de pré-cultures et de cultures, les conditions de prélèvements et de mesures.

1.1. Pré-cultures

A partir des tubes inclinés d'ISP2 contenant la souche SA 198, les spores et les fragments mycéliens sont raclés aseptiquement à l'aide d'une anse à ensemencer et inoculés dans des tubes à essais qui contiennent 5 mL d'ISP2 liquide. Les tubes ensemencés sont ensuite incubés en agitation rotative (250 rpm) pendant 3 jours à 30°C. Des boîtes de Pétri contenant le milieu ISP2, sont ensemencées avec 100 µL de la suspension par la méthode d'inondation. Après étalement de l'inoculum au râteau, les boîtes sont incubées 10 jours à 30 °C, et constituent l'inoculum qui sera utilisé pour ensemencer les pré-cultures du milieu MS.

Les pré-cultures sont préparées dans des fioles d'Erlenmeyer de 250 mL contenant 50 mL de milieu de culture. Chaque source d'azote ou de carbone est représentée par 2 Erlenmeyer de 250 mL (50 mL de milieu MS), chaque fiole reçoit un inoculum de 2 carottes de 4 mm de diamètre correspondant à $10^5 \cdot 10^6$ spore par mL (Wang *et al.*, 2010), découpées à partir du milieu solide ISP2 à l'aide d'un emporte-pièce stérile. Après 3 jours d'incubation à 30°C sur un agitateur rotatif (250 rpm), les pré-cultures sont utilisées chacune pour ensemencer le même milieu de culture destiné pour la cinétique de production en fioles d'Erlenmeyer. Ce protocole est repris dans la **figure 5**.

1.2. Mise en culture

Les pré-cultures obtenues vont servir à ensemencer 100 mL du même milieu liquide dans des erlenmeyers de 500 mL en prélevant 5 mL de pré-culture (5 mL de pré-culture soit 5 % du volume utile). Les cultures sont incubées à 30°C sous agitation à 250 rpm. La durée d'incubation est de 10 jours; cette durée correspond à la production maximale des substances actives. Chaque expérience est réalisée en triple comme le montre la **figure 5**. L'évolution de l'activité antibiotique, du pH et du poids sec du mycélium est suivie quotidiennement.

1.2.1. Les sources d'azote

Quatre composés sont testés comme sources d'azote: Le corn steep liquor (30 g/L), l'extrait de levure, l'extrait de malt, et la peptone à raison de 0,25 % (poids/volume). Lors de cette cinétique, le milieu MS est additionné de glucose comme source de carbone à (10 g/L). La source

d'azote permettant une production optimale sera ajoutée à la fin de cette cinétique au même milieu de culture pour étudier l'influence de quatre sources de carbone sur la production d'antibiotiques.

1.2.2. Les sources de carbone

Dans le but de rechercher une source de carbone permettant une production optimale des antibiotiques, quatre sources de carbone sont testées: le glucose, les dextrines, le fructose et le saccharose, ajoutées chacune à raison de 1% (10 g/L). Dans ce cas, l'extrait de levure a été ajouté comme source d'azote à raison de 0,25% (poids/volume).

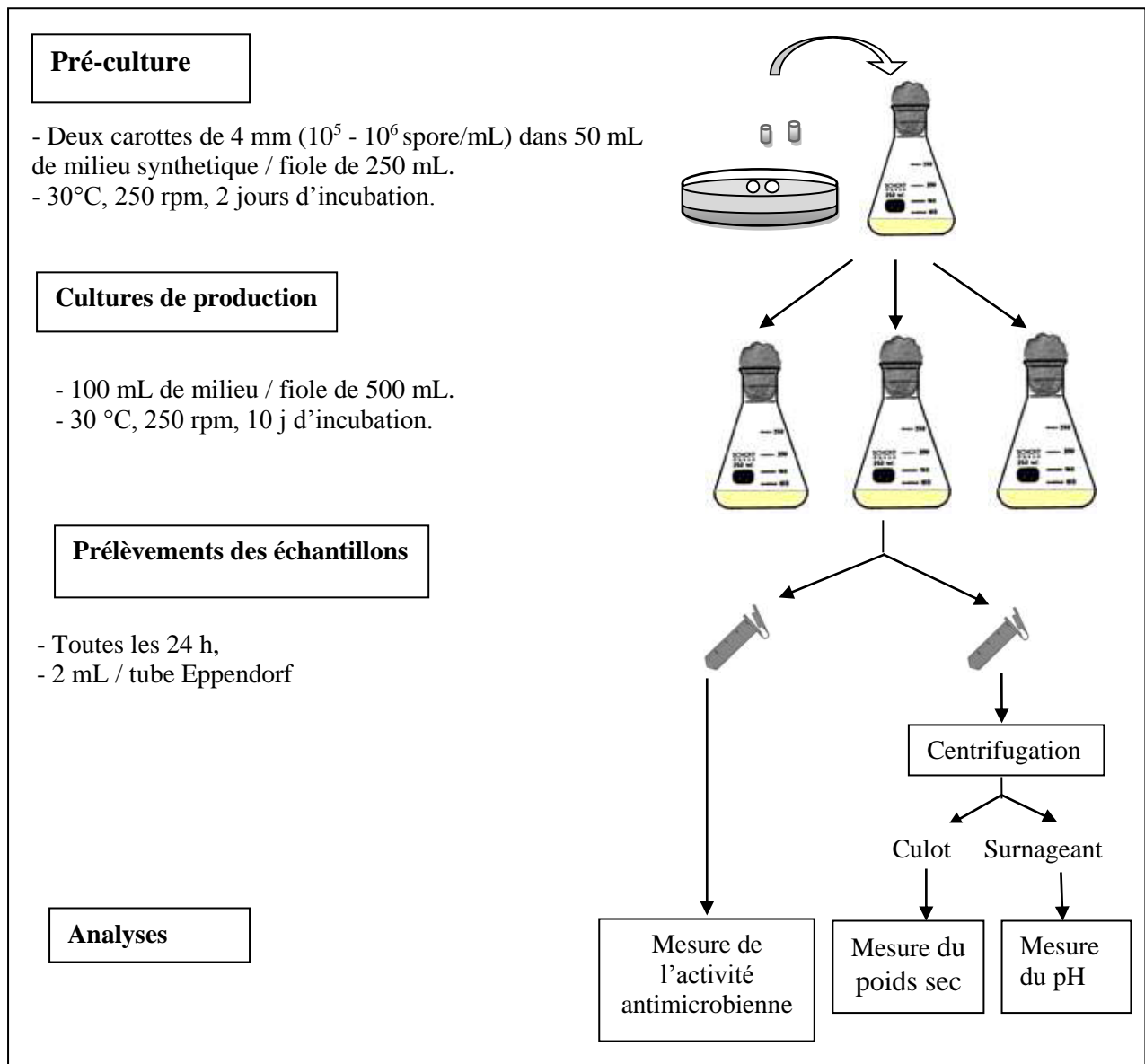


Figure 5. Schéma du protocole des cinétiques de production.

1.3. Mesure de la croissance et du pH

La croissance et le pH sont mesurés quotidiennement durant toute la période de culture. Chaque 24 h deux millilitres de culture sont prélevés aseptiquement dans des tubes Eppendorf préalablement tarés, puis centrifugés à 12000 rpm pendant 10 mn. Le surnageant est récupéré et va servir pour suivre l'évolution du pH du milieu grâce à un pH mètre de marque Hanna instruments. Le culot servira pour la mesure de la croissance (la croissance cellulaire est déterminée par la mesure du poids sec de la biomasse) (Pfefferle *et al.*, 2000). Les tubes renfermant les culots sont déposés dans un four à 105°C pendant 24 h. Le poids sec obtenu est rapporté en gramme de matière sèche par litre de milieu de culture. Les pesées sont effectuées sur une balance analytique (KERN).

1.4. Suivi de l'activité antimicrobienne

1.4.1. Mesures de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion des puits

L'activité antimicrobienne est mesurée par la méthode de diffusion des puits (Ericsson et Sherris, 1971; Parente *et al.*, 1995). Dans cette méthode, le milieu ISP2 semi-solide (12g/L d'agar) en surfusion est pré-ensemencé avec les germes cibles (100 µL de la suspension pour 100 mL de milieu ISP2) puis coulé en boîtes de Pétri de manière à obtenir 4 mm d'épaisseur de milieu par boîte (soit 20 mL/boîte de 90 mm de diamètre).

Trois souches de germes-cibles sont utilisées: SARM ATCC 43300, *Bacillus subtilis* ATCC 30300, et *Umbelopsis ramanniana* NRRL 1829 et sont en suspension calibrées par la méthode photométrique expliquée auparavant (II.3).

Après solidification du milieu à température ambiante, des puits sont confectionnés à l'aide d'un emporte-pièce de 10 mm de diamètre. Une aliquote de 100 µL de surnageant de culture prélevé aseptiquement est introduite dans chaque puits. Les boîtes sont mises 2 h à 4°C pour permettre la diffusion des substances actives tout en arrêtant momentanément la croissance des germes, puis incubées pendant 24 h (pour les bactéries) et 48 h (pour le champignon) à 30°C. Le diamètre des zones d'inhibition des germes est ensuite mesuré autour du puits (le diamètre de 10 mm du puits étant compris). Comme cela est illustré dans la **figure 6**.

1.4.2. Mesures de l'activité antimicrobienne par la méthode des disques de papier

Au bout de 10 jours de cinétique, les cultures de la souche SA 198 conduits par les différents milieux, sont centrifugées (12 000 rpm pendant 15 minute) afin d'éliminer la masse mycélienne. Le surnageant obtenu est extrait avec du dichlorométhane (solvant non miscible avec l'eau) dans une ampoule à décanter, à raison d'un volume de filtrat pour un volume de solvant organique. A propos du choix du dichlorométhane être solvant d'extraction, plusieurs travaux rapportent l'efficacité de ce dernier pour l'extraction des substances actives, et de fait avec des taux assez

importants notamment pour le genre *Saccharothrix* (Zitouni *et al.*, 2005). Ainsi, Boubetra (2013) a prouvé que le dichlorométhane est meilleur solvant d'extraction pour la souche SA 198.

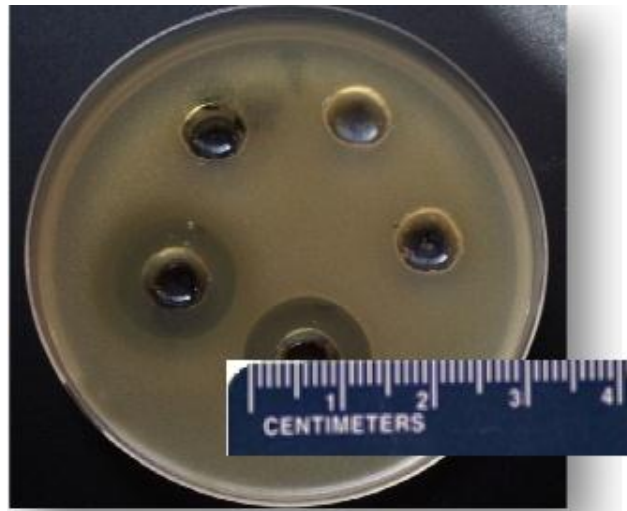


Figure 6. Photographie d'une boîte de Pétri avec des puits confectionnés dans la gélose et montrant la mesure de la zone d'inhibition.

Les phases organiques sont séparées des phases aqueuses, puis déshydratées par passage à travers un papier filtre (Whatman n° 1) contenant du sulfate de sodium anhydre (entonnoir + papier filtre+ 2 g de sulfate de sodium) afin d'éliminer les traces d'eau résiduelles et les contaminants hydrophiles. Les extraits au dichlorométhane sont ensuite concentrés et évaporés sous vide à 30°C à l'aide d'un rotavapeur rotatif. Le résidu obtenu est récupéré dans un minimum de méthanol.

Les extraits obtenus à partir des filtrats de culture sont testés par la méthode des disques de papier (antibiographie) contre: *Bacillus subtilis* ATCC 30300 et *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline SARM ATCC 43300, et *Umbelopsis ramanniana* NRRL 1829. Des disques en papier de 6 mm de diamètre sont imbibés par 100 µL d'extrait organique, puis séchés totalement à froid à l'aide d'un séchoir. Les disques sont ensuite stérilisés sous UV (254 nm) durant 45 min sous hotte axénique avant d'être déposés stérilement à la surface du milieu ISP2 (12g/L d'agar), préalablementensemencé par le germe-cible. Les boîtes sont ensuite mises 2 h à 4°C pour permettre une bonne diffusion des produits actifs, puis incubées à 30°C. La lecture des résultats est effectuée après 24 à 48 h et consiste à déterminer le diamètre de l'auréole d'inhibition autour du disque (diamètre du disque compris), comme le montre la **figure 7**.



Figure 7 : Antibiographie sur disques de papier.

IV. METHODE D'OPTIMISATION DE L'ACTIVITE ANTIMIROBIENNE DE LA SOUCHE SA 198

Après sélection du meilleur milieu de production des antibiotiques pour la souche SA 198, des essais d'optimisation ont été réalisés dans le but d'améliorer la production de ces molécules. L'optimisation d'un milieu de culture est réalisée en deux étapes; la première étape a pour but de sélectionner les paramètres (variables) ayant un effet positif sur la production des biomolécules en utilisant le plan de Plackett et Burman (1946), la deuxième étape permet de déterminer les optima des paramètres sélectionnés par le plan de **Box et Behnken** (1960). Le milieu de production de base sur lequel se portera l'optimisation a pour composition les constituants suivants:

Saccharose 10 g; Extrait de levure 2,5 g; $MgSO_4 (7 H_2O)$ 0,2 g ; KH_2PO_4 0,5 g ; K_2HPO_4 1 g ; NaCl 2 g ; Ca Cl₂ 1 g ; $FeSO_4 (7H_2O)$ 0,01 g ; eau distillée q.s.p. 1000 ml ; pH \approx 7,2.

1. Sélection des variables significatives par le plan d'expériences plan de Plackett-Burman (PB)

Après sélection du meilleur milieu de production, un plan d'optimisation séquentiel est appliqué afin d'améliorer la production des molécules bioactives. Le plan Plackett-Burman est employé en premier lieu afin de déterminer les composants du milieu influençant la production d'antibiotiques; aussi cette expérimentation a pour finalité de fixer les paramètres significatifs régissant cette synthèse. Pour ce faire, six composants du milieu ont été testés à savoir: Extrait de Levure; Saccharose; KH_2PO_4 ; K_2HPO_4 ; CaCl₂ et NaCl. Le **tableau 5**, reprend les valeurs choisies des différents facteurs opératoires étudiés à différents niveaux (concentrations).

Tableau 5. Valeurs extrêmes des paramètres opératoires étudiés.

Variables	Composant du milieu	Niveau bas (-1) (g/L)	Centre (0) (g/L)	Niveau haut (+1) (g/L)
X1	Extrait de levure	1	2,5	4
X2	Saccharose	5	10	15
X3	KH ₂ PO ₄	0,3	0,5	0,7
X4	K ₂ HPO ₄	0,5	1	1,5
X5	CaCl ₂	0,5	1	1,5
X6	NaCl	1	2	3

Treize milieux de culture semi synthétique (MSS) à des concentrations variables ont été préparés selon la matrice des expériences donnée par le logiciel "Minitab 16.0" et représentée dans le **tableau 6**. La souche SA 198 estensemencée sur chaque milieu et incubée à 30°C pendant 10 jours. Chaque milieu est répété deux fois, et 26 expériences ont ainsi été conduites et testées. Au bout de 10 jours chaque erlen (expérience) est extrait au dichlorométhane, séché au rotavapeur, et testé par la méthode des disques d'antibiogramme contre les trois germes tests retenus.

Tableau 6. Matrice d'expériences de "**Plackett et Burman**" pour l'étude de 6 variables avec 26 expériences.

Milieux de culture	C1 (g/L)	C2 (g/L)	C3 (g/L)	C4 (g/L)	C5 (g/L)	C6 (g/L)	X1	X2	X3	X4	X5	X6
MSS 01	4	15	0,7	0,5	1,5	3	+	+	+	-	+	+
MSS 02	2,5	10	0,5	1	1	2	0	0	0	0	0	0
MSS 03	1	15	0,7	0,5	1,5	1	-	+	+	-	+	-
MSS 04	4	5	0,3	0,5	1,5	3	+	-	-	-	+	+
MSS 05	1	15	0,7	1,5	0,5	3	-	+	+	+	-	+
MSS 06	1	5	0,7	1,5	1,5	1	-	-	+	+	+	-
MSS07	4	15	0,3	1,5	1,5	1	+	+	-	+	+	-
MSS 08	1	15	0,3	0,5	0,5	3	-	+	-	-	-	+
MSS 09	1	5	0,3	0,5	0,5	1	-	-	-	-	-	-
MSS 10	4	5	0,7	0,5	0,5	1	+	-	+	-	-	-
MSS 11	4	5	0,7	1,5	0,5	3	+	-	+	+	-	+
MSS 12	4	15	0,3	1,5	0,5	1	+	+	-	+	-	-
MSS 13	1	5	0,3	1,5	1,5	3	-	-	-	+	+	+

Note: C1: Extrait de levure ; C2: Saccharose ; C3: KH₂PO₄ ; C4: K₂HPO₄ ; C5: CaCl₂ ; C6: NaCl.

2. Optimisation des paramètres influençant la production d'antibiotique de la souche SA 198 par « Response Surface Methodology »

Le plan **Box-Behnken** (1960) est adopté pour déterminer les optima des variables significatives permettant la production maximale de molécules actives par la souche SA 198 dirigées contre les germes cibles SARM ATCC 43300, *Bacillus subtilis* ATCC 30300 et *Umbelopsis ramanniana* NRRL 182.

Ainsi, les variables significatives régissant la production d'antibiotiques vis-à-vis d'*U. ramanniana* NRRL 1829 concernent la concentration en **saccharose** et **CaCl₂**, alors que celle influençant l'activité antibactérienne dirigée contre *B. subtilis* ATCC 30300 et SARM ATCC 43300 est seulement liée à la concentration en **KH₂PO₄**. Le **tableau 7a**, montre les variations de concentration pour le saccharose et le CaCl₂ auxquelles nous avons ajouté celle du **temps d'incubation** pour optimiser la production de l'activité antifongique dirigée contre *U. ramanniana* NRRL 1829. Le **tableau 7b** regroupe quant à lui les différentes concentrations du seul facteur significatif influençant la production antibactérienne à savoir KH₂PO₄ et auquel nous avons ajouté l'optimisation du **pH** et du **temps d'incubation** pour l'obtention de la meilleure activité contre *B. subtilis* ATCC 30300 et SARM ATCC 43300; ces deux tableaux sus cités ont été fournis grâce au modèle d'expérimentation «Box-Behnken».

Ce plan factoriel admet que la réponse est linéaire quand un facteur passe d'un niveau minimale à un niveau maximal symbolisés par les signes (-) et (+) définissant la valeur basse et haute de chaque facteur respectivement. Ainsi les facteurs choisies ont été analysés à trois niveaux: la concentration la plus basse, la moyenne et la plus haute ce qui donne respectivement -1, 0, +1, l'unité de la source saccharose est fixée à 5 ; celle de CaCl₂ à 0,5 ; celle de KH₂PO₄ à 0,2; celle du temps d'incubation à 2 et celle du pH à 2. Un total de quinze modèles expérimentaux a été livré par ce logiciel. Les quinze expériences ont été conduites en culture agitée de la souche SA 198 (10 jours à 30°C, 250 rpm). L'extraction au dichlorométhane à partir du filtrat de culture à lieu au dixième jour après centrifugation. Les extraits obtenus sont testés par la méthode des disques de papier expliquée auparavant.

Tableau 7a. Matrice d'expériences donnée par le modèle «Box-Behnken» pour l'optimisation de la production contre *Umbelopsis ramanniana* NRRL 1829.

Expérience n°	Variables		
	Saccharose X ₁	CaCl ₂ X ₂	Temps d'incubation X ₃
01	+1	+1	0
02	0	0	0
03	0	-1	-1
04	+1	0	-1
05	+1	0	+1
06	+1	-1	0
07	0	+1	+1
08	-1	-1	0
09	0	0	0
10	-1	+1	0
11	0	+1	-1
12	-1	0	-1
13	0	0	0
14	0	-1	+1
15	-1	0	+1

(+1) : niveau supérieur du facteur (-1) : niveau inférieur du facteur (0) : niveau moyen du facteur.

Tableau 7b. Matrice d'expériences donnée par le modèle «Box-Behnken» pour l'optimisation de la production contre SARM ATCC 43300 et *Bacillus subtilis* ATCC 30300.

Expérience n°	Variables		
	KH ₂ PO ₄ X ₁	pH X ₂	Temps d'incubation X ₃
01	0	+1	-1
02	0	+1	+1
03	-1	-1	0
04	0	-1	-1
05	0	0	0
06	-1	0	+1
07	0	0	0
08	0	0	0
09	+1	0	+1
10	+1	+1	0
11	-1	0	-1
12	+1	0	-1
13	-1	+1	0
14	+1	-1	0
15	0	-1	+1

(+1) : niveau supérieur du facteur (-1) : niveau inférieur du facteur (0) : niveau moyen du facteur.

3. Confirmation du modèle

Une confirmation pratique du modèle est nécessaire après optimisation. Les concentrations optimales des facteurs étudiés ont été déduites et utilisées pour la réalisation des cultures de production suivies d'une extraction afin de réaliser une antibiographie contre les trois germes cibles. Les zones d'inhibitions obtenues ont été comparées à l'intervalle prédit par le logiciel.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS

DEDICACES

TABLE DES MATIERES

INDEX DES TABLEAUX

INDEX DES FIGURES

LISTE DES ABREVIATIONS

RESUME

ABSTRACT

ملخص

INTRODUCTION 1

CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LES ACTINOBACTERIES	3
1. Définition	3
2. Ecologie des actinobactéries.....	3
3. Intérêt des actinobactéries.....	3
3.1. Dans le domaine pharmaceutique et médical	3
3.2. Dans le domaine agronomique	4
3.3. Dans divers autres domaines.....	5
II. LES ANTIBIOTIQUES	5
1. Définition.....	5
2. Résistance aux antibiotiques.....	6
3. Recherche de nouvelles molécules antibiotiques.....	6
3.1. Actinobactéries productrices d'antibiotiques.....	6
4. Influence des conditions de culture sur la production des antibiotiques par les actinobactéries...7	
4.1. Facteurs nutritionnels.....	7
4.2. Inoculum.....	8
4.3. Les facteurs physico-chimiques.....	8
III. LE GENRE SACCHAROTHRIX	9
1. Taxonomie et caractérisation du genre <i>Saccharothrix</i>	10
2. Distribution de genre <i>Saccharothrix</i>	12
3. Métabolites secondaires sécrétés par les espèces de <i>Saccharothrix</i>	12
IV. NOUVELLE APPROCHE POUR L'OPTIMISATION DES PARAMETRES DE CULTURE PAR RESPONSE SURFACE METHODOLOGY RSM	14
1. Les plans d'expériences.....	14
1.1. Définition.....	14
1.2. Modélisation.....	14
1.3. Plans de Plackett et Burman.....	15
1.4. Optimisation de la production d'antibiotique par utilisation du modèle «Box-Behnken» .15	

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

I. MICROORGANISMES	17
1. Souche d'actinobactéries.....	17
2. Souche de microorganismes-cibles.....	17

II. CRIBLAGE DE L'ACTIVITE ANTIBIOTIQUE DE LA SOUCHE SA 198.....	18
1. Mise en évidence sur milieu solide par la méthode des stries croisées.....	18
2. Mise en évidence sur milieu solide par la méthode des cylindres d'agar.....	18
III. ÉTUDE DE LA PRODUCTION DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE EN MILIEU LIQUIDE	19
1. Cinétique de production de l'activité antimicrobienne.....	19
1.1. Pré-cultures.....	20
1.2. Mise en culture.....	20
1.2.1. Les sources d'azote.....	20
1.2.2. Les sources de carbone.....	21
1.3. Mesure de la croissance et du pH.....	22
1.4. Suivi de l'activité antimicrobienne.....	22
1.4.1. Mesure de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion des puits.....	22
1.4.2. Mesure de l'activité antimicrobienne par la méthode des disques de papier.....	22
IV. METHODE D'OPTIMISATION DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DE LA SOUCHE SA 198	24
1. Sélection des variables significatives par le plan d'expériences plan de Plackett-Burman (PB)	24
2. Optimisation des paramètres influençant la production d'antibiotiques de la souche SA 198 par « Respons Surface Methodology ».....	26
3. Confirmation du modèle.....	28

CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

I. PROPRIETES ANTAGONISTES DE LA SOUCHE SA 198 DE SACCHAROTRIX TAMANRASSETENSIS SUR MILIEU SOLIDE	29
1. Résultat.....	29
1.1. Mise en évidence par la méthode des stries croisées	29
1.2. Mise en évidence par la méthode des cylindres d'agar	30
2. Discussion.....	31
II. CINÉTIQUES DE PRODUCTION DES ANTIBIOTIQUES DE LA SOUCHE SA 198 SUR MILIEUX LIQUIDE	32
1. Cinétique de production avec différentes sources d'azote.....	32
1.1. Résultats	32
1.1.1. Milieu MS-glucose additionné de Corn steep liquor.....	34
1.1.2. Milieu MS-glucose additionné d'extrait de levure.....	34
1.1.3. Milieu MS-glucose additionné d'extrait de malt.....	34
1.1.4. Milieu MS-glucose additionné de la peptone.....	34
1.2. Discussion.....	35
2. Cinétiques de production avec différentes sources de carbone.....	37
2.1. Résultats.....	37
2.1.1. Milieu MS-EL additionné de glucose.....	37
2.1.2. Milieu MS-EL additionné de saccharose.....	39
2.1.3. Milieu MS-EL additionné de fructose.....	39
2.1.4. Milieu MS-EL additionné de dextrine.....	39
2.2. Discussion.....	40

III. MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE ANTIBIOTIQUE PAR LA METHODE DES DISQUES DE PAPIER	42
1. Résultats.....	42
1.1. Tests des disques de papier en fonction des sources d'azote	42
1.2. Tests des disques de papier en fonction des sources de carbone	42
2. Discussion.....	43
IV. MODELISATION DE L'ACTIVITE ANTIMIROBIENNE DE LA SOUCHE SA 198...44	44
1. Résultats.....	44
1.1. Plan de Plackett-Burman (PB).....	44
1.2. Optimisation de la production des molécules antifongiques contre Ur 1829 sur milieu semi synthétique MSS.....	51
1.2.1. Détermination des interactions entre les variables dans le milieu de production des molécules antifongiques dirigées contre Ur 1829.....	52
1.2.1.1. Interaction entre X1 (Saccharose) et X2 (CaCl ₂).....	52
1.2.1.2. Interaction entre X1 (Saccharose) et X3 (Temps d'incubation)	52
1.2.1.3. Interaction entre X2 (CaCl ₂) et X3 (Temps d'incubation).....	53
1.3. Optimisation de la production antibactérienne pour les germes SARM 43300 et BS 30300 sur milieu semi synthétique MSS	54
1.3.1. Détermination des interactions entre les variables dans le milieu de production des molécules antibactériennes dirigées contre Sa 43300 et Bs 30300.....	55
1.3.1.1. Interaction entre X1 (KH ₂ PO ₄) et X2 (pH)	55
1.3.1.2. Interaction entre X1 (KH ₂ PO ₄) et X3 (Temps d'incubation)	56
1.3.1.3. Interaction entre X2 (pH) et X3 (Temps d'incubation)	57
1.4. Rendement de la production	58
1.5. Confirmation du model obtenu	60
2. Discussion	62
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	63
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	65
ANNEXES	

I. PROPRIETES ANTAGONISTES DE LA SOUCHE SA 198 DE SACCHAROTRIX TAMANRASSETENSIS SUR MILIEU SOLIDE

1. Résultat

1.1. Mise en évidence par la méthode des stries croisées

Les résultats des tests d'antagonisme *in vitro* contre différents germes cibles (bactéries à Gram positif, bactéries à Gram négatif, levures et champignons) par la technique des stries croisées sur milieu ISP2 sont illustrés par les **figures 8 et 9**.

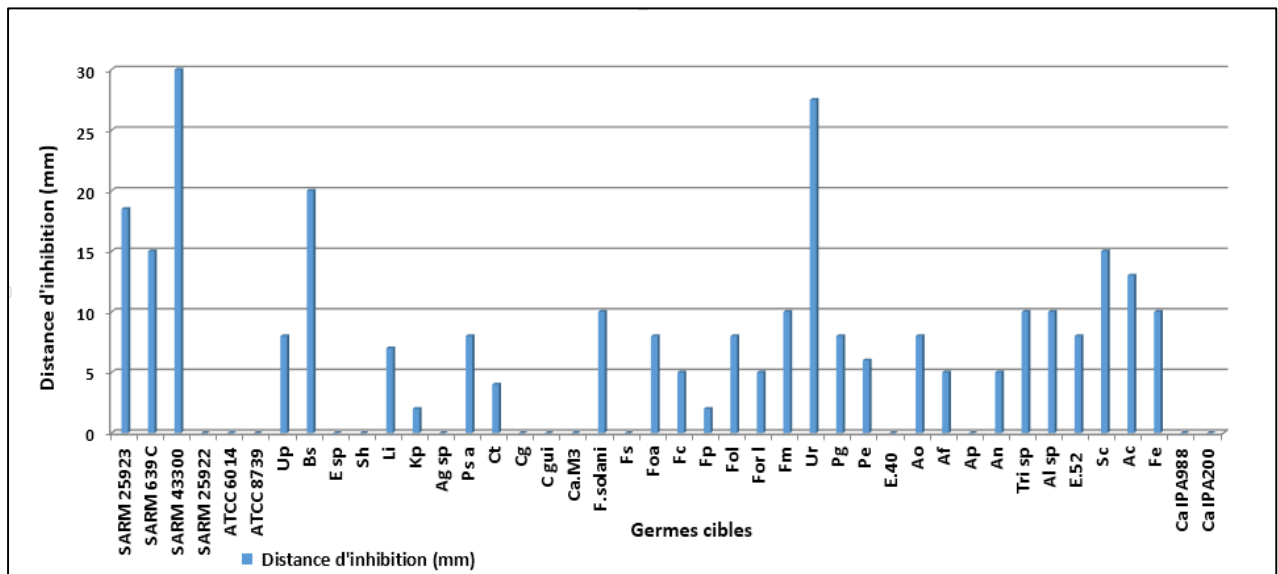


Figure 8. Activité antimicrobienne de la souche SA 198 sur milieu ISP2 par la méthode des stries croisées.

Note: **SARM** : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline. **ATCC 6014**: *Clostridium beijerinckii*. **ATCC 8739** : *Escherichia coli* multirésistante aux antibiotiques. **Up**: *Ureaplasma parvum* ATCC 27813. **Bs**: *Bacillus subtilis*. **E sp**: *Enterococcus sp.* **Sh** : *Streptococcus hemophilus*. **Li**: *Listeria innocua* CLIP74915. **Kp**: *Klebsiella pneumoniae*. **Ag sp**: *Agrobacterium sp.* **Ps a**: *Pseudomonas aeruginosa*. **Ct**: *Candida tropicalis*. **Cg**: *Candida glabrata*. **Cgui**: *Candida guilliermondii*. **Ca**: *Candida albicans*. **F.solani**: *Fusarium solani*. **Fs**: *Fusarium sporotrichoides*. **Foa**: *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis*. **Fc**: *Fusarium culmorum*. **Fp**: *Fusarium proliferatum*. **Fol**: *Fusarium oxysporum f.sp. lini*. **Forl**: *Fusarium oxysporum f.sp. radices lycopersici*. **Fm**: *Fusarium moniliforme*. **Ur**: *Umbelopsis ramanniana* NRRL 1829. **Pg**: *Penicillium glabrum*. **Pe**: *Penicillium expansum*. **E.40** : *Klebsiella pneumoniae* multirésistante aux antibiotiques. **Ao**: *Aspergillus ochraceus*. **Af**: *Aspergillus flavus*. **Ap**: *Aspergillus parasiticus*. **An**: *Aspergillus niger*. **Tri sp** : *Trichoderma sp.* **Al sp**: *Alternaria Sp.* **E52**: *Escherichia coli* multirésistante aux antibiotiques. **Sc**: *Saccharomyces cerevisiae*. **Ac**: *Aspergillus carbonarius*. **Fe**: *Fusarium equiseti*.

Les résultats obtenus (**Figure 8**) montrent que l'activité antagoniste est relativement assez large, elle est importante contre les bactéries à Gram positif (SARM ATCC 25923, SARM 639C, SARM ATCC 43300, *Ureaplasma parvum* ATCC 27813, *Bacillus subtilis* ATCC 30300, *Listeria innocua* CLIP 74915), où les valeurs d'inhibition variant de 7 jusqu'à 30 mm; cependant, certaines d'entre

elles se sont montrées résistantes (SARM ATCC 25922, *Enterococcus* sp, *Streptococcus hemophilus*, *Clostridium beijerinckii* ATCC 6014).



Figure 9. Activité antimicrobienne de la souche SA 198 sur milieu ISP2 par la méthode des stries croisées.

Chez les bactéries à Gram négatif ces activités sont en général faibles (*E.52: Escherichia coli* multirésistante aux antibiotiques, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27856), voire nulles (*Escherichia coli* multirésistante aux antibiotiques ATCC 8739, *E.40 Klebsiella pneumoniae* multirésistante aux antibiotiques). Dans le cas des champignons, l'activité est moyenne contre la majorité (de 2 à 13 mm) mais elle reste intéressante vis-à-vis d'*Umbelopsis ramanniana* NRRL 1829 (27,5 mm), alors que l'activité antilevurienne est absente sauf dans le cas de *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida tropicalis* où elle est plus ou moins faible (15 et 4 mm de diamètre respectivement).

1.2. Mise en évidence par la méthode des cylindres d'agar

Les résultats de test d'antagonisme basé sur la méthode des cylindres d'agar effectué vis-à-vis des germes cibles (SARM ATCC 43300, *Bacillus subtilis* ATCC 30300 et *Umbelopsis ramanniana* NRRL 1829) sont illustrés par la **figure 10**.

Nous remarquons que le spectre d'activité antimicrobienne de la souche SA 198 est variable en fonction du germe cible testé. Dans ce cas, l'activité antifongique est un peu plus importante que l'activité antibactérienne, étant donné qu'*Umbelopsis ramanniana* NRRL 1829 montre une zone d'inhibition de 26 mm de diamètre. En revanche, les bactéries *Bacillus subtilis* ATCC 30300 et SARM ATCC 43300 ont des valeurs d'inhibition comprise entre 22 et 24 mm respectivement.

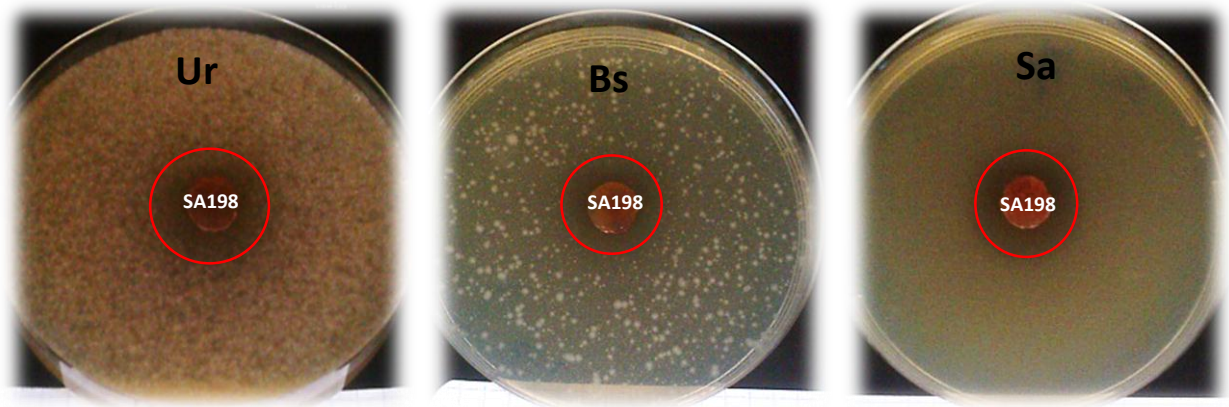


Figure10. Activité antagoniste de la souche SA 198 à l'égard des germes cibles par la méthode des cylindres d'agar.

2. Discussion

La souche SA 198 étudiée possède des potentialités inhibitrices certaines avec un spectre large touchant aussi bien les bactéries, les champignons et les levures, ceci est déjà vérifié chez nombre de souche appartenant au genre *Saccharothrix*. Ce pouvoir antagoniste diversifié est dû au fait que les espèces de ce genre sont connues pour être productrices de plusieurs antibiotiques d'une grande diversité structurale et à spectre d'action intéressant (Boubetra, 2013).

La souche SA 198 présente une activité importante contre certaines bactéries à Gram positif (SARM ATCC 43300, *Bacillus subtilis* ATCC 30300), et le champignon (*Umbelopsis ramanniana* NRRL 1829), tandis que cette action est soit faible ou nulle contre les bactéries à Gram négatif et les levures.

Les travaux menés par Boubetra (2013) ont montrés en plus, une activité contre plusieurs germes comme, les bactéries *Bacillus coagulans*; *Enterococcus faecalis*; *Listeria monocytogenes*, et le champignon *Ascochyta fabae*, alors que les souches de *Staphylococcus aureus* et *Saccharomyces cerevisiae* illustrées lors de ces travaux s'étaient montrées résistantes à la souche SA 198.

Plusieurs travaux dans le monde montrent que, l'activité des molécules produites par les souches du genre *Saccharothrix* est surtout dirigée contre les bactéries à Gram positif, parfois contre les champignons et rarement contre les bactéries à Gram négatif (Braznikova *et al.*, 1977; Horvath *et al.*, 1979; Isshiki *et al.*, 1989; Takeuchi *et al.*, 1992; Kinoshita *et al.*, 1999; Wang *et al* 2000; Lamari *et al.*, 2002; Schumacher *et al.*, 2002; Zitouni, 2005).

En générale les bactéries à Gram négatif montrent toujours une certaine résistance par rapport aux bactéries à Gram positif (Prescott *et al.*, 2002). En effet les Gram négatifs possèdent une enveloppe ayant développé de nombreux mécanismes de résistance vis-à-vis de plusieurs antibiotiques (Gupta *et al.*, 2011).

Les résultats des tests des stries croisées et des cylindres d'agar permettent surtout d'avoir une idée précise sur l'activité antagoniste de la souche SA 198. Ainsi d'orienter la suite du travail pour le passage à la production en milieu liquide (Velho-Pereira et Kamat, 2011). De ce fait et à partir de ces résultats, nous retenons trois souches choisis parmi les plus sensibles à savoir: SARM ATCC 43300, *Bacillus subtilis* ATCC 30300 et *Umbelopsis ramanniana* NRRL 1829, nous les utiliserons donc comme germes cibles lors des cinétiques de production en milieux agités.

II. CINÉTIQUES DE PRODUCTION DES ANTIBIOTIQUES DE LA SOUCHE SA 198 SUR MILIEUX LIQUIDE

Afin de sélectionner un milieu de production de base des antibiotiques de la souche SA 198, une première étape a consisté à rechercher la meilleure source d'azote et la meilleure source de carbone. Pour ce faire deux cinétiques ont été conduites dans des fioles Erlenmeyers et suivies durant 10 jours.

Dans la première cinétique, le milieu de culture synthétique (MS) de base est additionné de glucose à 10g/L comme source de carbone et utilisé pour tester quatre sources d'azote: le corn steep liquor, l'extrait de levure, l'extrait de malt, et la Peptone.

La deuxième cinétique, consiste à utiliser la meilleure source d'azote et étudier l'effet de quatre sources de carbone: le glucose, le fructose, le saccharose, et les dextrines.

Chaque milieu a été répété trois fois et chaque valeur représente la moyenne de trois essais.

Les cinétiques sont réalisées dans les mêmes conditions, à savoir la taille et l'âge de l'inoculum, les conditions de culture (température, pH, volume du milieu et agitation) ainsi que les méthodes d'analyses.

La mise en évidence de l'activité antimicrobienne est évaluée par la méthode de diffusion des puits en utilisant trois germes cibles choisis parmi les plus sensibles, à savoir *Bacillus subtilis* ATCC 30300 et SARM ATCC 43300 (bactéries à Gram positif) et un champignon *Umbelopsis ramanniana* NRRL 1829. La croissance est évaluée par mesure du poids sec de la biomasse (en g/L de milieu), et le pH est mesuré dans le filtra de culture.

1. Cinétiques de production avec différentes sources d'azote

1.1. Résultats

Les résultats du suivi de l'évolution de l'activité antibiotique, de la biomasse et du pH dans le milieu semi-synthétique sont illustrés dans la **figure 11**. Les résultats de l'activité antimicrobienne par la méthode des puits sont illustrés dans les **figures 12** et **13**.

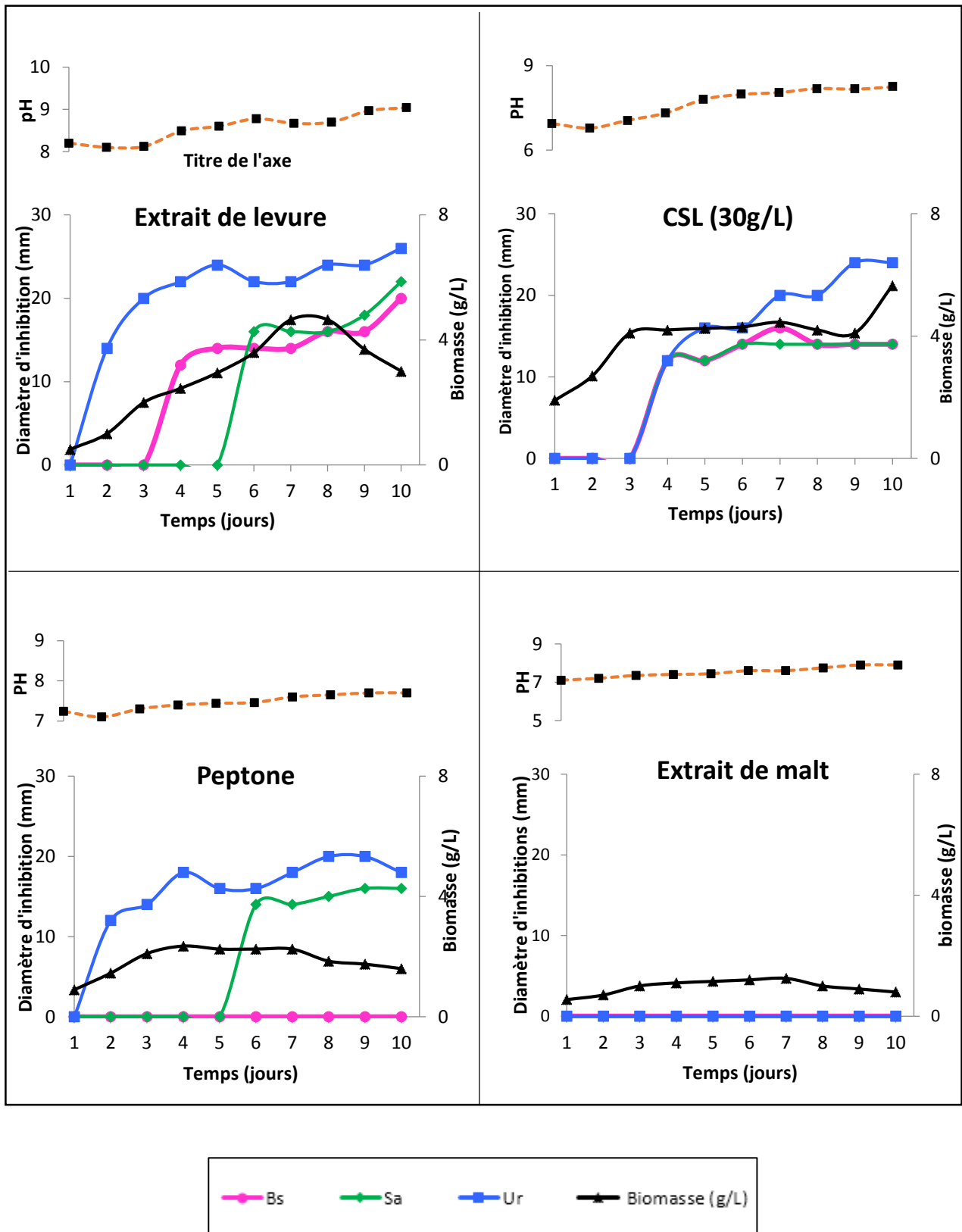


Figure 11. Cinétiques de production des activités antimicrobiennes et évolution du pH et de la biomasse, en milieu liquide MS-glucose additionné de différentes sources d'azote.

1.1.1. Milieu MS-glucose additionné de Corn steep liquor

La croissance dans le milieu MS-glucose additionné de Corn steep liquor, commence par une phase exponentielle qui dure 3 jours, suivie d'une phase stationnaire. À partir du 7^{ème} jour, on observe une phase de déclin jusqu'au 9^{ème} jour, puis une reprise de croissance (croissance cryptique). Le pH évolue en augmentation de manière progressive pour atteindre 8,25 le 10^{ème} jour. L'activité antibactérienne (**Figure 12**) et antifongique apparaît dans le milieu dès le 4^{ème} jour avec une zone d'inhibition de 12 mm. L'activité antibactérienne atteint son maximum durant la phase stationnaire, le 6^{ème} jour contre Sa (14 mm), et le 7^{ème} jour contre Bs (16 mm), cette activité a tendance à se stabiliser avec le temps. Cependant, le maximum de l'activité antifongique est obtenu en phase de déclin (9^{ème} jour) avec une zone d'inhibition de 24 mm. Aussi La production de l'activité antibiotique suit à l'évolution du pH.

1.1.2. Milieu MS-glucose additionné d'extrait de levure

Dans le milieu MS-glucose additionné d'extrait de levure, la croissance débute par une phase exponentielle lente jusqu'au 7^{ème} jour, suivie d'une phase stationnaire (8^{ème} jour), puis une phase de déclin. Le pH augmente lentement dès le 1^{er} jour, et atteint son maximum (9,04) le 10^{ème} jour de fermentation. L'activité antibiotique débute le 2^{ème} jour contre Ur (14 mm), le 4^{ème} jour contre Bs (12 mm) et le 6^{ème} jour contre Sa (16 mm). Les maxima sont atteints le 10^{ème} jour en plein phase de déclin. Nous notons un diamètre d'inhibition de 26 mm contre Ur, 22 mm contre Sa et 20 mm contre Bs (**Figure 13**). La production maximale d'antibiotique a lieu à un pH basique.

1.1.3. Milieu MS-glucose additionné d'extrait de malt

Avec l'extrait de malt, la croissance débute par une phase exponentielle jusqu'au 4^{ème} jour suivie d'une phase stationnaire qui dure jusqu'au 7^{ème} jour, puis une phase de déclin. La courbe de pH montre de légères variations (de 7,10 à 7,90) au cours de la cinétique. Aucune activité antimicrobienne (contre Sa, Bs et Ur) n'a été obtenue en présence d'extrait de malt.

1.1.4. Milieu MS-glucose additionné de la peptone

Dans le milieu MS-glucose additionné de la peptone, la souche présente une courbe de croissance caractérisée par une phase exponentielle évoluant progressivement du 1^{er} au 3^{ème} jour, puis une phase stationnaire (durée 5 jours), suivie directement par une phase de déclin jusqu'au 10^{ème} jour. Au cours de cette cinétique le pH varie très peu de 7,24 à 7,70. La peptone a montré une activité antifongique dès le 2^{ème} jour contre Ur avec une zone d'inhibition de 12 mm de diamètre. Cette activité antifongique augmente pour atteindre son maximum le 8^{ème} et le 9^{ème} jour (20 mm). L'activité antibactérienne apparaît le 6^{ème} jour contre Sa avec une zone d'inhibition de 14 mm de diamètre. Cette activité atteint 16 mm le 9^{ème} et le 10^{ème} jour. En revanche, l'activité contre Bs est nulle. La production d'activité est dissociée de la croissance et de l'évolution du pH.

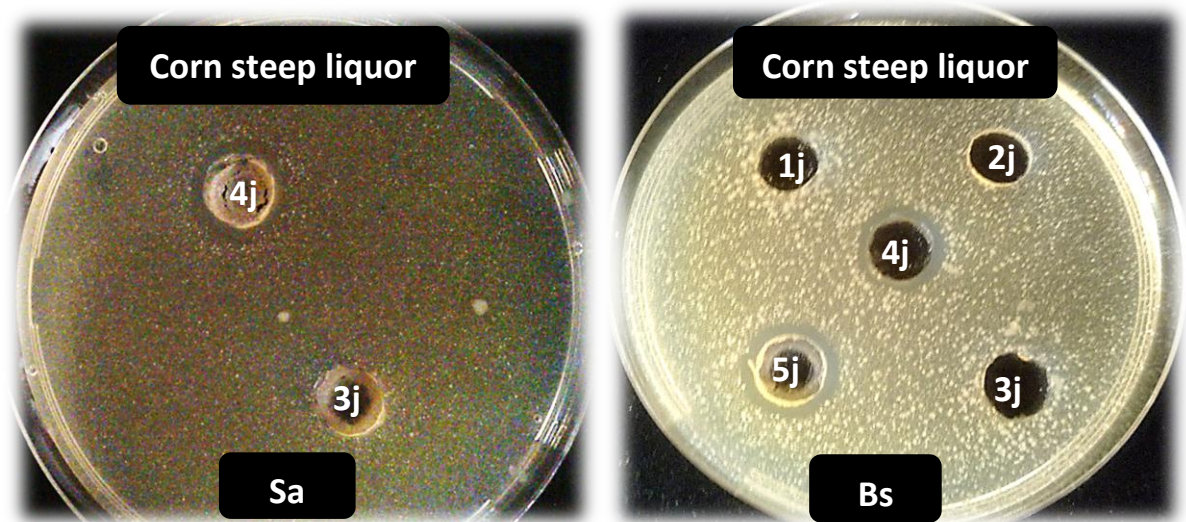


Figure 12. . Activité antibactérienne de la souche SA 198 de *Saccharothrix tamanrassetensis* contre *Bacillus subtilis* (Bs) et *Staphylococcus aureus* (Sa), par la méthode des puits, cultivée dans le milieu MS-glucose additionné de corn steep liquor comme source d'azote.

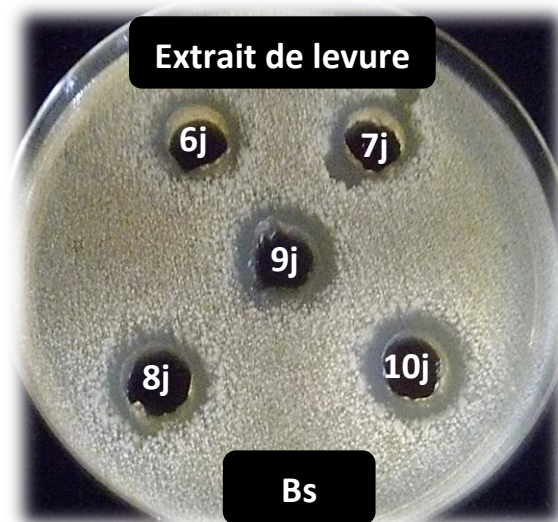


Figure 13. Activité antibactérienne de la souche SA 198 de *Saccharothrix tamanrassetensis* contre *Bacillus subtilis* (Bs) par la méthode des puits, cultivée dans le milieu MS-glucose additionné de l'extrait de levure comme source d'azote.

1.2. Discussion

Les résultats des cinétiques en fonction des différentes sources d'azote révèlent que les niveaux de la biomasse et de la production d'antibiotiques peuvent être considérablement influencés par la nature de la source d'azote ajoutée au milieu de culture. La croissance de la souche SA198 sur milieu MS-glucose additionné de différentes sources d'azote débute par une phase exponentielle, et se caractérise par l'absence d'une phase de latence, connue pour être due au temps d'adaptation

des microorganismes aux nouvelles conditions de culture, ainsi qu'à l'âge de l'inoculum, cette absence peut être expliquée par le fait que les pré-cultures aient été menées dans les mêmes conditions que les cultures et qu'elles soient prises en phase exponentielle de croissance.

Dans le milieu MS-glucose contenant les différentes sources d'azote, la production de l'activité antibactérienne et antifongique débute en phase exponentielle ou en phase stationnaire de croissance, et est non reliée à la croissance, et pour cause les maxima sont obtenus en phase de déclin.

Pour le corn steep liquor, nous avons observé après la phase de déclin une reprise de la croissance (assez faible), appelée communément croissance cryptique, laquelle a déjà été signalée chez plusieurs microorganismes, notamment chez les entérobactéries (Prescott *et al.*, 2002). Cette croissance cryptique peut être expliquée par le fait que les cellules encore vivantes utilisent comme substrat les débris des cellules mortes qui se sont lysées durant la phase de déclin. Ce phénomène a aussi été observé chez plusieurs souches de *Streptomyces* (Driche, 2010; Toumatia, 2010; Aouiche, 2013; Tata, 2015).

Dans les milieux MS-glucose additionnés de CSL ou d'extrait de levure, le pH devient basique au cours de la fermentation. Le pH des milieux MS-glucose additionnés d'extrait de malt ou de peptone n'évolue pas vraiment. L'évolution basique du pH semble être due à la dégradation des acides aminés présents dans le corn steep, l'extrait de levure et la peptone, qui sont désaminés pour libérer de l'ammonium. L'accumulation de ce dernier provoque la basification du milieu. De telles constatations ont été énoncées par Strub (2008) pour expliquer l'augmentation du pH dans un milieu contenant l'extrait de levure dans la culture de *Sa. algeriensis*.

La meilleure activité antimicrobienne est obtenue en présence de l'extrait de levure, nous l'avons donc retenu pour étudier l'influence des sources de carbone sur la synthèse d'antibiotiques. L'extrait de levure, de par sa composition, constitue une source d'azote riche et diversifiée, il est très utilisé pour la biosynthèse des antibiotiques, y compris pour les *Saccharothrix* (Isshiki *et al.*, 1989; Vertesy *et al.*, 2001; Lamari *et al.*, 2002a; Bouras, 2005; Bakour, 2006; Strub, 2008) et les *Streptomycètes* (Pandey *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2009). En revanche, des résultats dissemblables ont été trouvés par Laassami (2015) en présence de l'extrait de levure dans le milieu, où aucune activité antibactérienne n'est détectée, par contre une bonne activité antifongique est observée. Cela pourrait s'expliquer par l'origine (marque) d'extrait de levure utilisé.

En présence de CSL dans le milieu, nos résultats montrent que les activités antimicrobiennes sont moins intéressantes que celles obtenues avec l'extrait de levure. Selon Laassami (2015) le CSL permet d'avoir de meilleures activités antimicrobiennes. Ainsi, plusieurs chercheurs ont trouvé que le CSL est la meilleure source d'azote pour la production de métabolites secondaires chez certains

microorganismes, tels que la production de l'acide lactique par des souches de *Lactobacillus* (Lee, 2005; Yu *et al.*, 2008), la production d'éthanol par *Saccharomyces cerevisiae* (Pereira *et al.*, 2010), la production de Caroténoïdes par *Sporidiobolus pararoseus* (Valdugan *et al.*, 2014) et la production d'acide succinique par *Actinobacillus succinogenes* NJ113 (Xi *et al.*, 2013). Nos résultats restent néanmoins intéressants en présence de CSL et en ce qui concerne l'activité antifongique, notamment du fait que le CSL est un sous-produit moins onéreux que l'extrait de levure, il serait intéressant de l'utiliser afin d'optimiser l'activité antifongique de la souche SA 198.

Par ailleurs, nos résultats montrent de faibles diamètres d'inhibition avec la peptone dans le cas de Ur et Sa, et absence d'activité antibactérienne contre Bs. Les travaux de Pandey *et al.* (2005) ont montrés que la peptone ne favorise pas la production de kanamycine chez *S. kanamyceticus* M27. En revanche, les travaux de Laassami (2015) lors de l'optimisation de la production d'antibiotiques par *Sa. tamanrassetensis* montrent l'efficacité de la peptone comme étant une source d'azote qui favorise le mieux la production d'antibiotiques.

En présence d'extrait de malt dans le milieu, aucune activité antimicrobienne n'est détectée. Ceci rejoint quelques travaux rapportés dans la littérature où l'extrait de malt défavorise la production d'antibiotiques par certaines souches de *Streptomyces spp* (Omura et Tanaka, 1986; Escalente *et al.*, 1999).

2. Cinétiques de production avec différentes sources de carbone

Dans cette cinétique le milieu MS a été choisi en retenant l'**extrait de levure** comme source d'azote, il devient ainsi semi-synthétique étant donné que le substrat extrait de levure est complexe. Le milieu est additionné de différentes sources de carbone (prise séparément) dans le but d'étudier leur effet sur la croissance, le pH et la production des antibiotiques.

2.1. Résultats

Les résultats de l'évolution de l'activité antimicrobienne, de la croissance et du pH sont présentés par milieu de culture dans la **figure 14**. Les résultats de l'activité antimicrobienne par la méthode des puits sont illustrés dans les **figures 15 et 16**.

2.1.1. Milieu MSS additionné de glucose

En présence de glucose, la croissance débute par une phase exponentielle qui dure 48 h, suivi d'une phase stationnaire qui se prolonge jusqu'au 4^{ème} jour, puis une phase de déclin.

Le pH augmente progressivement tout au long de la fermentation pour atteindre 8,7 le 10^{ème} jour. L'activité antimicrobienne apparaît le 4^{ème} jour en phase stationnaire où les zones d'inhibition sont de 12 mm contre Bs et Sa et 16 mm contre Ur. Les activités maximales sont observées en phase de déclin et à pH alcalin, le 9^{ème} jour pour Bs et Sa (16 mm), et le 10^{ème} jour pour Ur (20 mm).

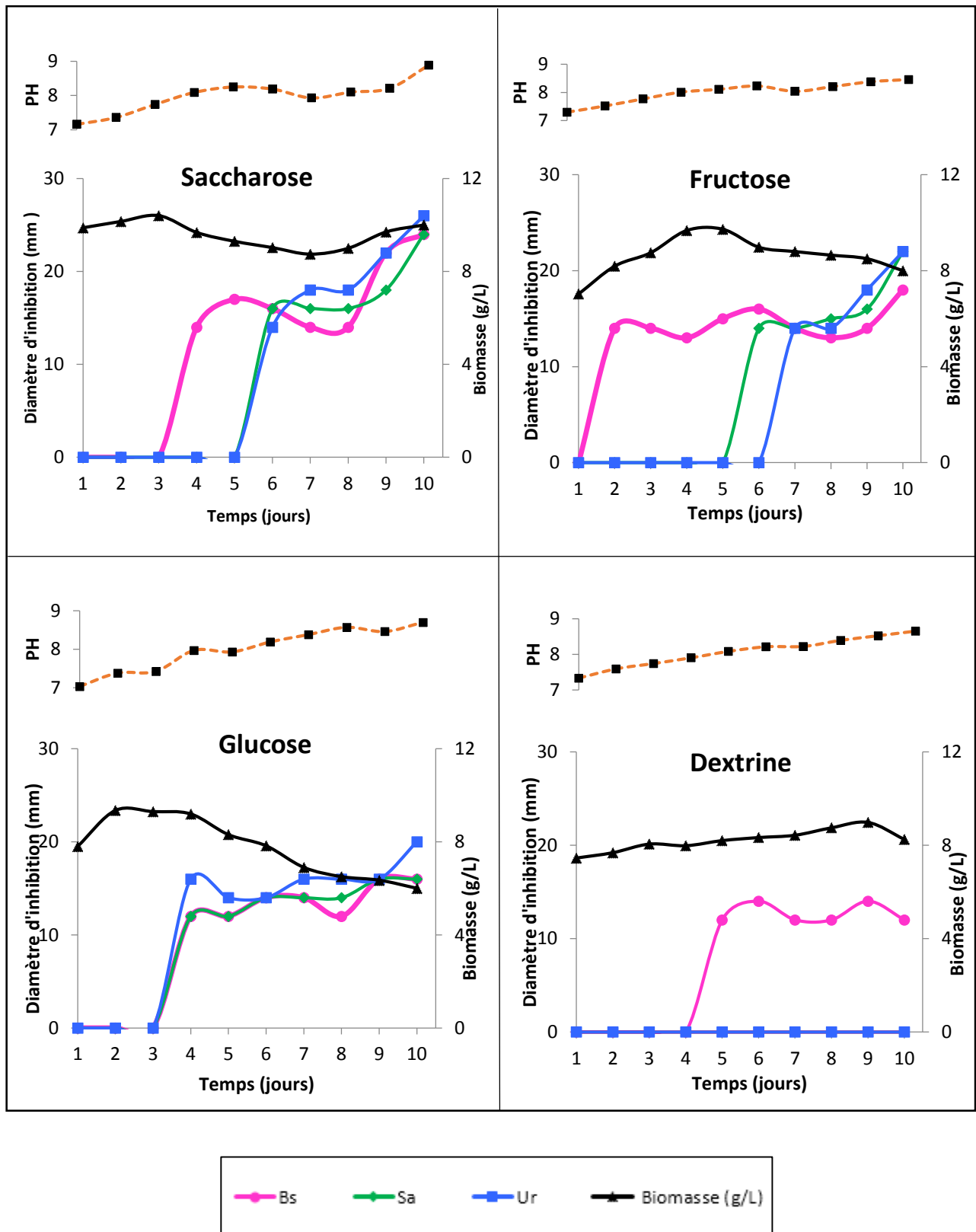


Figure 14. Cinétiques de production des activités antimicrobiennes et évolution du pH et de la biomasse, en milieu liquide MSS additionné de différentes sources de carbone.

2.1.2. Milieu MSS additionné de saccharose

Dans le milieu MSS additionné de saccharose, la courbe de croissance entame d'abord une phase exponentielle jusqu'au 3^{ème} jour, suivie d'une phase de déclin qui se prolonge jusqu'au 7^{ème} jour, puis une reprise de croissance au 9^{ème} jour (croissance cryptique)

Le pH initial de 7,16 tend à augmenter au début de fermentation puis diminue au 7^{ème} jour, et augment à nouveau pour atteindre une valeur maximale de 8,89.

L'activité antimicrobienne survient au 4^{ème} jour contre Bs avec 14 mm et seulement au 6^{ème} jour à l'égard de Sa et Ur, avec des zones d'inhibition de 16 mm et 14 mm respectivement. Cette activité atteint son maximum le 10^{ème} jour de culture avec les trois germes cibles et des zones d'inhibitions de 24 mm contre Bs et Sa, et de 26 mm contre Ur (**Figure 15**) sont observées. La production de l'activité antimicrobienne est partiellement associée à la croissance et au pH alcalin.

2.1.3. Milieu MSS additionné de fructose

La courbe de croissance sur le milieu MSS additionné de fructose, commence par une phase exponentielle qui s'étend au 4^{ème} jour, puis une phase stationnaire courte, suivie d'une phase de déclin.

Au 1^{er} jour de cinétique, le pH est de 7,3; puis il évolue lentement au cours des 10 jours de cinétique pour atteindre une valeur de 8,46 le 10^{ème} jour.

En présence de fructose dans le milieu l'activité est détectée le 2^{ème} jour de fermentation contre Bs, le 6^{ème} jour contre Sa et le 7^{ème} jour contre Ur, avec une zone d'inhibition de 14 mm pour les trois germes. Cette activité tend à augmenter pour atteindre son maximum (22 mm contre Ur et Sa et 18 mm contre Bs) au 10^{ème} jour (**Figure 16**). Ce maximum est obtenu en phase de déclin de croissance et à un pH basique.

2.1.4. Milieu MSS additionné de dextrine

La croissance dans le milieu MSS additionné des dextrines, débute par une longue phase exponentielle qui évolue très lentement jusqu'au 9^{ème} jour, suivie par une phase de déclin.

Au cours de cette croissance, il y a une basification progressive du milieu et le pH atteint en fin de fermentation la valeur de 8,65.

Aucune activité n'a été enregistrée en présence de Sa et Ur. Alors que des très faible actions sont observées contre Bs à partir du 5^{ème} jour avec des zones d'inhibition varient entre 12 et 14 mm.

2.2. Discussion

Lors des cinétiques de production des antibiotiques de la souche SA 198 en milieu liquide MSS additionné de différentes sources de carbone, les activités sont apparues découplées de la croissance. En effet cette production débute durant la phase exponentielle ou la phase de déclin (zones d'inhibitions les plus importantes). En général, la production des métabolites secondaires par

les microorganismes a lieu durant les phases de ralentissement et stationnaire, mais dans le cas des actinobactéries cette production peut avoir lieu en phases exponentielle, stationnaire et de déclin (Zitouni, 2005; Badji, 2006).

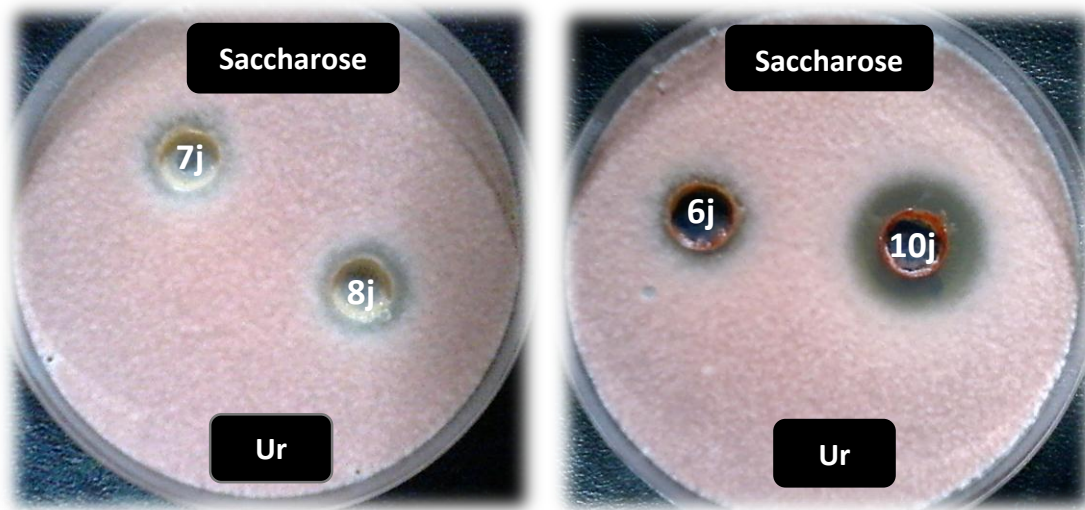


Figure 15. Activité antimicrobienne de la souche SA 198 de *Saccharothrix tamanrassetensis* contre *Umbelopsis ramanniana* (Ur) par la méthode des puits, cultivée dans le milieu MSS Additionné de saccharose comme source de carbone.

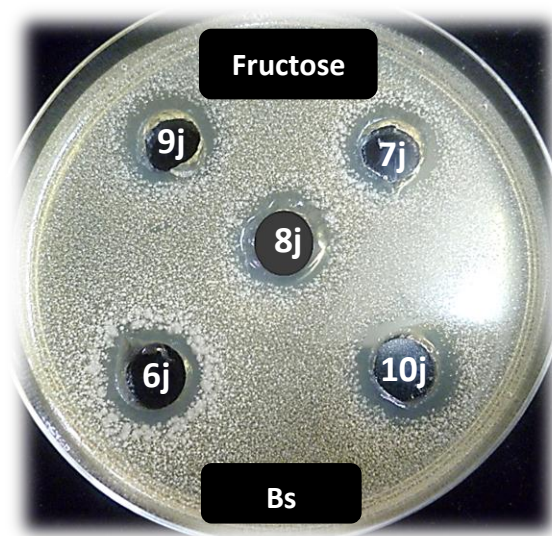


Figure 16. Activité antimicrobienne de la souche SA 198 de *Saccharothrix tamanrassetensis* contre *Bacillus subtilis* (Bs), par la méthode des puits, cultivée dans le milieu MSS additionné du fructose comme source de carbone.

L'augmentation de l'activité antimicrobienne durant la phase de déclin suggère, que durant cette phase, les cellules se lysent et libèrent les quantités d'antibiotiques non encore sécrétés.

Concernent le pH, nous notons que dans le milieu MSS avec les différentes sources de carbone testées, le pH est alcalin le jour de production optimale. Ceci suggère que les activités antimicrobiennes sont produites à un pH basique. Ces résultats sont en corrélation avec ceux obtenus par Boubetra (2013) et avec de nombreux autres travaux. S'agissant des recherches fait sur l'optimisation de la production des antibiotiques, où l'activité est mesurée à des pH différents, il apparait que la production optimale à lieu à un pH basique (Hata *et al.*, 1971; Larpent et Sanglier, 1989; Larpent-Gourgand et Sanglier, 1992; Jain *et al.*, 2011).

Sur les quatre sources de carbone testées, le saccharose a permis une bonne croissance et de meilleures activités antimicrobiennes de la souche SA 198, il est suivi du fructose et du glucose. Alors qu'en présence des dextrines, la production de l'activité antimicrobienne est presque nulle. Ces résultats sont en corrélation avec ceux obtenus par Laassami (2015). Un résultat analogue est aussi obtenu par Islam *et al.* (2009), lors de la production des antibiotiques par la souche *S. albidoflavus* C247. Le saccharose est apparu meilleure source de carbone également dans le travail de Thakur *et al.* (2009). En revanche, d'autres études rapportent que les plus faibles productions des activités antimicrobiennes ont été obtenues avec le saccharose (Ababutain *et al.*, 2013; Arasu *et al.*, 2014).

Le fructose dans notre cas s'est révélé la meilleure source de carbone après le saccharose avec des diamètres d'inhibition assez appréciables comparés à ceux obtenus avec le glucose et les dextrines. Certains travaux rapportent en effet, que la biosynthèse de l'activité antimicrobienne est meilleure en présence de fructose, tel que la production d'oléandomycine par *Streptomyces antibioticus* (Vilches *et al.*, 1990), d'actinomycine -D par *S. halstedii* (Praveen *et al.*, 2008), de néomycine par *S. fradiae* NCIM2418 (Vastrad *et al.*, 2011). En contrepartie, d'autres travaux rapportent une réduction ou même une absence de production en présence du fructose (Thakur *et al.*, 2009; Gunda *et al.*, 2013).

D'autre part les faibles diamètres d'inhibition obtenus avec le glucose sont en accord avec ceux de Sanchez *et al.* (2010), qui rapportent que le glucose a un effet défavorable sur la biosynthèse des antibiotiques. Il diminue la production de la nystatine (Jonsbu *et al.*, 2002), de l'avilamycine (Zhu *et al.*, 2007) et de la néomycine (Vastrad *et al.*, 2011). Dans ces cas, le glucose réprime la biosynthèse des antibiotiques en inhibant les enzymes impliquées. Par exemple, le glucose a un effet négatif sur l'action de phénoxazinone synthétase et N-acétyl kanamycine amidohydrolase, deux enzymes impliquées dans les voies de biosynthèse de l'actinomycine et de la kanamycine, respectivement (Galo *et al.*, 1972; Satoh *et al.*, 1976). D'autre études sur la production des antibiotiques par *Sa. algeriensis* (Lamari, 2006), où les souches ERI-1, ERI-3, ERI-26 de

Streptomyces (Arasu *et al.*, 2014) ont fait ressortir par contre le glucose comme meilleure source de carbone.

En présence des dextrines dans le milieu de culture, aucune activité antifongique n'est détectée, par contre l'activité antibactérienne est soit faible (contre Bs) ou nulle (contre Sa). Ces résultats contredisent ceux obtenus par Laassami (2015) où des bonnes activités antimicrobiennes sont enregistrées en présence des dextrines. Lamsaïf (1992) a trouvé les dextrines comme meilleure source de carbone et d'énergie pour la production de la spiramycine, plus que le glucose et le fructose. Chez certaines souches d'actinobactéries comme le rapporte les travaux de Lounès *et al.* (1995) et Lebrihi *et al.* (1988a), les sources de carbone lentement assimilées (comme les polysaccharides tel que les dextrines) permettent d'avoir un apport de carbone de façon lente, mais continue et donc de meilleurs rendements de production d'antibiotiques.

III. MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE ANTIBIOTIQUE PAR LA METHODE DES DISQUES DE PAPIER

1. Résultats

L'extraction des antibiotiques sécrétés par la souche SA198 sur milieu MSS est réalisée au 10^{ème} jour de fermentation qui correspond au jour optimal de production. Après centrifugation des cultures, l'extraction est effectuée sur les filtrats de culture en utilisant le dichlorométhane, tel que décrit par Boubetra (2013). Seules les phases organiques sont récupérées et testées par la méthode des disques de papier (antibiographie) contre SARM ATCC 43300, *Bacillus subtilis* ATCC 30300, et *Umbelopsis ramanniana* NRRL 1829. Les extraits obtenus sont de couleur brun foncé quand ils sont concentrés et jaune quand ils sont dilués. Les résultats obtenus sont présentés dans les **figures 17 et 18**.

1.1. Tests des disques de papier en fonction des sources d'azote

Après antibiographie, nous constatons que les résultats des activités antibactériennes sont différentes de ceux notés avec l'activité antifongique et ce pour les quatre sources d'azote testées (**Figure 17**). Concernant l'extrait de levure, l'activité est importante contre Bs (20 mm), moins importante contre Sa (18 mm) et seulement 14 mm avec Ur. Pour l'extrait de malt, les activités contre Bs; Sa; Ur sont de 18; 16 et 10 mm respectivement. Dans le cas de la peptone, l'activité est nulle contre Bs et Ur, et faible contre Sa (10 mm). Le Corn steep liquor, montre des zones d'inhibition similaires contre Bs et Sa (16 mm), et une inhibition modéré contre Ur (12 mm).

1.2. Tests des disques de papier en fonction des sources de carbone

La **figure 18** montre des activités importante vis-à-vis des trois germes dans le cas du saccharose (30 mm; 20 mm et 18 mm, pour Bs; Sa et Ur, respectivement). Dans le cas du glucose

et la dextrine, une zone d'inhibition de 10 mm est notée contre Bs, alors que les souches Ur et Sa se sont montrées résistantes. L'activité antimicrobienne est modérée dans le cas du fructose, avec des zones d'inhibitions de 16 mm contre Sa et Ur, et 20 mm contre Bs.

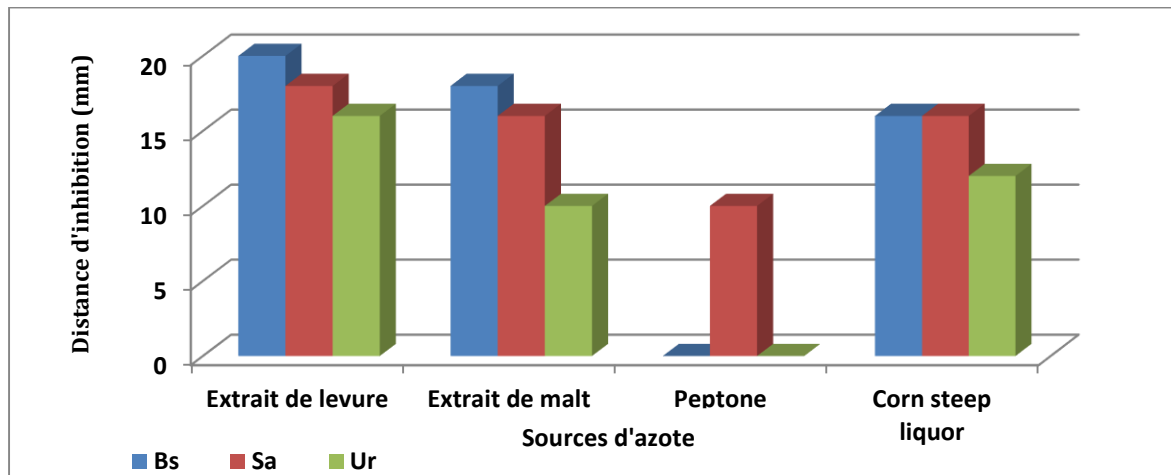


Figure 17. Activités antimicrobienne par antibiographie «sources d'azote» de la souche SA 198 contre Bs, Sa et Ur.

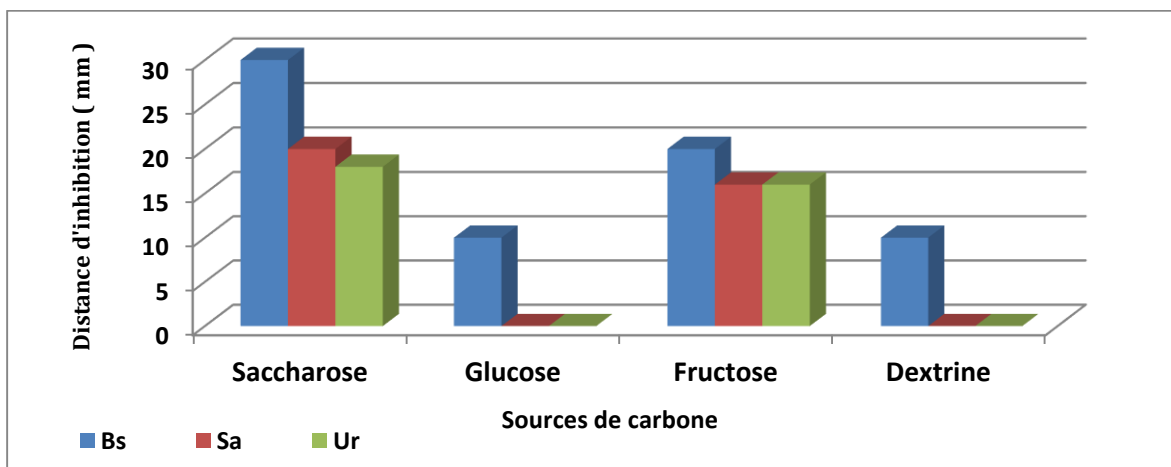


Figure 18. Activités antimicrobienne par antibiographie «sources de carbone» de la souche SA 198 contre Bs, Sa et Ur.

2. Discussion

Les extraits du filtrat de culture de la souche SA 198 se sont révélés actifs, et ont permis de détecter par antibiographie des zones d'inhibition presque similaires à celles obtenues par la méthode de diffusion des puits.

En effet, en comparant les activités antimicrobiennes obtenues par antibiographie avec celles obtenues par la méthode des puits pour ce qui est des sources d'azote, nous remarquons que les

activités dans le cas de l'extrait de malt sont extractibles pour les trois germes cibles. Cependant les résultats obtenus avec les autres sources d'azote (extrait de levure et peptone), des pertes d'activité ont été constatées dans le cas de Ur et Sa, par contre l'activité contre Bs est restée la même. Pour le corn steep liquor, des résultats presque similaires sont obtenus contre Sa et Bs, avec une perte d'activité contre Ur.

Concernant les sources de carbone, nous notons une perte d'activité sur les trois germes dans le cas de l'utilisation du glucose comme source de carbone. Pour le saccharose, une perte d'activité contre Sa et Ur, et un gain d'activité contre Bs sont observées. Dans le cas des dextrans, les mêmes résultats sont observés pour Ur et Sa, avec une perte d'activité contre Bs. En ce qui concerne le fructose l'activité contre Bs s'est révélée presque la même pour les deux méthodes, par contre une absence d'activité est observée contre Ur et Sa.

Globalement, l'extraction des antibiotiques via solvant organique, a donné des activités antimicrobiennes dans le cas de la variation des sources d'azote moins importantes par rapport à celles obtenues par la méthode des puits, tandis que dans le cas des sources de carbone, à l'exception du saccharose, l'activité est extractible du fait qu'elle est restée la même que dans le filtrat et mêmes parfois, des activités plus importantes étaient signalées après extraction.

Aussi suivant ces résultats nous pouvons constater que les antibiotiques antibactériens sont mieux extractibles que les antibiotiques antifongiques.

La perte d'activité dans la méthode de disques de papier peut être expliquée par le fait que les molécules bioactives de la souche SA 198 se sont concentrées dans la phase aqueuse plutôt que dans la phase organique, en d'autres termes, les molécules actives sont plutôt hydrophiles et non extractibles par le solvant. En revanche, le gain d'activité antimicrobienne dans cette méthode s'explique par le fait que les antibiotiques de cette souche se trouvent dans la phase organique (molécules hydrophobes) et sont extractibles par le dichlorométhane.

IV. MODELISATION DE L'ACTIVITE ANTIMIROBIENNE DE LA SOUCHE SA 198

1. Résultats

1.1. Plan de Plackett-Burman (PB)

L'importance des six composants, Extrait de levure; Saccharose; KH_2PO_4 ; K_2HPO_4 ; CaCl_2 et NaCl sur la production des biomolécules antifongiques et antibactériennes a été étudiée par le plan **Plackett-Burman** et a permis de mesurer la réponse Y qui est l'activité antimicrobienne estimée en millimètre à l'égard de trois germes cibles à savoir SARM ATCC 43300, *Bacillus subtilis* ATCC 30300 et *Umbelopsis ramanniana* NRRL 1829.

La modélisation des résultats par le logiciel Minitab 16.0 a permis de sélectionner parmi les six paramètres opératoires cités, les facteurs les plus significatifs sur la production d'antibiotiques. Cette analyse statistique identifie les variables qui ont un effet significatif positif sur la production d'antibiotiques. L'ensemble des résultats sont repris par germe cible dans les **tableaux 8, 9 et 10** ci-dessous, et représentent les diamètres d'inhibition des 26 expériences du test d'activité pour chaque germe cible étudié, aussi les effets obtenus sont illustrés dans les **figures 19, 20 et 21**.

Tableau 8. Résultats obtenus avec le plan PB des 26 expériences mesurant la production d'antibiotique contre le germe SARM ATCC 43300.

Nombre d'expériences	Variables codantes						Réponse SARM 43300 Y (M)
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	
Expérience 1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	18
Expérience 2	0	0	0	0	0	0	14
Expérience 3	-1	+1	+1	-1	+1	-1	14
Expérience 4	+1	-1	-1	-1	+1	+1	00
Expérience 5	-1	+1	+1	+1	-1	+1	00
Expérience 6	-1	-1	+1	+1	+1	-1	00
Expérience 7	+1	+1	-1	+1	+1	-1	22
Expérience 8	-1	+1	-1	-1	-1	+1	25
Expérience 9	-1	-1	-1	-1	-1	-1	22
Expérience 10	+1	-1	+1	-1	-1	-1	22
Expérience 11	+1	-1	+1	+1	-1	+1	12
Expérience 12	+1	+1	-1	+1	-1	-1	22
Expérience 13	-1	-1	-1	+1	+1	+1	18
Expérience 14	+1	+1	+1	-1	+1	+1	20
Expérience 15	0	0	0	0	0	0	22
Expérience 16	-1	+1	+1	-1	+1	-1	00
Expérience 17	+1	-1	-1	-1	+1	+1	00
Expérience 18	-1	+1	+1	+1	-1	+1	00
Expérience 19	-1	-1	+1	+1	+1	-1	00
Expérience 20	+1	+1	-1	+1	+1	-1	20
Expérience 21	-1	+1	-1	-1	-1	+1	22
Expérience 22	-1	-1	-1	-1	-1	-1	22
Expérience 23	+1	-1	+1	-1	-1	-1	14
Expérience 24	+1	-1	+1	+1	-1	+1	10
Expérience 25	+1	+1	-1	+1	-1	-1	15
Expérience 26	-1	-1	-1	+1	+1	+1	20

X1: Extrait de levure; **X2:** Saccharose; **X3:** KH₂PO₄; **X4:** K₂HPO₄; **X5:** CaCl₂; **X6:** NaCl ;
Y: diamètre d'inhibition en mm.

En observant les graphes obtenus et illustrés dans les **figures 19, 20 et 21**, il apparaît que les paramètres de culture ayant des effets significatifs se distinguent clairement entre paramètres influençant l'activité antibactérienne et paramètres influençant l'activité antifongique. En effet, selon les **figures 19 et 20** représentant l'effet des six paramètres sur l'activité antibactérienne vis-à-vis du **SARM** et du **Bs**, le seul composé qui se distingue du reste est bien la concentration en **KH₂PO₄** dans le milieu de culture. Contrairement à **Ur** où se sont les variables **CaCl₂** et **Saccharose** qui jouent un rôle significatif influençant la réponse.

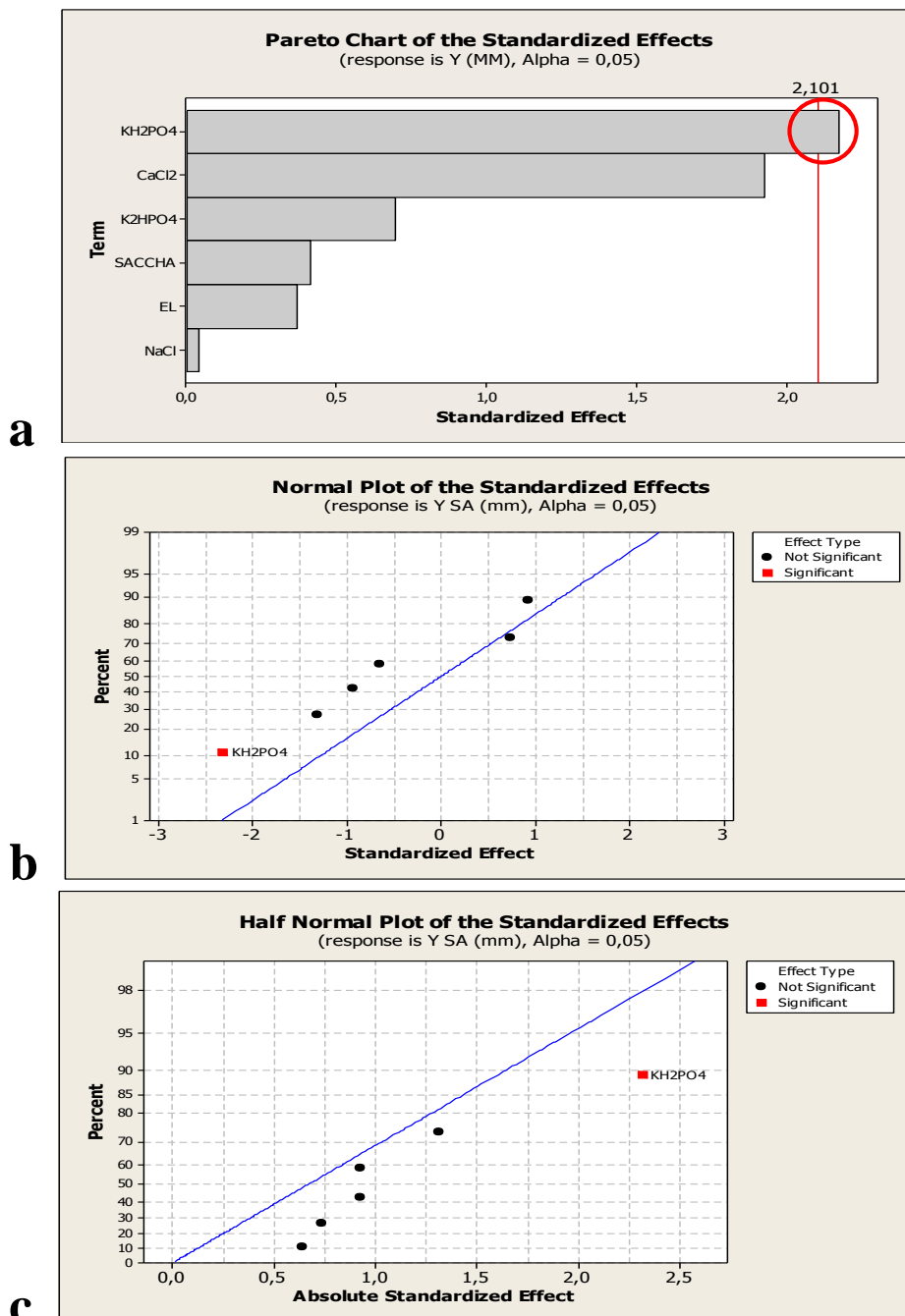


Figure 19. Effet des paramètres de culture étudiés sur milieu semi synthétique (MSS), sur l'activité antibactérienne de la souche SA 198 vis-à-vis de **SARM ATCC43300**.

En ce qui concerne le germe cible **SARM ATCC 43300**, la **figure 19a** représentant la charte de Pareto, montre clairement l'effet significatif du seul facteur **X3** donc le KH_2PO_4 sur la production de l'activité antibactérienne par la souche SA 198.

Par ailleurs la représentation normale plot (**Figure 19b**) et le Half normale plot (**Figure 19c**) confirment ce résultat, à savoir le **KH_2PO_4** , comme seul facteur significatif se distinguant du reste des autres paramètres, et influençant la production d'antibiotiques chez la souche SA198.

Tableau 9. Résultats obtenus avec le plan PB des 26 expériences mesurant la production d'antibiotique contre le germe **Bs ATCC 30300**.

Nombre d'expériences	Variables codantes						Réponse Bs 30300 Y (M)
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	
Expérience 1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	20
Expérience 2	0	0	0	0	0	0	00
Expérience 3	-1	+1	+1	-1	+1	-1	00
Expérience 4	+1	-1	-1	-1	+1	+1	00
Expérience 5	-1	+1	+1	+1	-1	+1	00
Expérience 6	-1	-1	+1	+1	+1	-1	00
Expérience 7	+1	+1	-1	+1	+1	-1	25
Expérience 8	-1	+1	-1	-1	-1	+1	20
Expérience 9	-1	-1	-1	-1	-1	-1	25
Expérience 10	+1	-1	+1	-1	-1	-1	14
Expérience 11	+1	-1	+1	+1	-1	+1	10
Expérience 12	+1	+1	-1	+1	-1	-1	10
Expérience 13	-1	-1	-1	+1	+1	+1	15
Expérience 14	+1	+1	+1	-1	+1	+1	18
Expérience 15	0	0	0	0	0	0	20
Expérience 16	-1	+1	+1	-1	+1	-1	00
Expérience 17	+1	-1	-1	-1	+1	+1	00
Expérience 18	-1	+1	+1	+1	-1	+1	16
Expérience 19	-1	-1	+1	+1	+1	-1	00
Expérience 20	+1	+1	-1	+1	+1	-1	24
Expérience 21	-1	+1	-1	-1	-1	+1	28
Expérience 22	-1	-1	-1	-1	-1	-1	25
Expérience 23	+1	-1	+1	-1	-1	-1	25
Expérience 24	+1	-1	+1	+1	-1	+1	00
Expérience 25	+1	+1	-1	+1	-1	-1	24
Expérience 26	-1	-1	-1	+1	+1	+1	26

X1: Extrait de levure; **X2:** Saccharose; **X3:** KH_2PO_4 ; **X4:** K_2HPO_4 ; **X5:** CaCl_2 ; **X6:** NaCl ; **Y:** diamètre d'inhibition en mm.

Pour le germe cible **Bs ATCC 30300**, la **figure 20a** de la charte de Pareto, distingue le seul facteur **X3: KH_2PO_4** , comme seul paramètre significatif ayant une influence sur la production de l'activité

antibactérienne par la souche SA 198. Aussi comme dans le cas du germe SARM ATCC 43300, la représentation normale plot (Figure 20b) et le Half normale plot (Figure 20c) confirment ce résultat.

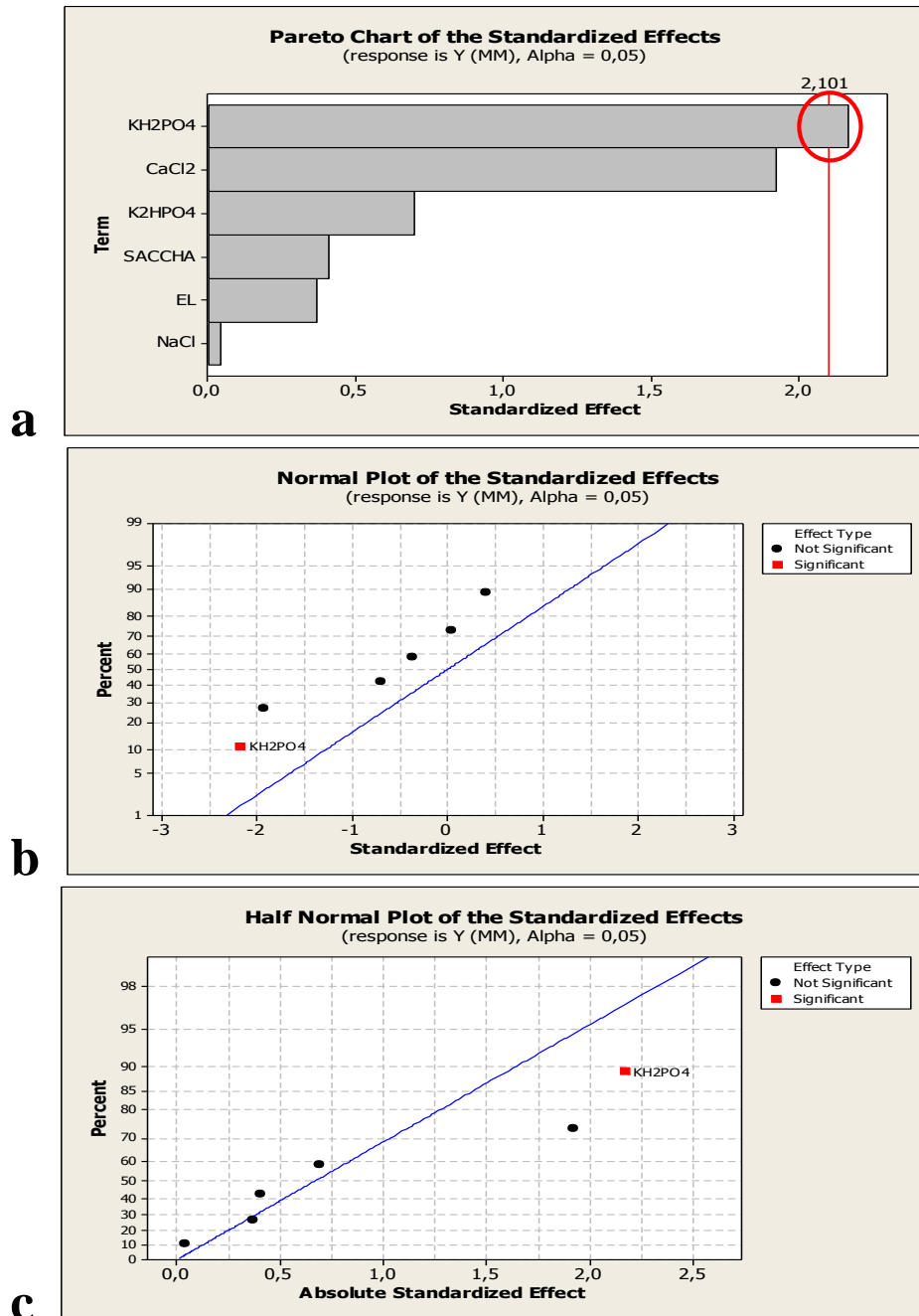


Figure 20. Effet des paramètres de culture étudiés sur milieu semi synthétique (MSS), sur l'activité antibactérienne de la souche SA 198 vis-à-vis de **Bs ATCC 30300**.

Dans le cas de la recherche des paramètres influençant la production de l'activité antifongique par SA 198 contre Ur NRRL 1829, les réponses obtenues lors des test d'activité, ont permis de déduire à partir du logiciel de traitement, les graphes portés dans la **figure 21**, où l'on conclut selon la chart de Pareto (**Figure 21a**), que les variables qui ont un rôle dans la synthèse de l'activité antifongique,

sont les variables **X1** et **X5**, résultat vérifié avec les représentations normale plot (**Figure 21b**) et Half normale plot (**Figure 21c**).

Tableau 10. Résultats obtenus avec le plan PB des 26 expériences mesurant la production d'antibiotique contre le germe **Ur NRRL 1829**.

Nombre d'expériences	Variables codantes						Réponse Ur 1829 Y (M)
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	
Expérience 1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	00
Expérience 2	0	0	0	0	0	0	00
Expérience 3	-1	+1	+1	-1	+1	-1	00
Expérience 4	+1	-1	-1	-1	+1	+1	00
Expérience 5	-1	+1	+1	+1	-1	+1	00
Expérience 6	-1	-1	+1	+1	+1	-1	00
Expérience 7	+1	+1	-1	+1	+1	-1	00
Expérience 8	-1	+1	-1	-1	-1	+1	00
Expérience 9	-1	-1	-1	-1	-1	-1	10
Expérience 10	+1	-1	+1	-1	-1	-1	10
Expérience 11	+1	-1	+1	+1	-1	+1	10
Expérience 12	+1	+1	-1	+1	-1	-1	00
Expérience 13	-1	-1	-1	+1	+1	+1	00
Expérience 14	+1	+1	+1	-1	+1	+1	00
Expérience 15	0	0	0	0	0	0	00
Expérience 16	-1	+1	+1	-1	+1	-1	00
Expérience 17	+1	-1	-1	-1	+1	+1	00
Expérience 18	-1	+1	+1	+1	-1	+1	00
Expérience 19	-1	-1	+1	+1	+1	-1	08
Expérience 20	+1	+1	-1	+1	+1	-1	00
Expérience 21	-1	+1	-1	-1	-1	+1	00
Expérience 22	-1	-1	-1	-1	-1	-1	00
Expérience 23	+1	-1	+1	-1	-1	-1	00
Expérience 24	+1	-1	+1	+1	-1	+1	00
Expérience 25	+1	+1	-1	+1	-1	-1	00
Expérience 26	-1	-1	-1	+1	+1	+1	00

X1: Extrait de levure; **X2:** Saccharose; **X3:** KH₂PO₄; **X4:** K₂HPO₄; **X5:** CaCl₂; **X6:** NaCl;
Y: diamètre d'inhibition en mm.

A la lumière de ces résultats observés avec les trois germes cibles et traités avec le logiciel Minitab 16.0, les paramètres de culture significatifs influençant l'activité antimicrobienne ont été sélectionnés et retenus pour la suite de la modélisation.

- Pour l'optimisation de la production de molécules antibactériennes par la souche SA 198, dirigées contre Sa 43300 et Bs 30300, l'étude se poursuit en recherchant, la concentration

idéale du paramètre KH_2PO_4 . Toutefois en rajoutant des paramètres supplémentaires à savoir le **temps d'incubation** et le **pH**.

- Pour l'optimisation de la production de l'activité antifongique par la souche SA 198 dirigée contre UR 1829, le travail se fera en recherchant les concentrations optimales des composés (facteurs) **Saccharose** et **CaCl₂**, en rajoutant le **temps d'incubation**.

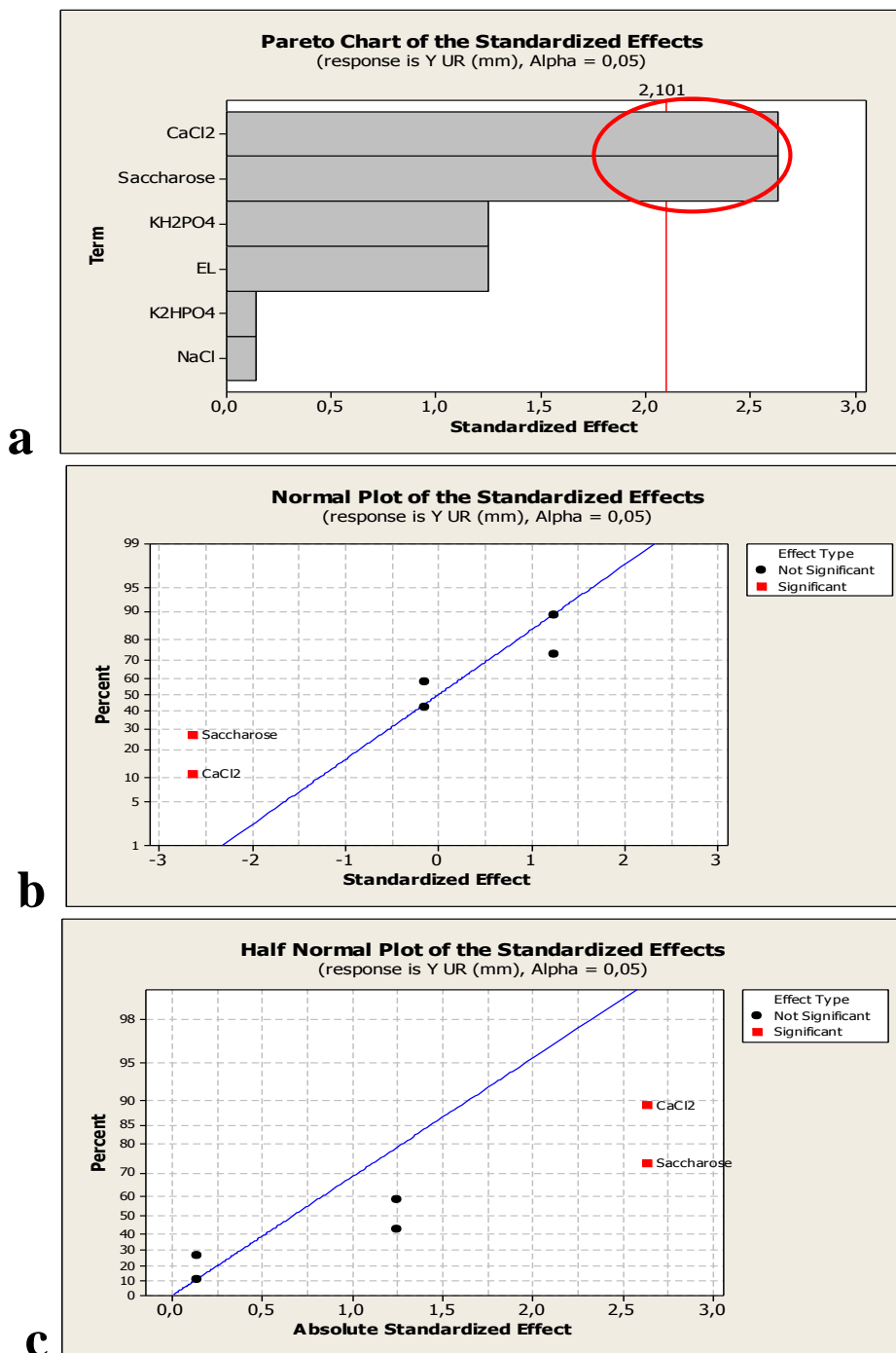


Figure 21. Effet des paramètres de culture étudiés sur milieu semi synthétique (MSS), sur l'activité antifongique de la souche SA 198 vis-à-vis d'Ur NRRL 1829.

1.2. Optimisation de la production des molécules antifongiques contre Ur 1829 sur milieu semi synthétique MSS

Les résultats de « Response Surface Methodology **RSM** » pour l'étude des trois variables significatives: **Saccharose** (X_1), **CaCl₂** (X_2), et **temps d'incubation** (X_3), sont présentés dans le tableau ci-dessous avec les valeurs obtenues ou réponses (zones d'inhibition).

La zone d'inhibition **maximale** reflétant un maximum de production de molécules antifongiques, a été observée en position 15 avec **5 g/L de saccharose, 1g/L de CaCl₂** et à **12 jours d'incubation** (Tableau 11).

Tableau 11. Modèle expérimental et résultats de la RSM pour la production d'antifongiques contre **Ur 1829** par la souche SA 198 sur le milieu semi synthétique.

Expérience	Modèle	Valeurs codes			Valeurs réelles			Y obtenue (mm) Ur
		X1	X2	X3	X1 (g/L)	X2 (g/L)	X3 (Jours)	
1	+ + 0	1	1	0	15	1,5	10	0
2	0 0 0	0	0	0	10	1	10	14
3	0 - -	0	-1	-1	10	1	8	0
4	+ 0 -	+1	0	-1	15	1	8	0
5	+ 0 +	+1	0	+1	15	1	12	0
6	+ - 0	+1	-1	0	15	0,5	10	0
7	0 + +	0	+1	+1	10	1,5	12	15
8	- - 0	-1	-1	0	5	0,5	10	8
9	0 0 0	0	0	0	10	1	10	0
10	- + 0	-1	+1	0	5	1,5	10	16
11	0 + -	0	+1	-1	10	1,5	8	14
12	- 0 -	-1	0	-1	5	1	8	14
13	0 0 0	0	0	0	10	1	10	8
14	0 - +	0	-1	+1	10	0,5	12	0
15	- 0 +	-1	0	+1	5	1	12	18

X1 : Saccharose; X2 : CaCl₂; X3: Temps d'incubation.

Afin de comprendre l'effet des variables étudiées (**Saccharose; CaCl₂ et Temps d'incubation**) sur la production des molécules antifongiques par la souche SA 198, la méthode RSM utilisée, a permis de fournir par le biais de la représentation « contour plot », les moyens de visualiser les interactions entre les variables sus citées et d'estimer ainsi le niveau optimum de chaque facteur pour obtenir la meilleure réponse possible de diamètre d'inhibition.

1.2.1. Détermination des interactions entre les variables dans le milieu de production des molécules antifongiques dirigées contre Ur 1829

Les contours plots obtenus par Minitab 16.0 montrant les interactions entre paire de facteurs permettant de déterminer la zone (plage) des meilleurs résultats entre deux variables, sont illustrés dans les figures 22, 23 et 24.

1.2.1.1. Interaction entre X1 (Saccharose) et X2 (CaCl₂)

Les interactions entre les deux variables, X1: saccharose et X2: CaCl₂ sont illustrées par le graphique contour plots (Figure 22).

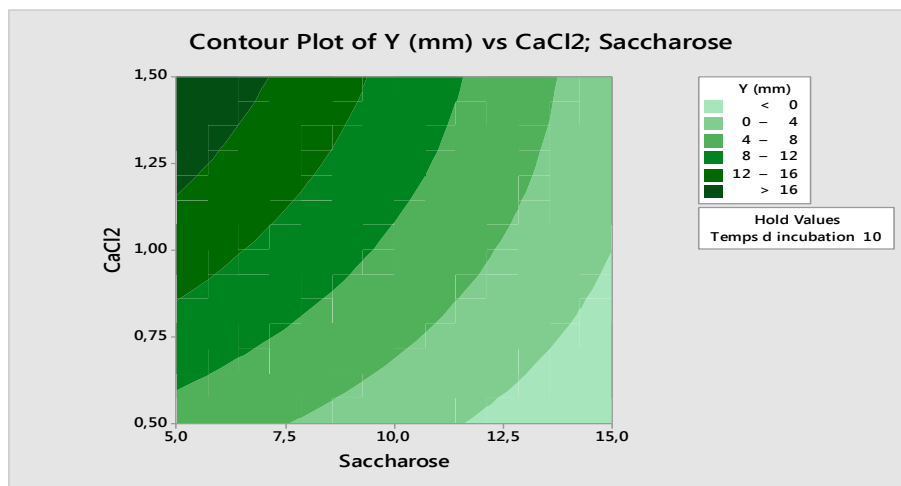


Figure 22. Contour plot définissant l'interaction entre X1: Saccharose et X2: CaCl₂ pour une valeur fixée de X3 (temps d'incubation) =10 jours.

Cette figure montre les différentes plages de production de l'activité antifongique qui se traduisent par des zones d'inhibitions. La plage **en vert clair** représente l'intervalle de concentrations entre X1 et X2 où l'on retrouve une zone d'inhibition nulle (**00 mm**) et donc aucune production d'antibiotique. Cet intervalle se situe entre (**12g –15g**) pour le **saccharose**, et entre (**0,5g - 0,9g**) pour le **CaCl₂** (**Figure 22**).

La plage **vert foncé** représente l'intervalle de concentration entre X1 et X2 où l'on retrouve la zone d'inhibition la plus importante (**>16 mm**), ce qui signifie une bonne production. Cet intervalle se situe entre (**5g – 7,4g**) pour le **saccharose** et (**1,2g -1,5g**) pour le **CaCl₂** (**Figure 22**).

1.2.1.2. Interaction entre X1 (Saccharose) et X3 (Temps d'incubation)

La plage **en bleue** représente l'intervalle de valeurs entre X1 et X3 où l'on retrouve une zone d'inhibition très petite (**4,5-7 mm**) et donc une très faible production d'antibiotique. Cet intervalle se situe entre (**10g –12,5g**) pour le **saccharose**, et entre (**8 -12 jours**) pour le **temps d'incubation** (**Figure 23**). En revanche, la plage **vert foncé** représente l'intervalle de valeurs entre X1 et X2 où l'on retrouve la zone d'inhibition la plus importante (**>14,5 mm**), ce qui signifie une bonne

production. Cet intervalle se situe entre (5g – 6,5g) pour le saccharose et (11 -12 jours) pour le temps d'incubation (Figure 23).

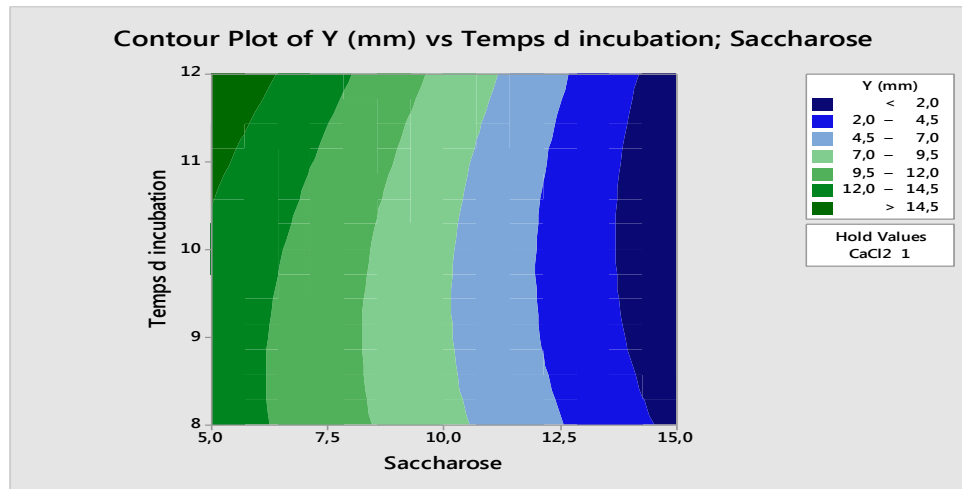


Figure 23. Contour plot définissant l'interaction entre **X1: Saccharose** et **X3: temps d'incubation** pour une valeur fixée de X2 (CaCl_2) =1 g.

1.2.1.3. Interaction entre X2 (CaCl_2) et X3 (Temps d'incubation)

La plage en **bleue** représente l'intervalle de valeurs entre X2 et X3 où l'on retrouve une zone d'inhibition très petite (4-6 mm) et donc une production d'antibiotique quasi nulle. Cet intervalle se situe entre (0,5g –0,65g) pour le CaCl_2 , et entre (8 -10,8 jours) pour le temps d'incubation (Figure 24). Par contre, la plage **vert foncé** représente l'intervalle de valeurs entre X2 et X3 où l'on retrouve la zone d'inhibition la plus importante (>12 mm), ce qui signifie une bonne production. Cet intervalle se situe entre (1,4-1,5g) pour le CaCl_2 et (11,5 -12 jours) pour le temps d'incubation (Figure 24).

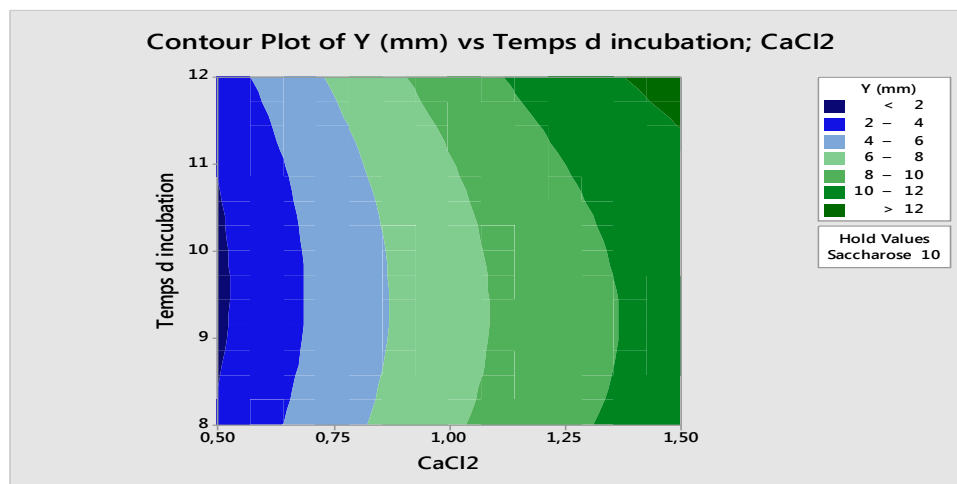


Figure 24. Contour plot définissant l'interaction entre **X2: CaCl_2** et **X3: temps d'incubation** pour une valeur fixée de X3 (Saccharose) =10g.

1.3. Optimisation de la production antibactérienne pour les germes SARM 43300 et BS 30300 sur milieu semi synthétique MSS

Pour l'optimisation par RSM via le plan Box-Behnken des trois variables: **KH₂PO₄** (X₁), **pH** (X₂) et **temps d'incubation** (X₃); les réponses sont reprises dans le **tableau 12** pour les deux bactéries testées. Ainsi en ce qui concerne aussi bien Bs 30300, que SA 43300, les réponses les plus favorables sont obtenues en position 11 avec **0,3 g/L de KH₂PO₄, un pH de 7,2 et après 8 jours** de culture (**Tableau 11**). Des valeurs d'inhibitions appréciables aussi sont enregistrées en position 1 à **0,5 g/L de KH₂PO₄, un pH de 9,2 et après 8 jours** d'incubation.

Là encore, l'effet des variables étudiées (**KH₂PO₄; pH et Temps d'incubation**) sur la production des molécules antibactériennes par la souche SA 198, a été étudié par la méthode RSM pour nous renseigner via la représentation « contour plot », sur les interactions entre les variables sus citées et de ce fait évaluer le niveau optimum de chaque facteur pour obtenir la meilleure réponse possible de diamètre d'inhibition.

Tableau 12. Modèle expérimental et résultats de la RSM pour la production de molécules bioactive contre **SARM** et **Bs** par la souche SA 198 sur le milieu semi synthétique.

Expérience	Modèle	Valeurs codes			Valeurs réelles			Y Sa obtenue (mm)	Y Bs obtenue (mm)
		X1	X2	X3	X1 (g/L)	X2	X3 (Jours)		
1	0 + -	0	1	-1	0,5	9,2	8	20	28
2	+ + 0	0	+1	+1	0,5	9,2	12	0	0
3	- - -	-1	-1	-1	0,3	5,2	10	0	20
4	0 0 -	0	0	-1	0,5	5,2	8	24	24
5	0 0 +	0	0	+1	0,5	7,2	10	0	0
6	- - +	-1	-1	+1	0,3	7,2	12	0	0
7	0 + +	0	+1	+1	0,5	7,2	10	20	16
8	0 - 0	0	-1	0	0,5	7,2	10	0	0
9	+ 0 +	+1	0	+1	0,7	7,2	12	0	0
10	+ + 0	+1	+1	0	0,7	9,2	10	20	24
11	- 0 -	-1	0	-1	0,3	7,2	8	28	30
12	+ 0 -	+1	0	-1	0,7	7,2	8	24	16
13	- + 0	-1	+1	0	0,3	9,2	10	20	20
14	+ - 0	+1	-1	0	0,7	5,2	10	20	20
15	0 - +	0	-1	+1	0,5	5,2	12	0	0

X1: KH₂PO₄; X2: pH; X3: temps d'incubation.

1.3.1. Détermination des interactions entre les variables dans le milieu de production des molécules antibactériennes dirigées contre Sa 43300 et Bs 30300

Les contours plots obtenus par Minitab 16.0 montrant les interactions par paire de facteurs permettent de déterminer la zone des meilleurs résultats entre deux variables, sont illustrés dans les figures 25, 26 et 27.

1.3.1.1. Interaction entre X1 (KH₂PO₄) et X2 (pH)

Les interactions entre les deux variables, X1: KH₂PO₄ et X2: pH et ce pour les deux germes testés SA 43300 et Bs 30300 sont illustrées par le graphique contour plots, figures 25a et 25b respectivement.

La plage en vert clair (Figure 25a) représente l'intervalle de valeurs entre X1 et X2 où l'on retrouve une zone d'inhibition très petite contre Sa 43300 seulement (6-9 mm) et donc une très faible production d'antibiotique. Cet intervalle se situe entre (0,43g -0,53g) pour le KH₂PO₄, et entre (5,2 -7) pour le pH (Figure 25a).

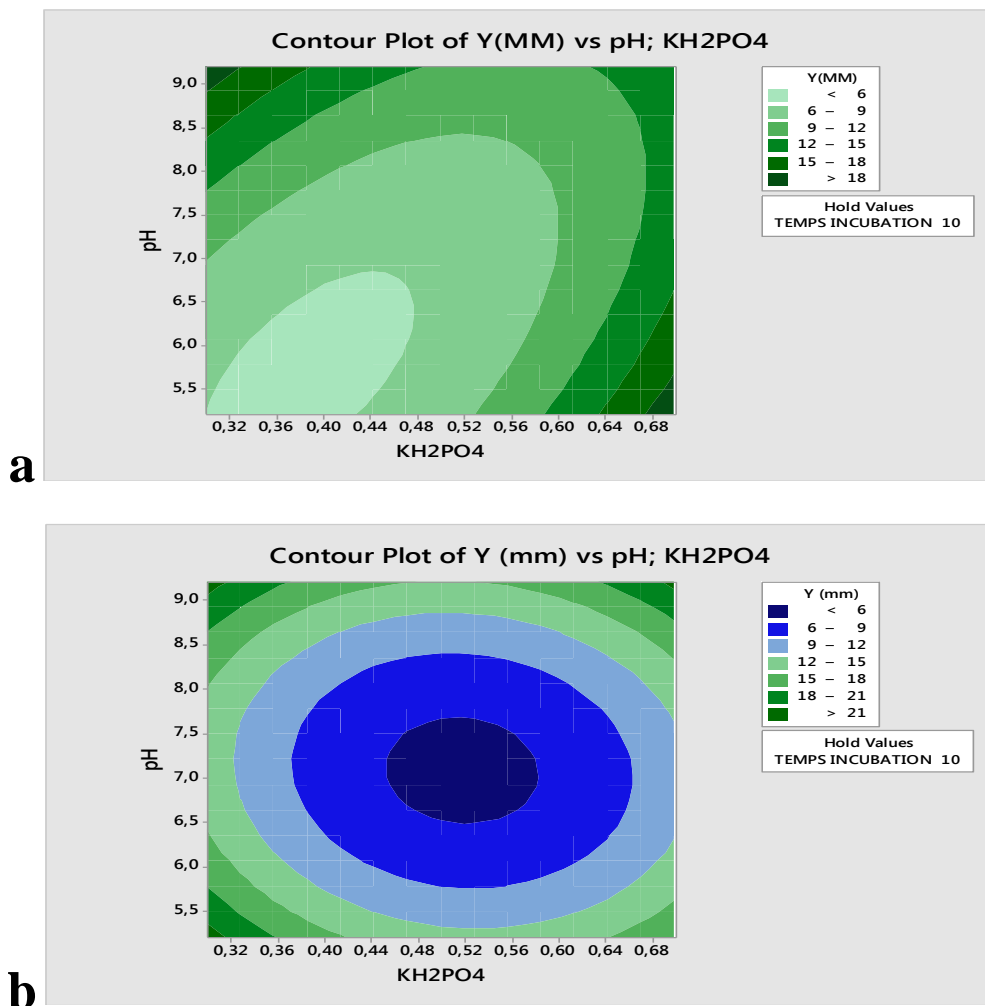


Figure 25. Contour plot définissant l'interaction entre X1: KH₂PO₄; et X2: pH pour une valeur fixée de X3 (temps d'incubation) =10 jours. a: Sa 43300; b: Bs 30300.

En ce qui concerne l'activité contre Bs 30300 (**Figure 25b**), la plage **en bleu** représente l'intervalle de valeurs entre X1 et X2 où l'on retrouve une zone d'inhibition très petite (**6-9 mm**). Cet intervalle se situe entre (**0,42g -0,65g**) pour le **KH₂PO₄**, et entre (**5,8 -8,2**) pour le **pH** (**Figure 25b**). Par contre, pour une zone d'inhibition plus importante (**>18 mm**) et ce pour les deux bactéries Sa et Bs, la plage **vert foncé** (**Figure 25**) donne des intervalles de valeurs se situant entre (**0,3g-0,33g**) pour le **KH₂PO₄** dans le cas de Sa et entre (**0,3g-0,32g**) de **KH₂PO₄** dans le cas de Bs. Pour cette même activité importante (**>18 mm**), des intervalles de **pH** de (**8,9 -9,2**) pour le **Sa** (**Figure 25a**) et de (**9,1 -9,2**) pour Bs (**Figure 25b**).

1.3.1.2. Interaction entre X1 (KH₂PO₄) et X3 (Temps d'incubation)

Les interactions entre les deux variables, X1: **KH₂PO₄** et X3: **Temps d'incubation**, pour les deux germes testés SA 43300 et Bs 30300 sont illustrées par le graphique contour plots, **figures 26a et 26b** respectivement.

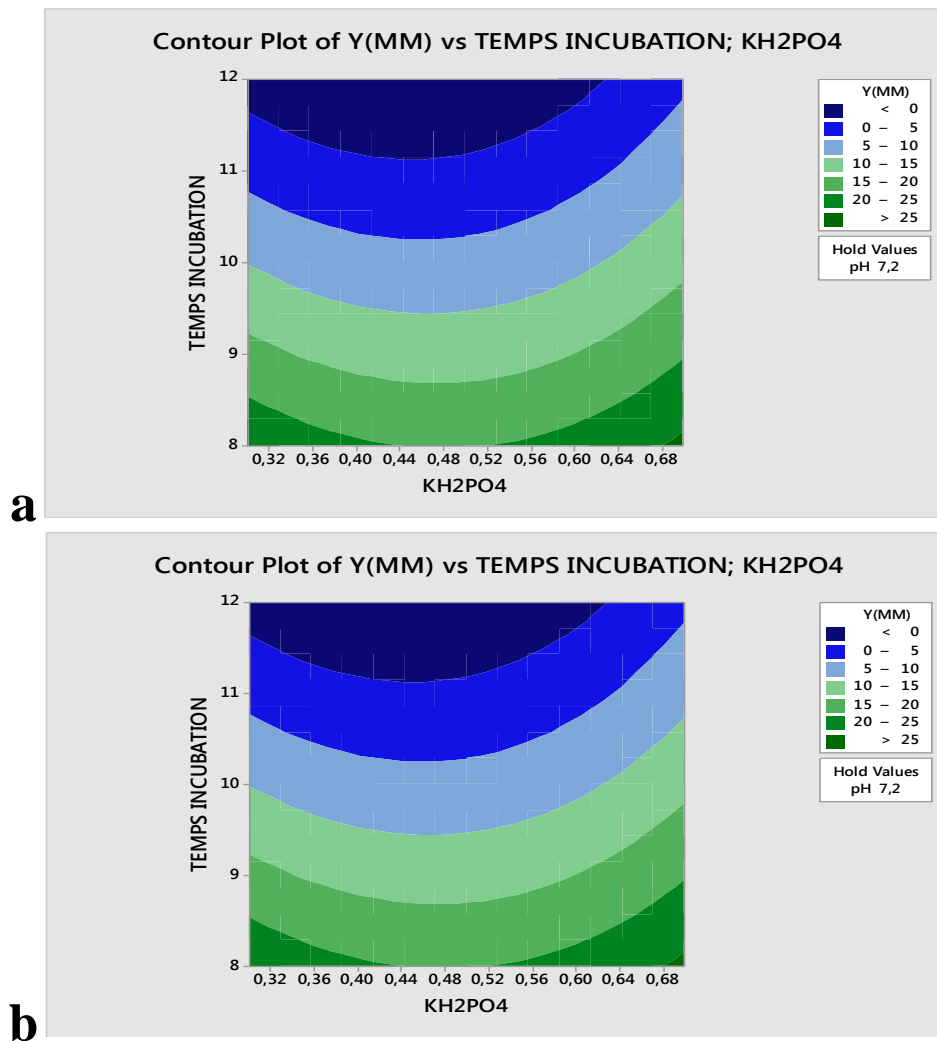


Figure 26. Contour plot définissant l'interaction entre **X1: KH₂PO₄** et **X3: temps d'incubation** pour une valeur fixée de X2 (pH) =7,2. **a: Sa 43300; b: Bs 30300.**

Les plages **en bleu** (Figure 26a) représentent l'intervalle de valeurs entre X1 et X2 où l'on retrouve une zone d'inhibition très petite voire nulle contre Sa 43300 (< 10 mm) et donc une très faible production d'antibiotique. Cet intervalle se situe entre (0,5g –0,7g) pour le KH_2PO_4 , et entre (10 - 12 jours) pour le Temps d'incubation (Figure 26a).

En ce qui concerne l'activité contre Bs 30300 (Figure 26b), les plages **en bleu** représentent l'intervalle de valeurs entre X1 et X2 où l'on retrouve une zone d'inhibition très petite voire nulle (<10 mm). Et comme dans le cas du germe Sa, cet intervalle se situe entre (0,5g –0,7g) pour le KH_2PO_4 , et entre (10,5 -12 jours) pour le Temps d'incubation (Figure 26b).

Par contre, pour une zone d'inhibition plus importante (>25 mm) et ce pour les deux bactéries SA et BS, la plage **vert foncé** (Figure 26) donne des intervalles de valeurs se situant entre (0,3g-0,41g) pour le KH_2PO_4 dans le cas de Sa et entre (0,3g-0,34g) de KH_2PO_4 dans le cas de Bs. Pour cette même activité importante (>25 mm), des intervalles de Temps d'incubation de (8 à 8,5 jours) pour le Sa et pour Bs (Figure 26).

1.3.1.3. Interaction entre X2 (pH) et X3 (Temps d'incubation)

Les interactions entre les deux variables, X2: pH et X3: Temps d'incubation, pour les deux germes testés SA 43300 et Bs 30300 sont illustrées par le graphique contour plots, figures 27a et 27b respectivement.

La plage **en vert clair** (Figure 27a) représente l'intervalle de valeurs entre X2 et X3 où l'on retrouve une zone d'inhibition faible, voire nulle contre Sa 43300 (0-5 mm). Cet intervalle se situe entre (5,5-8,5) de pH, et entre (9,8 -12 jours) de temps d'incubation (Figure 27a).

Pour l'activité dirigée contre Bs 30300 (Figure 27b), les plages allant du **bleu clair au bleu foncé** représente l'intervalle de valeurs entre X1 et X2 où l'on retrouve une zone d'inhibition très petite (<10 mm). Cet intervalle se situe entre (5,5 –8,5g) pour le pH, et entre (10,5-12 jours) pour le temps d'incubation (Figure 27b).

Par contre, pour une zone d'inhibition plus importante (>20 mm) et ce pour les deux bactéries SA et BS, les plages **en vert foncé** (Figure 27) donnent des intervalles de valeurs se situant entre (7,8-9,2) pour le pH dans le cas de Sa et entre (8,9-9,2) de pH dans le cas de Bs. Pour cette même activité importante (>20 mm), des intervalles de temps d'incubation de (8 à 8,4 jours) pour le Sa et de (8 à 8,2 jours) pour Bs (Figure 27).

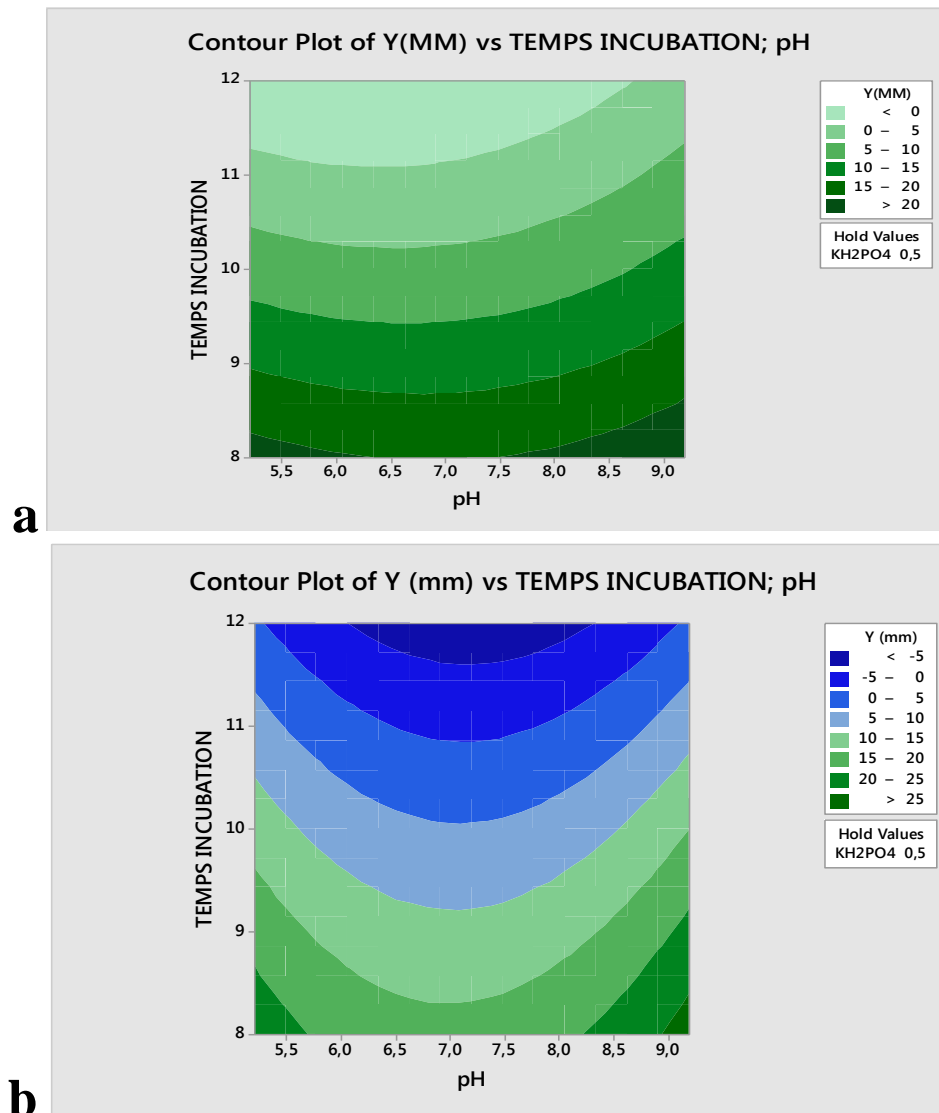


Figure 27.Contour plot définissant l’interaction entre **X2: pH** et **X3: temps d’incubation** pour une valeur fixée de **X1 (KH₂PO₄) =0,5**. **a: Sa 43300**; **b: Bs 30300**.

1.4. Rendement de la production

L’optimisation de la production d’antibiotique par la souche SA 198, en évaluant l’influence de chaque paramètre sur l’activité étudiée d’une part et les effets des interactions par paire de facteur d’autre part réalisée par la RSM a permis d’obtenir ou de déduire les concentrations optimales de chaque facteur (variable). Ainsi, pour chacun des deux milieux optimisés, à savoir celui consacré à la production des molécules antifongiques dirigées contre **Ur 1829** et le deuxième milieu de production des molécules antibactériennes **dirigées contre Sa 43300 et Bs 30300**, les valeurs optimales sont données dans les **tableaux 13 et 14** et extraites des graphes illustrées sur les **figures 28 et 29**.

Tableau 13. Valeurs optimales dans le milieu semisynthétique des facteurs influençant la production des molécules antifongiques dirigées contre Ur 1829.

Variable	Valeur optimale
X1 : Saccharose	5g
X2 : CaCl₂	1,5g
X3 : Temps d'incubation	12 jours

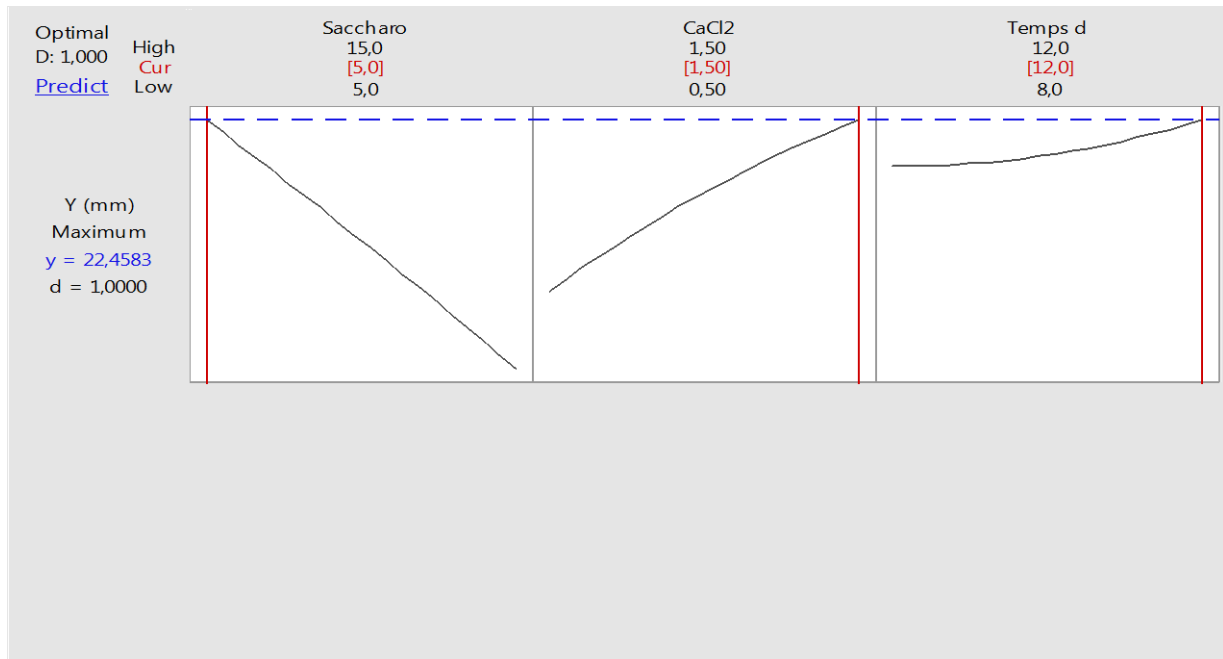


Figure 28. Valeurs optimales des variables dans le milieu semisynthétique, pour une meilleure activité antifongique de la souche SA 198 contre Ur 1829.

Tableau 14. Valeurs optimales dans le milieu semisynthétique des facteurs influençant la production des molécules antibactériennes dirigées contre Sa 43300 et Bs 30300.

Variable	Valeur optimale
X1 : KH₂PO₄	0,3g
X2 : pH	8
X3 : Temps d'incubation	8 jours

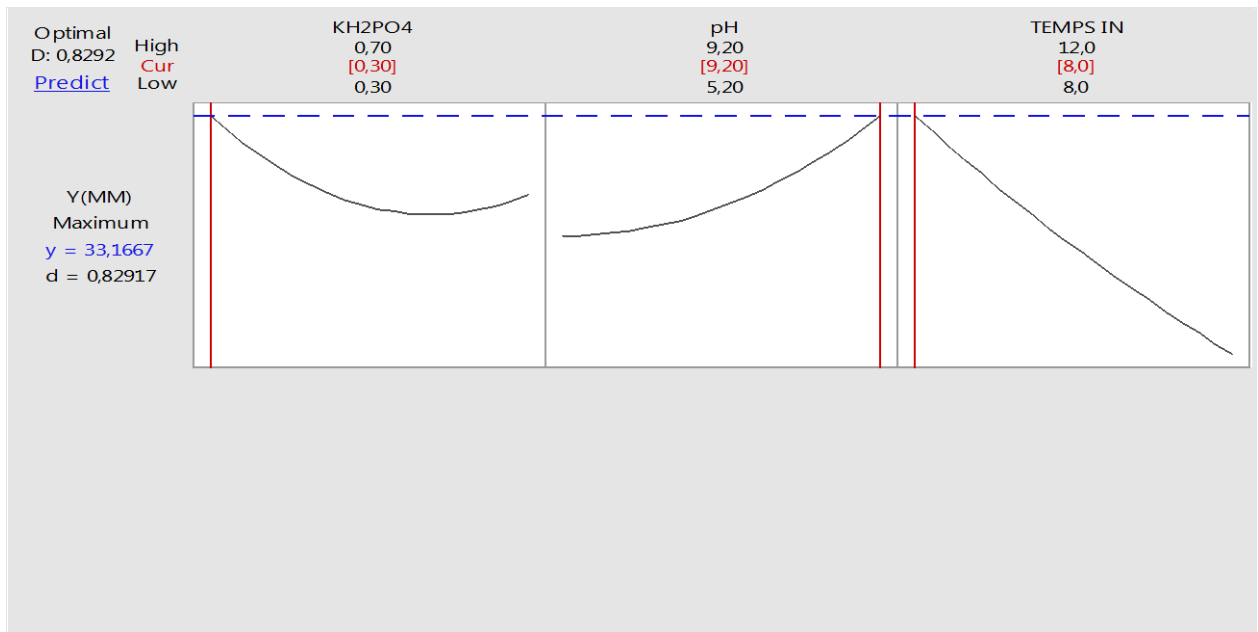


Figure 29. Valeurs optimales des variables dans le milieu semisynthétique, pour une meilleure activité antibactérienne de la souche SA 198 contre Sa 43300 et Bs 30300.

1.5. Confirmation du model obtenu

Afin de vérifier la validité du modèle et ainsi confirmer les conditions optimales obtenues dans chaque milieu semi synthétique à savoir, pour le milieu de production de SA 198 des molécules antifongiques (**X1=5g/L, X2=1,5g/L, X3=12 jours**), pour le milieu de production de SA 198 des biomolécules antibactériennes (**X1=0,3g/L, X2=8, X3=8 jours**). Ces deux milieux ont été préparés puis testés contre les germes cibles correspondants.

- **Milieu de production de l'activité de SA 198 contre Ur 1829**

Dans le milieu de production de SA 198 des molécules antifongiques, une activité antibiotique de 25 mm a été obtenue. Cette valeur expérimentale est proche de la valeur théorique ou prédite de **22,46 mm (Figure 28)** confirmant ainsi le modèle réalisé au cours de cette optimisation comme le montre le **tableau 15**.

Tableau 15. Vérification expérimentale de l'effet combiné des conditions optimisées sur la réponse de l'activité antifongique.

Variables codantes			Activité antibiotique Y (mm)		
X1 (Saccharose)	X2 (CaCl ₂)	X3 (Temps d'incubation)	Avant optimisation	Prédite	Expérimentale
5g/L	1,5g/L	12 jours	20	22,46	25

• **Milieu de production de l'activité de SA 198 contre Sa 43300 et Bs 30300**

Dans le milieu de production de SA 198 des molécules antibactériennes, une activité antibiotique de 33 mm a été obtenue contre SA 43300 et 30 mm contre Bs 30300 (**Figure 30**). Cette valeur expérimentale est proche de la valeur théorique ou prédite de **33 mm** (**Figure 29**) confirmant ainsi le modèle réalisé au cours de cette optimisation comme le montre le **tableau 16**.

Tableau 16. Vérification expérimentale de l'effet combiné des conditions optimisées sur la réponse de l'activité antibactérienne.

Variables codantes			Activité antibiotique Y (mm)		
X1 (KH ₂ PO ₄)	X2 (pH)	X3 (Temps incubation)	Avant optimisation	Prédite	Expérimentale
0,3 g/L	8	8 jours	SA	20	33
			Bs	30	33

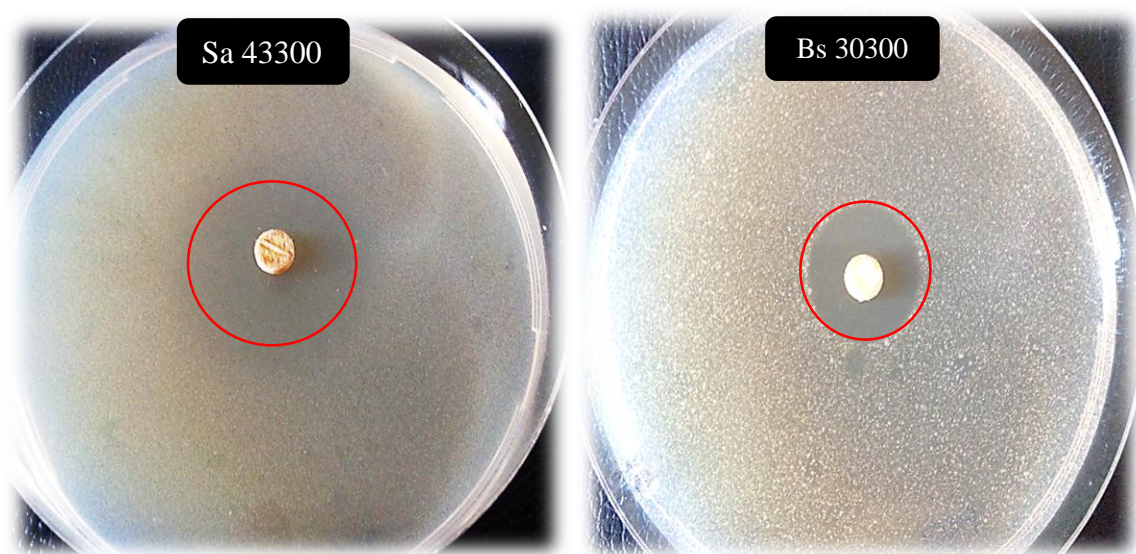


Figure 30. Les activités antibactériennes de la souche SA 198 de test de confirmation contre Sa 43300 et Bs 30300 par antibiographie.

2. Discussion

Durant les étapes d'optimisation, les sources nutritives sélectionnées ont joué un rôle important dans la production de l'activité antimicrobienne. En effet plusieurs études le montrent; ce rôle influe dans le déclenchement et l'intensité de la production des métabolites secondaires, limiter l'approvisionnement en aliment essentiel est l'un des moyens permettant de limiter la croissance du microorganisme, et peut avoir des effets sur la production de métabolites (Doull et Vining, 1990; Elibol, 2004).

Les concentrations optimales montrent que, pour améliorer la production d'antifongiques synthétisés par la souche SA 198, la concentration en source de carbone doit être inférieure à la concentration moyenne (5g/l au lieu de 10g/l). Zitouni (2005) avait constaté lors de ses travaux sur la souche SA 103 de *Saccharothrix*, que le rapport activité/biomasse était nettement plus élevé en présence de saccharose à 5 g/l mieux qu'à 10 g/l, en raison de la faible biomasse obtenue après consommation de ce sucre, aussi avait il conclut que le doublement de la concentration de la source de carbone provoquait la diminution des activités.

La concentration en CaCl_2 permettant l'amélioration de la production d'antifongique doit être supérieure à la valeur moyenne (1,5 g/l au lieu de 1g/l). Li *et al.* (2016) rapportent que le potentiel de production de streptochlorine par une souche de *Streptomyces* est maximale avec 2,5 g/L de CaCl_2 . Cependant le temps d'incubation exerce un effet positif sur l'activité antifongique, en effet, l'augmentation du temps de sa valeur minimale (8 jours) à sa valeur maximale (12 jours) fait augmenter la production de molécules bioactives alors que les valeurs d'activité sont très faibles à moins de 10 jours de fermentation.

Pour la production de l'activité antibactérienne, la concentration optimale de KH_2PO_4 a été diminuée de 0,5g/L à 0,3g/L, ce qui n'était pas le cas pour Al-Sarrani *al.* (2005), où la concentration en KH_2PO_4 fut plutôt augmentée, afin d'optimiser le potentiel antimicrobien d'une souche de champignon. Toutefois le temps d'incubation a été diminué de 10 à 8 jours pour la production de molécules bioactives.

Enfin, pour le pH, Fang *et al.* (2010) ont trouvé qu'il fallait revoir la valeur du pH initial à la hausse dans le milieu de production d'un antibiotique produit par une souche de *Xenorhabdus nematophila*. Ce qui était aussi notre cas où la production de l'activité antimicrobienne nécessitait de porter le pH initial vers des valeurs basiques.

Au cours de ce travail, nous nous sommes proposé de sélectionner un milieu de base permettant d'obtenir les meilleures activités antagonistes dirigées contre deux bactéries et un champignon, aussi de détecter les facteurs nutritionnels influençant la production d'antibiotiques par la souche SA198 de *Saccharothrix tamanrassetensis*, enfin d'optimiser la production des molécules bioactives par le biais des méthodes statistiques.

Dans la première partie du travail, nous avons déterminé l'activité antimicrobienne de la souche SA 198 sur milieu solide. Les résultats de ce test ont montré que la souche SA 198 présentait de bonnes activités antimicrobiennes, ce qui permis de sélectionner, deux souches de bactéries et une souche de champignon parmi les plus sensibles comme germes cibles pour la suite de notre étude. Afin de confirmer ces résultats, un autre test d'antagonisme sur milieu solide est réalisé sur les trois germes cibles, par la méthode des cylindres d'agar.

Suite à cela, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'influence des sources d'azote et de carbone sur la production des antibiotiques par la souche SA 198 à travers des cinétiques. Pour cela, deux cinétiques de production, de croissance et de pH, sont réalisées dans le but, est de rechercher un milieu de culture favorable à la production d'antibiotiques.

Dans la première cinétique, nous avons testé quatre sources d'azote dans un milieu synthétique (MS) contenant le glucose comme source de carbone. Les résultats, consacre l'extrait de levure meilleure source par rapport aux autres sources testées, nous l'avons donc retenu comme source d'azote pour la suite de notre étude.

Dans la seconde cinétique, nous avons étudié l'effet de quatre sources de carbone sur la production des antibiotiques dans le milieu MS additionné d'extrait de levure comme source d'azote. La meilleure source de carbone s'est avérée être le saccharose.

Pour les cinétiques, les activités antibiotiques ont été mesurées par la méthode de diffusion des puits. Les activités maximales des deux cinétiques sont notées au 10^{ème} jour de fermentation et qui correspond au jour optimal de la production. Le même jour, une extraction des antibiotiques à partir des filtrats de culture est réalisée. Les extraits obtenus sont concentrés et analysés par antibiographie ceci, pour mesurer l'activité antibiotique produite.

Une comparaison entre les résultats obtenus par la méthode des puits et celles obtenue par disques de papier a été ensuite réalisée.

Dans la deuxième partie du travail, une optimisation de la production des molécules bioactives de la souche SA 198 a été menée. Cette optimisation a été conduite sur le milieu MSS à base d'extrait de levure et de saccharose, et réalisée en utilisant le plan de Plackett et Burman qui a permis de sélectionner les facteurs significatifs agissant sur l'activité antimicrobienne, suivi d'une optimisation statistique via « Response Surface Methodology ».

Les résultats du test de PB ont permis d'identifier le KH_2PO_4 comme le seul facteur significatif influençant la production antibactérienne (contre SARM ATCC 43300, Bs ATCC 30300), et le CaCl_2 et le saccharose comme étant les facteurs influençant la production antifongique. Après l'optimisation par RSM, les concentrations optimales des paramètres significatifs ont été déterminées par germe cible; ainsi pour le milieu de production de l'activité antifongique: **Saccharose- 5g/l, CaCl_2 -1,5 g/l, temps d'incubation-12 jours**, MgSO_4 (7 H_2O) 0,2 g ; KH_2PO_4 0,5 g ; K_2HPO_4 1 g ; NaCl 2 g ; FeSO_4 (7 H_2O) 0,01 g ; eau distillée q.s.p. 1000 ml, $\text{pH} \approx 7,2$.

Pour le milieu de production de l'activité antibactérienne: **KH_2PO_4 -0,3g/L, pH -9,2, temps d'incubation-8 jours**; Saccharose-10 g/l ; CaCl_2 -1 g/l ; MgSO_4 (7 H_2O) 0,2 g ; K_2HPO_4 1 g ; NaCl 2 g ; FeSO_4 (7 H_2O) 0,01 g ; eau distillée q.s.p. 1000 ml. Des expériences de validation ont été également effectuées pour vérifier le modèle expérimental, et les résultats ont montrés que les valeurs d'inhibitions observées sont en accord avec celles prédites par le logiciel.

Ce travail n'est qu'une étude préliminaire sur la production des antibiotiques à activité antimicrobienne par la souche SA 198 et aussi sur l'optimisation via RSM de cette synthèse. Cependant les perspectives qui en découlent, sont nombreuses :

- Tester différentes concentrations de Corn Steep Liquor, étant donné son faible coût et ses résultats appréciables.
- Tester des sources nutritionnelles moins onéreuses, telles que les déchets de l'industrie agro-alimentaire (mélasses, farine de poisson, tourteaux de soja, son de blé...).
- Réaliser des cultures de production, extraire les antibiotiques et injecter les extraits en HPLC, afin de voir les profils obtenus, puis récolter et tester les pics intéressants, et enfin les caractériser d'un point de vue chimique.
- Optimiser d'autres paramètres culturels à savoir: la quantité de l'inoculum, l'agitation, la température et les oligoéléments.

I. LES ACTINOBACTERIES

1. Définition

Les actinobactéries sont des microorganismes procaryotes appartenant au phylum des *Actinobacteria*. Ce phylum regroupe des bactéries à Gram positif qui tendent à former des filaments ramifiés pouvant être assez développés pour former un véritable mycélium. Le diamètre de ces filaments varie entre 0,5 et 2 μm . Chez les actinobactéries, le pourcentage en « Guanine+Cytosine » est supérieur à 55 (Manuel de Bergey 2012).

2. Ecologie des actinobactéries

Grâce à leur grande capacité d'adaptation aux différentes conditions environnementales et à leur grande variabilité métabolique, les actinobactéries sont universellement répandues dans presque tous les écosystèmes, avec une certaine préférence pour le sol qui demeure le réservoir le plus riche (Lechevalier, 1981; Goodfellow et Williams, 1983). Ces microorganismes représentent 80% de la microflore tellurique (Singh *et al.*, 2006). Le genre *Streptomyces* représente souvent plus de 80% des actinobactéries du sol et de divers autres substrats (Sabaou *et al.*, 1998). Par ailleurs, les genres *Actinoplanes* et *Micromonospora* sont les plus répandus dans les milieux aquatiques (Goodfellow *et al.*, 2012). Les sols sahariens d'Algérie ont montré une grande diversité en genres d'actinobactéries des plus abondantes aux plus rares, voire même très rares dans le monde, tels que *Planomonospora*, *Streptosporangium*, *Actinomadura*, *Nocardioides*, *Saccharothrix*, *Saccharomonospora*, *Thermomonospora*, *Actinopolyspora*, etc. Cependant, le genre *Streptomyces* reste prédominant (Boudjella, 1994; Sabaou *et al.*, 1998; Zitouni *et al.*, 2005; Meklat, 2012).

Les actinobactéries sont en majorité saprophytes, mais certaines sont pathogènes pour l'homme (*Mycobacterium tuberculosis*, *Nocardia asteroides*), les plantes (*Streptomyces scabies*) ou les animaux (*Actinomyces bovis*) (Goodfellow et Williams, 1983; Peltola *et al.*, 2001).

3. Intérêt des actinobactéries

3.1. Dans le domaine pharmaceutique et médical

Les actinobactéries sont les plus prolifiques de tous les micro-organismes en tant que producteurs d'antibiotiques et de nombreux autres composés (vasodilatateurs, inhibiteurs d'enzymes, hormones, analgésiques, immunostimulants, immunosuppresseurs, antitumoraux, etc.) (Chang *et al.*, 2011; Solecka *et al.*, 2012; Saurav et Kannabiran, 2012; Karthik *et al.*, 2013). Parmi les espèces d'actinobactéries, celles appartenant au genre *Streptomyces* prédominent dans la

production des antibiotiques et autres métabolites secondaires (Lam *et al.*, 2007). Comme le montre le **tableau 1** qui reprend quelques exemples d'espèces d'Actinobactéries et ce qu'elles produisent.

Tableau 1. Exemples de molécules bioactives produites par les *Streptomyces*.

Antibiotique	Activité	Streptomycète producteur	Références
Streptomycine	Antibactérien	<i>S. griseus</i>	Aung, 1997.
Nystatine	Antifongique	<i>S. noursei</i>	
Néomycine	Antibactérien	<i>S. fradiae</i>	
Antimycine A	Antifongique	<i>S. antibioticus</i>	
Tunicamycine	Antiviraux	<i>S. chartreusis</i>	Larpen et larpen gaurgaud, 1997.
Actinomycine	Anticancéreux	<i>S. antibioticus</i>	
Mitomycine C	Immunosuppresseurs	<i>S. caespitosus</i>	
Avermectine	Insecticides	<i>S. avermitilis</i>	
Hygromycine B	Antiparasitaires	<i>S. hygrosopicus</i>	
Phosphonothricine	Herbicides	<i>S. viridochromogenes</i>	
Acide clavulanique	Inhibiteur enzymatique	<i>S. clavuligerus</i>	Birnbaum <i>et al.</i> , 1978.
Spiramycine	Antibactérien	<i>S. ambofaciens</i>	Colombié, 2005.
1-Nonadécène	Antibactériens et antifongiques	<i>Streptomyces</i> sp. TN256	Smaoui <i>et al.</i> , 2011.
3-ethyl,3-methylheptane	Antibactériens	<i>Streptomyces</i> sp.	Nandhini et Selvan, 2013.
Streptophénazine	Antibactériens et anticancéreux	<i>Streptomyces</i> sp. BCC21835	Bunbamrung <i>et al.</i> , 2014.
1, 2- benzene dicarboxylic acid, mono 2- ethylhexyl ester (DMEHE)	Anticancéreux	<i>Streptomyces</i> sp. VITSJK8	Krishnan <i>et al.</i> , 2014.
Quercetin-3-O-β-Lrhamnopyranosyl-(1→6)-β-Dglucopyranoside	Anticancéreux	<i>Streptomyces</i> sp. (ERINLG-4)	Balachandran <i>et al.</i> , 2014.
Validamycine A	Antifongique	<i>S. hygrosopicus</i>	Zhou Zhong, 2015.

3.2. Dans le domaine agronomique

Les actinobactéries jouent un rôle très important dans la décomposition des substances organiques non dégradables par les autres microorganismes (comme les polymères complexes, les polysaccharides et la chitine) et donc dans la fertilité des sols (Lechevalier, 1981; Goodfellow et Williams, 1983). De plus, les actinobactéries du genre *Frankia* vivent en association avec de

nombreux plantes, tels que les aulnes, sur les racines desquels ils forment des nodules où l'azote gazeux est fixé (Becking, 1974; Lechevalier, 1981).

Actuellement, plusieurs actinobactéries sont utilisées dans la lutte biologique des maladies des plantes et cela en raison de leurs propriétés antagonistes et leurs capacité de promouvoir la croissance des plantes à travers différents mécanismes (Sadeghi *et al.*, 2009; Pliego *et al.*, 2011). Les expériences menées par Merrouche (2000), Meklat (2004) et Muzammil (2012) ont permis d'évaluer les propriétés bioactives de *Saccharothrix algeriensis* contre les champignons phytopathogènes *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* et *F. o. f. sp. Lini* et son impact très intéressant sur la réduction des maladies des plantes dues à ces champignons.

Toumatia (2015) a montré que certaines espèces du genre *Streptomyces* présente un effet PGPR (*Plant Growth-Promoting Rhizobacteria* ou *rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes*) (Kloepper et Schroth, 1978) sur les plantes de blé. Cette stimulation s'est traduite par une meilleure croissance racinaire, une meilleure genèse des feuilles et des taux de germination importants par la production de phytohormones et la solubilisation des phosphates inorganiques. Ainsi l'efficacité de ces espèces contre les maladies causées par des agents phytopathogènes comme *Fusarium culmorum*, *F. oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*, *F. oxysporum* f. sp. *lini*, *Botrytis cinerea*, etc.

3.2. Dans divers autres domaines

Les actinobactéries participent à la dégradation des hydrocarbures et dans la minéralisation du phénol et des déchets industriels (Essien et Udosen, 2000). Les enzymes sont, après les antibiotiques, les produits les plus importants sécrétés par les actinomycètes. Certaines sont utilisées dans l'industrie agroalimentaire (glucose isomérase) et dans celle des détergents (protéases) (Moreira *et al.*, 2002). Certaines espèces d'actinobactéries sont capables de dégrader les mycotoxines et de réduire leur teneur dans les produits alimentaires (Verheecke *et al.*, 2014; Holzapfel *et al.*, 2002).

II. LES ANTIBIOTIQUES

1. Définition

Les antibiotiques sont des métabolites secondaires (appelés aussi idiolites), de nature organiques, synthétisées par des microorganismes ou obtenus par synthèse ou héli-synthèse

chimique, qui en solution, à faible concentration inhibent ou détruisent d'autres microorganismes (Bugnicourt, 1995).

2. Résistance aux antibiotiques

Pour assurer son efficacité, l'antibiotique doit parvenir au contact de la bactérie, puis pénétrer dans la cellule afin de se fixer à une cible et perturber le fonctionnement du microorganisme, sans être détruit ni modifié. Si l'antibiotique n'arrive pas à pénétrer dans la bactérie ou à se fixer sur une cible, il devient inefficace, et dans ce cas le phénomène est appelé la résistance. Ainsi il existe de nombreux microorganismes pathogènes qui développent des résistances multiples aux antibiotiques.

Dans le cas des bactéries, elles se défendent contre l'action des antibiotiques en utilisant plusieurs mécanismes :

- Réduction de la perméabilité cellulaire aux ATB.
- Inactivation de l'ATB par des enzymes.
- Modification de la cible d'ATB.

Ces résistances peuvent être naturelles ou acquises suite à des modifications de l'équipement génétique (chromosomique ou plasmidique) telle que les mutations spontanées, ou échange par conjugaison d'un plasmide ou d'un transposon (Davies et Mazel 1997; Joffin et Leyral, 2006).

3. Recherche de nouvelles molécules antibiotiques

La surconsommation des antibiotiques aussi bien en santé humaine que sur le plan de l'élevage agricole a inévitablement entraîné l'apparition de souches microbiennes de plus en plus résistantes à ces molécules (Norrby *et al.*, 2005). Ce phénomène de résistance ne cesse de s'accroître et est devenu une préoccupation importante de l'humanité, ce qui justifie un besoin constant en nouvelles molécules antibiotiques, qui sont obtenues à partir des organismes vivants ou par synthèse chimique.

3.1. Actinobactéries productrices d'antibiotiques

Les actinobactéries constituent la principale source d'antibiotiques, avec près de 64 % des molécules d'origine microbienne (Kurtböke, 2012; Solecka *et al.*, 2012; Jose et Jebakumar, 2014). La majeure partie des antibiotiques produits industriellement (environ 90%) sont sécrétés par les actinobactéries (Hamaki *et al.*, 2005). Parmi les 8000 produits antimicrobiens décrits, le genre *Streptomyces* produit à lui seul environ 46% des antibiotiques, et il est considéré comme étant le plus grand producteur de ces molécules (Lazzarini *et al.*, 2001, in Tiwari et Gupta, 2011; Solecka *et al.*, 2012).

Il faut noter aussi qu'environ 10% des antibiotiques sont sécrétés par les souches de *Micromonospora* et de *Nocardia*, tandis que les 10% restants sont sécrétés par les genres dites peu répandus ou parfois même rares tels que *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Streptosporangium*, *Saccharopolyspora*, *Nocardiopsis*, *Saccharothrix*, etc. (Lazzarini *et al.*, 2000).

L'intérêt que suscitent les actinobactéries rares dans ce domaine est justifié par le fait que de nombreux antibiotiques intéressants ont été isolés à partir de ces genres rares ou peu fréquents (Boudjella, 1994; Sabaou *et al.*, 1998; Lazzarini *et al.*, 2001; Barakate *et al.*, 2002; Naidenova et Vladimirova, 2002; Donadio *et al.*, 2002; Moncheva *et al.*, 2002; Zitouni, 2005; Bouras, 2005; Boudjella, 2007; Genilloud *et al.*, 2011; Merrouche, 2012; Boubetra, 2013).

Parmi les molécules élaborées par les actinobactéries, 80% ont des activités biologiques diverses: antibactériennes (surtout), antivirales, antitumorales, antiprotozoaires, insecticides, etc, tandis que les 20% restantes sont des antifongiques (Sanglier *et al.*, 1993; Eckwall et Schottel, 1997).

4. Influence des conditions de culture sur la production des antibiotiques par les actinobactéries

La production des antibiotiques dépend de nombreuses conditions environnementales et nutritionnelles, dans lesquelles le microorganisme se développe. Il ne s'agit pas seulement de sélectionner une souche procédant une forte productivité, mais il est également nécessaire d'optimiser les conditions de cultures (Larpent-Gourgand et Sanglier, 1992).

4.1. Facteurs nutritionnels

La biosynthèse des antibiotiques est soumise à la nature et la concentration de certains composés dans le milieu de culture approprié. Ce dernier doit contenir quantitativement et qualitativement les aliments exigés pour favoriser la croissance de l'isolat et assurer une production maximale d'antibiotique. Parfois, le milieu de production n'est pas obligatoirement identique à celui permettant une bonne croissance des souches (Larpent et Sanglier, 1989; Gesheva *et al.*, 2005).

La production des antibiotiques est souvent contrôlée par des mécanismes dus au métabolisme des sources de carbone, d'azote et de phosphate (Shimizu, 2013).

Le carbone représente un élément structural des cellules microbiennes et aussi une source d'énergie. Le choix du carbone comme source utilisée par les microorganismes influence fortement la croissance bactérienne ainsi que la production de molécules actives (Martin et Demain, 1980; Doull et Vining, 1990; Spizek et Tichy, 1995). La source carbonée peut être soit simple (sucre, acide organique, acide aminé ou dérivé d'alcool), soit complexe, tels que les polymères et les extraits organiques (Bouras, 2005).

L'effet de la source carbonée est dépendant de la souche utilisée, de la concentration et du temps d'addition, ainsi de la composition du milieu (synthétique ou complexe) et du nombre de sources de carbone ajoutés (Bouras, 2005).

D'autre part les sources d'azote jouent un rôle très important dans la biosynthèse des antibiotiques. Par exemple les ions ammonium exercent un effet négatif sur la production d'antibiotique, ces ions inhibent dans la plus par des cas la formation des précurseurs (Omura *et al.*, 1980; Tanaka *et al.*, 1986).

Outre, le rôle important de la nature des sources d'azotes et de carbones, plusieurs travaux ont montré l'implication d'autres nutriments dans la production de biomolécules par les microorganismes. Il s'agit des éléments minéraux comme le phosphore, le magnésium et le potassium et plusieurs oligoéléments (Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo et Mn) qui sont utilisés comme cofacteurs pour la croissance des microorganismes à des concentrations très faibles (Larpen et Sanglier, 1989; Larpen-Gourgau et Sanglier, 1992; Strub, 2008).

4.2. Inoculum

Il est défini comme étant l'ensemble de la biomasse (spores, cellules, hyphes) nécessaire pour ensemercer un milieu de culture de production (Delaunay *et al.*, 2003). L'âge de l'inoculum et son importance quantitative, sont généralement les deux seuls paramètres considérés.

L'inoculum de base doit être soigneusement conservé, pur et d'excellente qualité et en quantité suffisante. Sa préparation est basée sur le prélèvement de la souche productrice à partir d'un stock et sa mise en culture en quantité suffisante à un stade optimal de développement. Cependant, la qualité de l'inoculum, définie par des propriétés physiologiques et biochimiques, reste rarement évoquée (Brown et Zainudeen, 1978; Larpen-Gourgau et Sanglier, 1992). L'étude de Smith et Calam (1980) sur la production de la pénicilline et la griséofulvine par des souches de *Penicillium* d'un point de vue morphologique a montré que les pelotes de mycélium ouvertes conduisent à de meilleures productions que les pelotes denses. Enfin, la production d'antibiotiques peut aussi être influencée par l'âge de la pré-culture (Paquet, 1990).

4.3. Les facteurs physico-chimiques

Les conditions de culture comme le pH, la température, et l'agitation influencent également la production des métabolites secondaires. Le pH est un paramètre important qui peut affecter la croissance, la morphologie des micro-organismes filamenteux ainsi que la production de métabolites secondaires. Le pH impacte notamment, la solubilité des espèces en solution, le transport intracellulaire des nutriments, les réactions enzymatiques ainsi que les phénomènes de surface en modifiant la configuration des sites actifs de la paroi cellulaire (Papagianni, 2004).

En général le pH optimal pour la croissance et la production de biomolécules est différent. Dans cette optique, ces dernières années, des stratégies de modification du pH en cours de fermentation ont été adoptées. Dans un premier temps, le pH est maintenu optimal pour la croissance (ou non contrôlé) puis la consigne est modifiée à une valeur optimale pour la production du métabolite d'intérêt (Lee et al., 2002; Mao *et al.*, 2009; Yen *et al.*, 2013). De faibles variations de pH peuvent avoir des effets marqués sur la productivité d'une souche (Asanza-Teruel *et al.*, 1997).

La température est un autre paramètre important influençant la croissance et la productivité d'une souche selon qu'il s'agit d'une souche mésophile, thermophile ou psychrophile (Larpen et Larpen-Gaugaud, 1997). Les températures optimales permettant une synthèse des antibiotiques sont généralement plus basses que celles permettant la croissance (Larpen et Sanglier, 1989). Boubetra (2013) montre d'après ces études que les souches de *Saccharothrix saharensis* et *Saccharothrix hoggarensis* possèdent une gamme assez large de température de croissance, entre 20 et 45°C avec un optimum de production à 30°C.

L'agitation agit sur la morphologie de la souche, sur la croissance et sur la production d'antibiotiques. En effet, l'agitation affecte l'aération et le mélange des éléments nutritifs dans le milieu de fermentation et ce qui provoque la production de métabolites secondaires. Les vitesses d'agitation utilisées lors des productions d'antibiotiques ne sont pas nécessairement les mêmes pour toutes les actinobactéries (Smaoui, 2010). Pfefferle (2000) a montré que la production d'antibiotiques chez le genre *Streptosporangium* était meilleure avec une agitation de type «turbine-hélice» marine. La production des antibiotiques a évolué en fonction du temps d'incubation qui est un facteur déterminant. Chez le genre *Saccharothrix*, le temps d'incubation est variable d'une espèce à une autre. Par exemple la souche *Saccharothrix algeriensis* commence la production des biomolécules (PSA, PSB et PSC2) après 2 jours d'incubation, et atteint un maximum de production après le 4^{ème} jours (Lamari *et al.*, 2002a). Cependant, la souche *Saccharothrix* sp. SA 103, produit un métabolite antibactérien actif contre *B.subtilis*, dès le premier jour d'incubation et atteint un maximum le 4^{ème} jour d'incubation (Zitouni *et al.*, 2004a).

III. LE GENRE SACCHAROTHRIX

Comme la plupart des actinobactéries, *Saccharothrix* est saprophyte, chimioorganotrophe hétérotrophe et aérobie strict. Il a été isolé à partir d'échantillons de sols recueillis dans des régions désertiques de l'Algérie (Adrar, Hoggar), mais aussi d'Australie, de l'Inde, d'Espagne, du Texas, etc. En outre, il a été isolé à partir de l'eau comme l'eau d'un lac (Labeda *et al.*, 1984;

Labeda et Lyons, 1989; Labeda et Lechevalier, 1989; Zitouni *et al.*, 2004c; Hu *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2012; Boubetra *et al.*, 2013a,c; 2014).

1. Taxonomie et caractérisation du genre *Saccharothrix*

Le genre *Saccharothrix* fut créé par Labeda *et al.* (1984) d'après la description de l'espèce type *Saccharothrix australiensis*. Ce genre est classé dans la famille des *Actinosynnemataceae*, sur la base des parentés phylogénétiques de la séquence du gène codant pour l'ARNr 16S (Labeda *et al.*, 2001). Actuellement, le genre *Saccharothrix* rassemble 17 espèces répertoriées dans le **tableau 2**.

Tableau 2. Liste des espèces répertoriées de *Saccharothrix*.

Espèces	N° d'accésion	Références
<i>S. australiensis</i>	ATCC 31497	Labeda <i>et al.</i> , 1984.
<i>S. texasensis</i>	ATCC 51593	Labeda et Lyons, 1989.
<i>S. espanaensis</i>	ATCC 51144	Labeda et Lechevalier, 1989.
<i>S. mutabilis</i> subsp. <i>mutabilis</i>	ATCC 31520	Labeda et Lechevalier, 1989.
<i>S. mutabilis</i> subsp. <i>capreolus</i>	ATCC 23892	Grund et Kroppenstedt, 1990.
<i>S. coeruleofusca</i>	ATCC 35108	Grund et Kroppenstedt, 1990.
<i>S. longispora</i>	ATCC35109	Grund et Kroppenstedt, 1990.
<i>S. syringae</i>	ATCC51364	Grund et Kroppenstedt, 1990.
<i>S. tangerinus</i>	ATCC BAA-481	Kinoshita <i>et al.</i> , 1999.
<i>S. algeriensis</i>	NRRL B-24137	Zitouni <i>et al.</i> , 2004c.
<i>S. xinjiangensis</i>	AS 4.1731	Yu-Ting Hu <i>et al.</i> , 2004.
<i>Sa. violaceirubra</i>	NBRC 102064	Otoguro <i>et al.</i> , 2009.
<i>Sa. variisporea</i>	NRRL B-16296T	Kim <i>et al.</i> , 2011.
<i>Sa. yanglingensis</i>	CGMCC 4.5627	Yan <i>et al.</i> , 2012.
<i>Sa. hoggarensis</i>	HQ 399564	Boubetra <i>et al.</i> , 2013a .
<i>Sa. saharensis</i>	FJ 379333	Boubetra <i>et al.</i> , 2013c.
<i>Sa. tamanrassetensis</i>	JN036396	Boubetra <i>et al.</i> , 2014

Morphologiquement, le genre *Saccharothrix* est caractérisé par la présence d'un mycélium aérien (MA) souvent en "zig-zag", abondant ou très peu produit selon les espèces, de longues chaînes de spores ovoïdes ou en bâtonnets (1 à 2 µm x 0,7 à 1 µm) non mobiles issues de la fragmentation anarchique des filaments du MA et une fragmentation (excessive ou rare) du mycélium du substrat en éléments coccoïdes (**Figure 1**) (Labeda et Kroppenstedt, 2000). *Saccharothrix* est caractérisé par une paroi cellulaire de type III E (présence d'acide méso-diaminopimélique), présence de deux sucres caractéristiques, le rhamnose et le galactose (dans les cellules entières) et absence d'acides

mycoliques pariétaux. Les Phospholipides sont caractérisés par la présence de phosphatidylethanolamine, d'hydroxy- phosphatidylethanolamine et de glucosamine.

Les ménaquinones (lipides membranaires) sont de type MK-9 (H4) ou MK-10(H4) (Lechevalier *et al.*, 1977; Labeda et Kroppenstedt, 2000; Labeda *et al.*, 2001). En outre, le pourcentage en G+C de genre *Saccharothrix* varie entre 67 et 76 % (Manuel de Bergey, 2012).

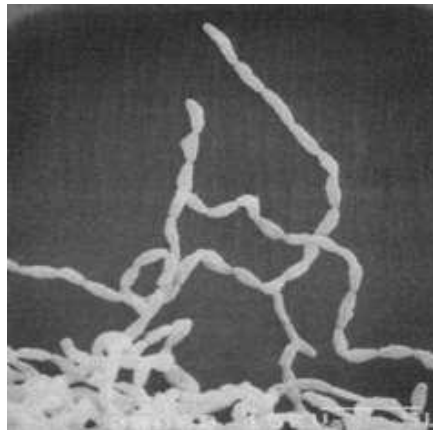


Figure 1. Micrographie en microscopie électronique à balayage du mycélium aérien de la souche *Saccharothrix* sp. SA 103 cultivée sur ISP2 pendant 10 jours à 30°C (Zitouni *et al.*, 2004a).

-Taxonomie de la souche

La souche SA 198 est la souche type de *Saccharothrix tamanrassentensis*, elle produit selon les milieux un mycélium aérien blanc jaunâtre (sur ISP2, ISP3, ISP4 et Bennett), un mycélium du substrat brun rougeâtre (sur ISP2), brun jaunâtre (sur milieu GN), brun ou jaune vif (sur milieu ISP3, TSA et Bennett), et ne produit pas de pigments solubles mais produit des pigments mélanoïdes sur le ISP7. Elle présente un mycélium aérien à filaments ramifiés qui se fragmentent totalement, et de manière anarchique (souvent en zig-zag), en de longues chaînes de spores en bâtonnets ou ovoïdes et non mobiles (**Figure 2**). Le mycélium du substrat se fragmente assez peu (Boubetra, 2013). Les études physiologiques réalisées par Boubetra (2013) ont montrés que la souche SA 198 dégrade la caséine, l'esculine et la gélatine, le tween 80 et la tyrosine. Elle utilise le fructose, le glucose, le saccharose, le cellobiose et le ribose, l'alanine et la proline, et les sels de sodium, acétate, propionate, pyruvate et succinate.

L'analyse de la séquence du gène codant pour l'ARNr 16S de la souche SA 198 a montré un niveau de similarité compris entre 97,5 et 98,9% avec les espèces du genre *Saccharothrix*, comme *Saccharothrix australiensis* (Labeda *et al.*, 1984) qui est la plus proche. Cependant, l'hybridation ADN-ADN de la souche SA 198 avec les espèces les plus proches phylogénétiquement

(*S.australiensis*, *Saccharothrix xinjiangensis*, *Saccharothrix algeriensis* et *Saccharothrix espanaensis*), a permis de confirmer son appartenance à une espèce nouvelle du genre *Saccharothrix* et a été désignée *Saccharothrix tamanrassentensis* (Boubetra *et al.*, 2015).

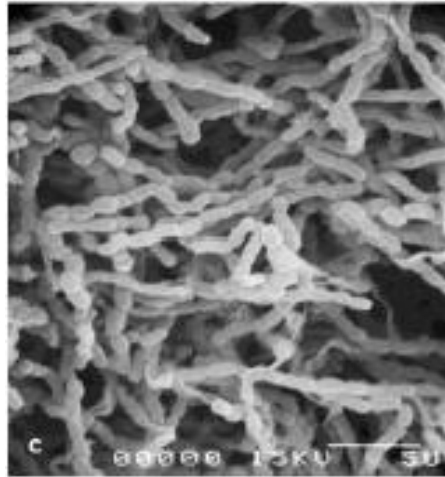


Figure 2. Micromorphologie en microscopie électronique à balayage de la souche SA 198 de *Saccharothrix tamanrassetensis* cultivée sur milieu ISP2 (Boubetra, 2013).

2. Distribution du genre *Saccharothrix*

Les *Saccharothrix* sont isolés en très petits nombres à partir de divers substrats et écosystèmes. On les retrouve dans les sols, les gisements de minéraux, les eaux usées, les eaux et les sédiments des océans, les sols sahariens, les sols salés et alcalins, etc. Le pourcentage des isolats de *Saccharothrix* par rapport au total des actinomycètes est entre 0 et 0,5% (Athalye *et al.*, 1985). Dans plusieurs échantillons de sols sahariens, ce pourcentage varie entre 8 et 15% (Sabaou *et al.*, 1998).

3. Métabolites secondaires sécrétés par les espèces de *Saccharothrix*

Le genre *Saccharothrix* sécrète plusieurs antibiotiques dont leur nature chimique est assez diversifiée (**Tableau 3**), certains sont doués d'une activité antibactérienne (Gram positif et plus rarement Gram négatif), ou encore antibactérienne et antifongique à la fois, d'autres composés présentent des activités antitumorales et herbicides.

Tableau 3. Principaux composés bioactifs sécrétés par le genre *Saccharothrix*.

Composés	Propriétés	Origine	Références
Dopsisamine	Antibactérienne, antifongique	<i>Sa.mutabilis</i> TS-1980	Takahashi <i>et al.</i> , 1986.
Kinamycines (1 et 2)	Antibactérienne, Antitumorale	<i>Saccharothrix</i> sp.MI293	Isshiki <i>et al.</i> , 1989.
Galacardines (1 et 2)	Antibactérienne	<i>Saccharothrix</i> sp. SANK 64289	Takeuchi <i>et al.</i> , 1992.
Coformycine Aristeromycin adecypenol	Herbicide	<i>Saccharothrix</i> sp	Bush <i>et al.</i> , 1993.
Phosphonothrixine	Herbicide	<i>Saccharothrix</i> sp	Takahashi <i>et al.</i> , 1995.
WS 75624 A et B	Inhibiteur d'enzyme, Convertisseur de l'endothéline	<i>Saccharothrix</i> sp	Yoshimura <i>et al.</i> , 1995.
D-acide aminé transferase	Enzyme	<i>Saccharothrix</i> sp	Watnabe <i>et al.</i> , 1997.
TMC 96	Inhibiteur de protéasome	<i>Saccharothrix</i> sp. TC1094	Koguchi <i>et al.</i> , 1999.
Pluraflavines (A, B et E)	Antitumorale	<i>Saccharothrix</i> sp. DSM 12931	Vertesty <i>et al.</i> , 2001.
Dithiolopyrrolines	Antibactérienne et antifongique	<i>Sa.algériensis</i>	Lamari <i>et al.</i> , 2002a ,b.
Autres dithiolopyrrolines	Antibiotiques	<i>Sa.algériensis</i>	Bouras <i>et al.</i> , 2006a. Bouras <i>et al.</i> , 2007. Bouras <i>et al.</i> , 2008.
Muctamycines C, CR	Antibiotique	<i>Saccharothrix</i> sp. SA103	Zitouni <i>et al.</i> , 2004 b.
Composé ZA01 et ZA02	Antibiotique	<i>Saccharothrix</i> sp. SA103	Zitouni <i>et al.</i> , 2005.
Dithiolopyrrolones	Antibactérienne et antifongique	<i>Sa. algeriensis</i>	Merrouche <i>et al.</i> , 2010. Merrouche <i>et al.</i> , 2011.
Chloramphénicol	Antibactérienne	<i>Saccharothrix</i> sp. PAL54	Aouiche <i>et al.</i> , 2011.
A4 et A5	Antibactérienne et antifongique	<i>Saccharothrix</i> sp. SA198	Boubetra <i>et al.</i> , 2013b.
Tianchimycins A et B Swalpamycin B	Antibactérienne	<i>Sa.xinjiangensis</i>	Wang <i>et al.</i> , 2013.
Hydroxyflavones	Antioxydant	<i>Sa.espanaensis</i>	Lee <i>et al.</i> , 2014.

IV. NOUVELLE APPROCHE POUR L'OPTIMISATION DES PARAMETRES DU MILIEU DE CULTURE PAR « RESPONSE SURFACE METHODOLOGY » RSM

1. Les plans d'expériences

1.1. Définition

Les plans d'expériences permettent d'organiser au mieux des essais pour obtenir des conclusions solides et adéquates de manière efficace et économique. La méthodologie des plans d'expériences se base sur le fait qu'une expérience convenablement organisée, conduira fréquemment à une analyse et à une interprétation statistique relativement simple des résultats (Karam, 2004). De manière générale, la méthode des plans d'expériences vise à déterminer et à établir les liens existants entre deux types de variables:

- **La réponse:** grandeur de sortie ou grandeur étudiée (la grandeur mesurée à chaque essai).
- **Les facteurs :** grandeurs physiques modifiables par l'expérimentateur, sensées influées sur les variations de la réponse (Goupy, 1999; Goupy, 2005).

1.2. Modélisation

La modélisation est l'objectif du plan d'expériences. Une fois que les facteurs influents sont identifiés, elle permet 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 (Box *et al.*, 1978;Goupy, 1999).

Toute réponse expérimentale peut être écrite sous la forme suivant :

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

y : réponse expérimentale

Z_k : facteurs contrôles

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 exprimée 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 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:

\mathbf{b}_0 : Terme constant de l'équation de régression, \mathbf{b}_j : Effets linéaires, \mathbf{b}_{ij} : Effets d'interactions, \mathbf{b}_j : effets quadratiques.

1.3. Plan de Plackett et Burman

Le plan de Plackett et Burman est un plan de criblage basé sur les matrices d'Hadamard. Les matrices d'Hadamard sont des matrices carrées dont les éléments sont soit -1 soit +1 et dont le nombre de lignes (ou de colonnes) est multiple de 4. Ces matrices de Plackett et Burman sont intéressantes car elles permettent d'économiser les essais par rapport aux matrices des plans factoriels. Les facteurs des plans de Plackett et Burman sont généralement des plans à 2 niveaux et il n'y a pas de point central car on ne cherche pas à modéliser les résultats (Goupy, 2005).

1.4. Optimisation de la production d'antibiotique par utilisation du modèle « Box-Behnken »

La méthode traditionnelle d'optimisation consiste à varier un facteur à la fois (One Factor At a Time OFAT). Mais cette approche est inefficace, conduisant à un nombre d'expérience très élevé, cela consomme beaucoup de temps, surtout dans la réalisation d'un criblage à partir de multiples variables. D'autre part, il est impossible de détecter s'il existe des interactions entre les variables (Messis, 2014).

Une technique alternative efficace a été adaptée pour l'optimisation statistique de la production, est la méthodologie de surface réponse (response surface methodology (RSM)), en utilisant le modèle de « Box – Behnken, 1960 » (Niladevi *et al.*, 2009; Juntao *et al.*, 2011). Cette méthode offre un dépistage rapide à partir d'un domaine expérimental large, car elle évalue les principales interactions existantes entre les facteurs, ainsi que leur effet quadratique, aussi elle permet d'optimiser les facteurs dans le but d'améliorer la production (Niladevi *et al.*, 2009). En outre ce logiciel permet de gagner du temps et des moyens considérables en réduisant le nombre d'expériences réalisables, il donne aussi des résultats plus précis que ceux obtenus par la méthode

traditionnelle et les résultats permettent une réelle augmentation de la production (Kumar *et al.*, 2012).

La "RSM" est une collection de techniques mathématiques et statistiques pour la construction des modèles statistiques afin d'optimiser la production de composés essentiels dans le domaine industriel comme les enzymes. Récemment, cette méthode a été adaptée à l'optimisation des paramètres cultureux par exemple de lipopeptides cyclique en fermentation liquide (Xianoyong *et al.*, 2010), ou encore l'optimisation de la production de xylanase (Kumar *et al.*, 2012). Cette méthode consiste aussi à optimiser des paramètres cultureux et les facteurs physiques comme la température, le pH, l'agitation et le temps d'incubation etc (Feng *et al.*, 2011), ainsi que l'optimisation de la production des antibiotiques et des antifongiques (Banga *et al.*, 2008).

-A-

Ababutain I. M., Abdul Aziz Z. K. and AL-Meshhen N. A. (2013). Optimization of environmental and nutritional conditions to improve growth and antibiotic productions by *Streptomyces* sp. Isolated from Saudi Arabia Soil. *Inter. Research J. Microbiol.* **4**, 179-187.

Al-Sarrani AQM, El-Naggar MYM. (2006). Application of Plackett-Burman factorial design to improve citrinin production in *Monascus ruber* batch cultures. *Bot Studies.* **47(2):**167-174.

Aouiche A. (2013). Taxonomie et antibiotiques de quelques souches de *Streptomyces* et de *Saccharothrix* des sols de Ghardaïa actives contre des microorganismes pathogènes et toxigène pour l'Homme. Thèse de Doctorat, Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger. 159 p.

Aouiche A., Sabaou N., Meklat A., Zitouni A., C Bijani., Mathieu F. and Lebrihi A. (2011). *Saccharothrix* sp. PAL54, a new chloramphenicol-producing bstrain isolated from a Saharan soil. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 943-951.

Arasu M.V., Rejiniemon T. S., Al-Dhabi N. A., Duraipandiyan V., Ignacimuthu S, Agastian P., Kim S., Huxley A. J., Lee K. D., Choi K. C. (2014). Nutritional requirements for the production of antimicrobial metabolites from *Streptomyces*. *African. J. Microbio.Research.*, **8**, 750-758.

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

Athalye M., Goodfellow M., Lacey J. and White R.P. (1985). Numerical classification of *Actinomadura* and *Nocardopsis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **35**, 86-98.

Aung M. (1997). Criblage de nouvelles souches d'actinomycètes productrices d'antifongiques non-polyéniques. Production, extraction, purification et caractérisation des composés antimicrobiens biosynthétisés. Thèse de Doctorat de l'INP de Lorraine, France, 261 p.

-B-

Badji B. (2006). Étude de la taxonomie et des antibiotiques antifongiques de trois souches d'actinomycètes d'origine saharienne appartenant aux genres *Actinomadura* et *Nonomuraea*. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. 226 p.

Badji B., Mostefaoui A., Sabaou N., Lebrihi A., Mathieu F., Seguin E., Tillequin F. (2007). Isolation and partial characterization of antimicrobial compounds from a new strain *Nonomuraea* sp. NM94. *J. Ind. Microbiol.*, **34**, 403- 412.

Badji B., Riba A., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N. (2005). Antifungal activity of a Saharan *Actinomadura* strain against various pathogenic and toxinogenic fungi. *J. Mycol. Méd.*, **15**, 211- 219.

Badji B., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N. (2006). Antimicrobial compounds produced by *Actinomadura* sp. AC104 isolated from an Algerian Saharan soil. *Can. J. Microbiol.*, **52**, 373-382.

- Bakour L. (2006).** Caractérisation chimique de nouvelles mutactimycines synthétisées par *Saccharothrix* sp. SA103 et influence des sources de carbone et d'azote sur la production. Mémoire de Magister en Microbiologie. Faculté des sciences de la nature et de la vie de Bejaia. 76p.
- Balachandran C., Sangeetha B., Duraipandiyar V., Karunai Raj M., Ignacimuthu S., Al-Dhabi N.A., Balakrishna K., Parthasarathy K., Arulmozhi N.M., ValanArasu M. (2014).** Aflavonoid isolated from *Streptomyces* sp. (ERINLG-4) induces apoptosis in human lung cancer A549 cells through p53 and cytochrome c release caspase-dependent pathway. *Chemico-Biological Interactions* **224**: 24–35.
- Banga J., Praveen V., Singh V., Tripathi C.K.M. and Bihari V. (2008).** Studies on medium optimization for the production of antifungal and antibacterial antibiotics from a bioactive soil actinomycete. *Med. Chem. Res.* **17**: 425-436.
- Barakate M., Ouhdouch Y. Oufdou K., Beaulieu C. (2002).** Characterization of rhizospheric soil streptomycetes from Moroccan habitats and their antimicrobial activities. *World J. of Microbiol. & Biotechnol.*, **18**, 49-54.
- Bastide A., De Méo M., Andriantsoa M., Laget M. and Duménil G. (1986).** Isolement et sélection de souches d'actinomycète productrices de substances antifongiques de structure non-polyéniques. *Mircen. J.* **2**, 453-466.
- Becking J.H. (1974).** Family III. *Frankiaceae*. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th Eds. Buchanan R.E. and Gibbons N.E. (Eds.). Williams and Wilkins Co. Baltimore. pp. 701-706.
- Benoit D., Tourbier Y. et Germain S. (1994).** Plans d'expériences, construction et analyse. Technique et documentation. Edition LAVOISIER. Paris. 206p.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2012).** Whitman WB, Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Ludwig W, Suzuki Ki, Parte A (Eds). vol 5: The Actinobacteria. 2ème édition, Springer, New York. 1750 p.
- Birnbaum J., Stapley E.O., Miller A.K., Wallik H., Hendlin D. et Woodruff H.B., (1978).** Cefoxime, a semisynthetic cephalosporin: a microbiological overview. *J. Antimicrob. Chemother.*, **4** (Suppl), B: 15-32.
- Boubetra D. (2013).** Nouvelles espèces de *Saccharothrix* isolées des sols sahariens et nouveaux antibiotiques sécrétés par *Saccharothrix* sp. SA198. Thèse de Doctorat. Ecole nationale supérieure agronomique. El-Harrach. 154 p.
- Boubetra D., Zitouni A., Bouras N., Mathieu F., Lebrihi A., Schumann P., Sproer C., Klenk H.P., and Sabaou N. (2013a).** *Saccharothrix hoggarensis* sp. nov., an actinomycete isolated from Saharan soil. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.*, **63**, 549-553.
- Boubetra D., Sabaou N., Zitouni A., Bijani C., Lebrihi A. and Mathieu F. (2013b).** Taxonomy and chemical characterization of new antibiotics produced by *Saccharothrix* SA198 isolated from a Saharan soil. *Microb Research.*, **168**, 223-230.

Boubetra D., Zitouni A., Bouras N., Mathieu F., Lebrihi A., Schumann P., Sproer C., Klenk H.P., and Sabaou N. (2013c). *Saccharothrix saharensis* sp. nov., an actinomycete isolated from Algerian Saharan soil. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.*, **63**, 3744-3749.

Boubetra D., Zitouni A., Bouras N., Schumann P., Sproer C., Klenk H.P., and Sabaou N. (2014). *Saccharothrix tamanrassetensis* sp. nov., an actinomycete isolated from Saharan soil in Algeria. Soumis à *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*

Boubetra D., Zitouni A., Bouras N., Schumann P., Sproer C., Klenk H.P., and Sabaou N. (2015). *Saccharothrix tamanrassetensis* sp. nov., an actinomycete isolated from Saharan soil. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.*, **65**, 1316-1320.

Boudjella H. (1994). Influence des milieux de culture, des antibiotiques et du prétraitement des échantillons à la chaleur sur la sélection des genres et des espèces d'actinomycètes rares de quelques sols sahariens. Thèse de Magister en Microbiologie, E.N.S. de Kouba, 175 p.

Boudjella H. (2007). Étude taxonomique et des propriétés antagonistes des *Streptosporangium* des sols sahariens. Caractérisation des principaux antibiotiques sécrétés par trois souches. Thèse de Doctorat. Institut national agronomique. El-Harrach .209 p.

Boudjella H., Zitouni A., Coppel Y., Mathieu F., Monje M.C., Sabaou N. and Lebrihi A. (2010). Antibiotic R2, a new angucyclinone compound from *Streptosporangium* sp. Sg3. *The Journal of Antibiotics.*, **63**, 709-711.

Bouras N. (2005). Régulation de la production d'antibiotiques dithiopyrrolones chez *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. Thèse de Doctorat. École nationale supérieure agronomique. Toulouse. 238p.

Bouras N., Mathieu F., Sabaou N. and Lebrihi A. (2006a). Effect of amino acids containing sulfur on dithiopyrrolone antibiotic productions by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B- 24137. *J. Appl. Microbiol.*, **100**, 390-397.

Bouras N., Mathieu F., Sabaou N. and Lebrihi A. (2006b). Nutritional requirements for the production of dithiopyrrolones antibiotics by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Enz. & Microb. Tech.*, **39**, 1423-429.

Bouras N., Mathieu F., Sabaou N., Lebrihi A. (2007). Influence on dithiopyrrolone antibiotic production by organic acids in *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Process Biochem.*, **42**, 925-933.

Bouras N., Merrouche R., Lamari L., Mathieu F., Sabaou N., Lebrihi A. (2008). Precursor directed biosynthesis of new dithiopyrrolone analogs by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Process Biochem.*, **43**, 1244-1252.

Box G.E.P., Hunter W.G. et Hunter J.S. (1978). "Statistics for experimenters". Editions WileyInterscience. Paris.

Braznikova M. G., Konstantinova N.V., Potapova N. P. and Tolstykh I. V. (1977). Physicochemical characteristics of the new antineoplastic antibiotic, nocamycin. *Antibiotiki*, **22**, 486-489.

Brown D.E. and Zainudeen M.A. (1978). Effect of inoculum size on the aeration pattern of batch cultures of a fungal microorganism. *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 1045-1061.

Bugnicourt M., (1995). Dictionnaire de microbiologie générale: la vie racontée par les bactéries, ellipses (Eds), pp. 991.

Bunbamrung N., Dramae A., Srichomthong K., Supothina S., Pittayakhajonwut P. (2014). Streptophenazines I–L from *Streptomyces* sp. BCC21835. *Phytochemistry Letters*, **10**: 91–94.

Bush B. D., Fitchett G. V., Gates D. A. and Langley D. (1993). Carbocyclic nucleosides from species of *Saccharothrix*. *Phytochemistry*, **32**, 737-739.

-C-

Chang C. C., Chen W. C., Ho T. F., Wu H. S. and Wei Y. H. (2011). Development of natural anti-tumor drugs by microorganisms. *J. Biosci. Bioeng.*, **111** (5): 501-511.

Colombié V. (2005). Description de la production de spiramycine par *Streptomyces ambofaciens*. Modélisation métabolique, simulation et capteur logiciel. Thèse de doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, France.

-D-

Davies J. and Mazel D. (1997). Comment la résistance vient aux bactéries. *Biofutur*, **170**, 14-17.

Daniel R. (2004). The soil metagenome, a rich resource for the discovery of novel natural products. *Cur. Opin. Biotech.*, **15**, 199–204.

Delaunay S., Rondags E., Germain P. (2003). Production d'antibiotiques par biotechnologies. *Techniques de l'ingénieur. Opérations unitaires, génie de la réaction chimique*. J6008, 1-12.

Demain A.L. and Sanchez S. (2009). Microbial drug discovery: 80 years of progress, *J. Antibiot.*, **62**, 5-16.

Donadio S., Monciardini P., Alduina R., Mazza P., Chiocchini C., Cavaletti L., Sosio M. and Anna P.M. (2002). Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites, *J. Biotech.*, **99**, 187-198.

Doull J.L. et Vining L.C. (1990). Nutritional control of actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2): suppressive effects of nitrogen and phosphate. *appl microbial. Biotechnol.*, **32**,4: 449-454.

Driche E. (2010). Recherche des *Streptomyces* actifs contre quelques bactéries pathogènes multirésistantes aux antibiotiques. Mémoire de Magister en microbiologie, Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger. 121 p.

-E-

Eckwall, E.C., and J.L. Schottel. 1997. Isolation and characterization of an antibiotic produced by the scab disease-suppressive *Streptomyces diastatochromogenes* strain PonSSII. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 19:220-225.

Elibol M. (2004). Optimization of medium composition for actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2) with response surface methodology. *Process Biochemistry*. vol. 39, no. 9, pp. 1057–1062.

Ericsson J.M., Sherris J.C. (1971). Antibiotic sensitivity testing: report of an international collaborative study. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.*, **217**, 1-90.

Escalente L., Ramos I., Imroková I., Lagley E. et Sanchez S. (1999). Glucose repression of anthracycline formation in *Streptomyces peuceticus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 52:572-579.

Essien J. P. and Udosen E. D. (2000). Distribution of actinomycetes in oil contaminated ultisols of the Niger Delta (Nigeria). *J. Environ. Sci.*, **12**, 296-302.

-F-

Feng J., Zhang W., Han L. and Zhang X. (2011). Statistical optimization of medium components to improve the antibiotic activity of *Streptomyces*. 19G-317. *Afr. J. Agric. Resea.* 6(19): 4424-4431.

-G-

Galo M., Katz E. (1972). Regulation of secondary metabolite biosynthesis. Catabolite repression of phenoxazinone synthase and actinomycin formation by glucose., *J. Bacteriol.*, 109, 659-667.

Gao H., Liu M., Liu J., Dai H., Zhou X., Liu X., Zhou Y., Zhang W., Zhang L. (2009). Medium optimization for the production of avermectin B1a by *Streptomyces avermitilis* 14-12A using response surface methodology. *Bioresource. Technol.*, **100**, 4012-4016.

Genilloud O., Gonzales I., Salazar O., Martin J., Tormo J.R., Vicente F. (2011). Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 375-389.

Gesheva V., Ivanova V., Gesheva R. (2005). Effects of nutrients on the production of AK-111-81 macrolide antibiotic by *Streptomyces hygroscopicus*. *Microbiol. Res.* **160**, 243-248.

Goodfellow M. et Williams S.T. (1983). Ecology of actinomycetes. *Ann Rev Microbiol.*, **37**:189–216.

Goodfellow M. (2012). Actinobacteriaphyl. nov. *In*: Whitman WB, Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Ludwig W, Suzuki Ki, Parte A (Eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 5: The Actinobacteria.* 2ème édition, Springer, New York. p.33.

Goupy J. (1999). Plans d'expériences pour surfaces de réponses. Edition: DUNOD. Paris. 409p.

Goupy J. (2005). Pratiquer les plans d'expériences. Edition : DUNOD. Paris.p501-295.

Grund E. & Kroppenstedt R.M. (1990). Chemotaxonomy and numerical taxonomy of the genus *Nocardiosis* Meyer 1976. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **40**, 5-11.

Gunda M. M. and Charya M.A. S. (2013). Physiological factors influencing the production of antibacterial substance by fresh water *Actinobacteria*. *J. Recent. Advances. Applied Sciences.*, **28**, 55 62.

Gupta R. S. (2011). Origin of diderm (Gram-negative) bacteria: antibiotic selection pressure rather than endosymbiosis likely led to the evolution of bacterial cells with two membranes. *Antonie van Leeuwenhoek.*, **100** (2): 171-182.

Gupte M., Kulkarni P. and Ganguli B. N. (2002). Antifungal antibiotics. Mini-Review. *Appl Microbiol Biotechnol.*, **58**, 46–57.

-H-

Hamaki T., Suzuki M., Fudou R., Jojima Y., Kajiura T., Tabuchi A., Sen K. and Shibai H. (2005). Isolation of novel bacteria and actinomycetes using soil-extract agar medium. *J. Biosci. Bioeng.*, **99**, 485-492.

Hacène H., Sabaou N., Bounaga N. and Lefebvre G. (1994). Screening for non-polyenic antifungal antibiotics produced by rare *Actinomycetales*. *Microbios*, **79**, 81-85.

Hata T., Omura S., Iwai Y., Ohno H., Takeshima H., Yamaguchi N. (1971). A new antibiotic kinamycin: fermentation, isolation, purification and properties. *J. Antibiot.*, **24**, 353-359.

Hayakawa M. and Nonomura H. (1987). Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J. Ferm. Technol.*, **65**, 501-509.

Holzappel W., Brost I., Faerber P., Geisen R., Bresch H., Jany K.-D., Mengu M., Jakobsen M., Steyn P.S., Teniola D. and Addo P. (2002). Bacterial degradation of aflatoxin B1, ochratoxin A and/or zearalenone. *PCT. Int. Appl.*, 19.

Horvath G., Brazhnikova M.G., Konstantinova N.V., Tolstykh I.V. and Potapova N.P. (1979). The structure of nocamycin, a new antitumor antibiotic. *J. Antibiot.*, **32** (6), 555-558.

Hu Y.T., Zhou P.J., Zhou Y-G., Liu Z-H. and Liu S-J. (2004). *Saccharothrix xinjiangensis* sp. nov., a pyrene-degrading actinomycete isolated from Tianchi lake, Xinjiang, China. *Int. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, 2091-2094.

-I-

Islam M.A., Alam M.M., Choudhury M.E., Kobayashi N. et Ahmed M.U. (2008). Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of cloxacillin for selected isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with their antibiogram. *Bangl. J. Vet. Med.*, **6** (1): 121-126.

Islam M R., Y T Jeong., Y J Ryu., C H Song and Y S Lee. (2009). Isolation, Identification and Optimal Culture Conditions of *Streptomyces albidoflavus* C247 Producing Antifungal Agents against *Rhizoctonia solani* AG2-2. *Mycobiol.*, **37**, 114-120.

Isshiki K., Sawa T., Naganawa H., Matsuda N., Hattori S., Hamada M., Takeuchi T., Oosono M., Ishizuka M., Yang Z., Zhu B. and Xu W. (1989). 3-Oisobutyryl kinamycin C and 4- deacetyl-4-O-isobutyrylkinamycin C, new antibiotics produced by a *Saccharothrix* species. *J. Antibiot.*, **42**, 467-469.

-J-

Jain R., Zaidi K.U., Parveen N., Saxena A. (2011). Optimization of Cultural Conditions for the Production of Antibiotic by *Streptomyces* sp. VRY-1. *Recent Research in Science and Technol.*, **3**, 81-87.

Joffin J.N. and Leyral.G. (2006). Microbiologie technique -Tome 1: Dictionnaire des techniques. CRDP d'Aquitaine, pp. 368.

Jonsbu E., McIntyre M., Neilson J. (2002). The influence of carbon sources and morphology on nystatin production by *Streptomyces noursei*. *J. Biotechnol.*, **95**, 133-144.

Jose P. A., Jebakumar S. R. D. (2013). Diverse actinomycetes from Indian coastal solar salterns - a resource for antimicrobial screening. *J. Pure Appl. Microbiol.* 7, 2569–2575.

Jose P.A. and Jebakumar S.R.D. (2014). Non-Streptomycete actinomycetes nourish the current microbial antibiotic drug discovery. *Front Microbi.*, 4, 240.

-K-

Karam S. (2004). Application de la méthodologie des plans d'expériences et de l'analyse de données l'optimisation des processus de dépôt. Thèse de doctorat. Université de LIMOGES. Faculté de des sciences et techniques. France, 8p.

KarthikL., Kumar G. and Rao K. V. B. (2013). Antioxidant activity of newly discovered lineage of marine actinobacteria. *Asian. Pac. J. Trop. Med.*, 6 (4): 325-332.

Kim, S. J., Hong, K. L. and Joung, H. Y. (2008). Statistical Optimization of Medium Components for the Production of Prodigiosin by *Hahella chejuensis* KCTC 2396. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 18(12), 1903-1907.

Kim B. Y., Brown R., Labeda D.P. and Goodfellow.M. (2011). Reclassification of *Dactylosporangium variesporum* as *Saccharothrix variispore* corrig. (ex Tomita *et al.* 1977) sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 61, 310-314.

Kinoshita, N., Igarashi, M., Ikeno, S., Hori, M. and Hamada, M. (1999). *Saccharothrix tangerinus* sp. nov., the producer of the new antibiotic formamycin: taxonomic studies. *Actinomycetologica*, 13, 20-31.

Kloepper, J.W. and Schroth, M.N. (1978). Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. In: Proceedings of the fifth international conference on plant pathogenic bacteria, vol. 2. INRA, Angers, France, p 879-882.

Koguchi Y., Khono J., Suzuki S., Takahashi K., Ohnuki T. and Komatsubara S. (1999). TMC- 86A, B and TMC-96, new proteasome inhibitors from *Streptomyces* sp. TC1084 and 98 *Saccharothrix* sp. TC1094. I. Taxonomy, fermentation, isolation, and biological activities. *J. Antibiot.*, 52, 1069-1076.

Krishnan K., Mani A. et Jasmine S. (2014). Cytotoxic Activity of Bioactive Compound 1, 2- Benzene Dicarboxylic Acid, Mono 2- Ethylhexyl Ester Extracted from a Marine Derived *Streptomyces* sp. VITSJK8. Autumn., Vol 3, No 4.

Kumar A., Gupta R., Shrivastava B., Pal Khasa Y. and ChanderKuhad. (2012). Xylanase production from alkalophilic actinomycete isolate *Streptomyces* sp. RCK- 2010, its characterization and application in saccharification of second generation biomass. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 74: 170-177.

Kurtböke D.I. (2012). Biodiscovery from rare actinomycetes: an ecotaxonomical perspective. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 93, 1843-1852.

-L-

Laassami A (2015). Effet de quelques sources nutritionnelles sur la production d'antibiotiques par la souche SA 198 de *Saccharothrix* sp. en milieu de culture semi- synthétique. Magister de Microbiologie, Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger. 41 p.

- Labeda D.P., Testa R.T., Lechevalier M.P. and Lechevalier H.A. (1984).** *Saccharothrix*: a new genus of the *Actinomycetales* related to *Nocardiopsis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **34**, 426-431.
- Labeda D.P. and Lechevalier M.P. (1989).** Amendment of the genus *Saccharothrix* (Labeda *et al.*, 1984) and descriptions of *Saccharothrix espanaensis* sp. nov., *Saccharothrix cryophilis* sp. nov., and *Saccharothrix mutabilis* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **39**, 420-423.
- Labeda, D.P. and Lyons, A.J. (1989).** *Saccharothrix texasensis* sp. nov. and *Saccharothrix waywayandensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **39**, 355 - 358.
- Labeda D.P. and Kroppenstedt R.M. (2000).** Phylogenetic analysis of *Saccharothrix* and related taxa: proposal for *Actinosynnemataceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**, 331- 336.
- Labeda D.P., Hatano, K., Kroppenstedt, R.M. and Tamura, T. (2001).** Revival of the genus *Lentzea* and proposal for *Leechevalieriaceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**, 1045-1050.
- Lam K.S. (2007).** New aspects of natural products in drug discovery. *Trends in Microbiol.*, **15**, 279-289.
- Lamari L. (2006).** Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat. Faculté des sciences biologiques et agronomiques. Tizi ouzou. 176 p.
- Lamari L., Zitouni A., Boudjella H., Badji B., Sabaou N., Lebrihi A., Lefebvre G., Seguin E. and Til F. (2002a).** New Dithiopyrrolone Antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. I. Taxonomy, Fermentation, Isolation and Biological Activities. *J. Antibiotics.*, **55**, 696-701.
- Lamari L., Zitouni A., Dob T., Sabaou N., Lebrihi A., P Germain., Seguin E. and Tillequin F. (2002b).** New Dithiopyrrolone Antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. II. Physicochemical Properties and Structure Elucidation. *J. Antibiotics.*, **55**, 702-706.
- Lamsaïf, D. (1992).** Effets des sources d'azote sur la biosynthèse de la spiramycine chez *Streptomyces ambofaciens*. Etude des enzymes impliquées dans l'assimilation des ions ammonium. Thèse de Doctorat de l'INPL de Nancy.
- Larpen-Gourgaud M. et Sanglier J.J. (1992).** Biotechnologie. Principes et méthodes. Doin éditeurs. Paris. France.
- Larpen J.P. et Sanglier J.J. (1989).** Biotechnologie des antibiotiques. *Edition Masson*: 496p.
- Larpen J.P. et Larpen-Gourgaud M. (1997).** Memento technique de microbiologie. *Edition Lavoisier.*, 1039 p.
- Lazzarini A., Cavaletti L., Toppo G. and Marinelli F. (2000).** Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **78**, 399-405.
- Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G. and Marinelli, F. (2001).** Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek*, **78**, 399-405.
- Lebrihi A., Lefebvre G. and Germain P. (1988a).** Carbon catabolite regulation of cephalosporin C and expandase biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 44-51.

Lechevalier M.P., De Bievre C., Lechevalier H.A. (1977). Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochem. Syst. Ecol.*, **5**, 249-260.

Lechevalier M.P. (1981). Ecological associations involving actinomycetes. *In: Actinomycetes*. Shaal and Pulverer (Eds.). *Zbl. Bakt. Suppl.*, **11**, 159-166.

Lee K. (2005). A media design program for lactic acid production coupled with extraction by electro dialysis. *Bioresour. Technol.*, **96**, 1505-1510.

Lee H., Kim B.G., Ahn J.H. (2014). Production of bioactive hydroxyflavones by using monooxygenase from *Saccharothrix espanaensis*. *J. Biotech.*, **176**, 11-17.

Lee, C.Y., Cooksey, B.A.K., Baehrecke, E.H. (2002). Steroid regulation of midgut cell death during *Drosophila* development. *Dev. Biol.* 250(1): 101--111.

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

-M-

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

Mao N, Kojic M, Holloman WK (2009). Role of Blm and collaborating factors in recombination and survival following replication stress in *Ustilago maydis*. *DNA Repair (Amst)* 8(6):752-9.

Meklat A. (2004). Effet des antibiotiques de deux souches d'actinomycètes sur la maladie tache chocolat et l'anthracnose de la fève et sur la fusariose vasculaire du lin. Magister de Microbiologie, E.N.S. de Kouba, Alger. 97 p.

Meklat A. (2012). Taxonomie et potentiel antagoniste des actinomycetes halophiles des sols sahariens et mise en évidence de nouvelles espèces d'*Actinopolyspora*. Thèse de Doctorat en Biologie spécialité microbiologie, Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger. 162 p.

Meklat A., Sabaou N., Bouras N., Zitouni A., Spröer C., Klenk H., Mathieu F., Lebrihi A. (2012). A novel strain of *Actinopolyspora mortivallis* with antibacterial activity isolated from a Saharan soil. *Ann Microbiol.*, **62**, 1049-1057.

Merrouche R. (2000). Influence d'une souche de *Saccharothrix (Actinomycetales)* et de son antibiotique, la thiolutine, sur l'expression de la fusariose vasculaire de quelques plantes cultivées. Thèse de Magister en Ecophysiologie végétale, E.N.S. de kouba, Alger. 101 p.

Merrouche R. (2012). Production de nouveaux antibiotiques du groupe des dithiopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis* après addition de précurseurs dans le milieu de culture. Thèse de Doctorat. Ecole nationale supérieure agronomique. El-Harrach.p 197.

Merrouche R., Bouras N., Coppel Y., Mathieu F., Monje M.C., Sabaou N. and Lebrihi A. (2010). Dithiopyrrolone Antibiotic formation induced by adding valeric acid to the culture broth of *Saccharothrixalgeriensis*. *J. Nat. Prod.*, **73**, 1164-1166.

Merrouche R., Bouras N., Coppel Y., Mathieu F., Sabaou N. and Lebrihi A. (2011). New dithiopyrrolone antibiotics induced by adding sorbic acid to the culture medium of *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *FEMS MicrobiolLett.*, **318**, 41- 46.

Messis A. (2014). Isolement et criblage de souches d'actinomycètes productrices d'antifongiques non polyéniques. Thèse de Doctorat. Université A.Mira –Bejaia. 23 p.

Meyer A., Deiana J. et Bernard A. (2004). Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés. 2ème édition. (Collection biosciences et techniques). France. 430 p. ISBN 2- 7040-1170-2.

Moncheva P., Tishkov S., Dimitrova N., Chipeva V., Antonova-Nikolova S., Bogatzevska N. (2002). Characteristics of soil actinomycetes from antarctica. *Journal of Culture Collections.*, **3**, 3-14.

Moreira K.A., Albuquerque B.F., Teixeira M.F.S., Porto A.L.F. et Lima, J.L. (2002). Application of protease from *Nocardopsis* sp. as a laundry detergent additive. *World J MicrobiolBiotechnol.*, **18**, 307-312.

Muzammil S. (2012). *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137: an endophytic actinomycetal strain enabling to determine new bioactive metabolites for biocontrol, to control *Botrytis cinerea* on grapevine as well as to understand mechanisms of ISR in plants. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, France. 197p.

-N-

Naidenova M., Vladimirova D. (2002). Isolation and taxonomic investigation of actinomycetes from specific biotopes in Bulgaria. *Journal of Culture Collections.*, **3**, 15-24.

Nandhini S.U. et Selvam M.M. (2013). Bioactive compounds produced by *Streptomyces* strain. *Int J Pharm Pharm Sci.*, Vol 5, Suppl 1, 176-178.

Niladevi K.N., Rajeev K., Sukumaran, Nicemol J., Anisha G.S. and Prema P. (2009). Optimization of laccase production from a novel strain - *Streptomyces psammoticus* using Response Surface Methodology. *Microbiol. Res.* 164: 105-113.

Norrby S. R., Nord C. E. and Finch R. (2005). Lack of development of new antimicrobial drugs: a potential serious threat to public health. *Lancet Infect Dis.* **5**, 115-119.

-O-

Omura S., Tanaka Y., Tanaka H., Takahashi Y. et Iwai Y. (1980). Stimulation of the production of macrolide antibiotics by magnesium phosphate and related insoluble materials. *J Antibiot (Tokyo).*, **33**, 1568-1569.

Omura S. et Tanaka Y. (1986). Macrolide antibiotics, dans: Rehm H.J. et Reed J. Biotechnology. *Weinheim VCH Verlagsgesellschaft*: 359-391.

Otoguro M., Tamura T., Suzuki K.I. and Hayakawa M. (2009). *Saccharothrix violaceirubra* sp. nov., isolated from soil and plant litter. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **59**, 1504-1507.

-P-

Pandey A., Shukla A. and Majumdar S.K. (2005). Utilization of carbon and nitrogen sources by *Streptomyces kanamyceticus* M 27 for the production of an Antibacterial antibiotic. *African J. Biotech.*, **4**, 909-910.

Papagianni M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol. Adv.*, **22**(3): 189-259.

Paquet V. (1990). Mise en évidence de facteurs d'induction de la production de pristinamycines chez *Streptomyces pristinaespiralis*. Thèse de doctorat, INSA, Toulouse, France.

Parente E.C., Brienza C., Moles M. and Ricciardi A. (1995). A Comparison of methods for the measurement of bacteriocin activity. *J. Microbiol. Meth.*, **22**, 95-108.

Peltola J.S.P., Anderson M.A., Kampfer P., Auling G., Kropensstedt R.M., Busse H.J., Salkinoja-Salonen M.S. and Rainey F.A. (2001). Isolation of toxigenic *Nocardioopsis* strains from indoor environments and description of two new *Nocardioopsis* species, *N. exhalans* sp. nov. and *N. umidischhola* sp. nov. *Appl. Env. Microbiol.*, **67**, 4293-4304.

Pereira F. B., Guimarães P. M.R., Teixeira J. A., Domingues L. (2010). Optimization of lowcost medium for very high gravity ethanol fermentations by *Saccharomyces cerevisiae* using statistical experimental designs. *Bioresour. Technol.*, **101**, 7856-7863.

Pfefferle C., Theobald U., Gürtler H. and Fiedler H-P. (2000). Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. *J. Biotechnol.*, **80**, 135-142.

Pliego C., Cayo R., de Vicente A. and Francisco M. (2011). Cazorla Screening for candidate bacterial biocontrol agents against soil borne fungal plant pathogens. *Plant Soil.*, **340**, 505-520.

Praveen V., Tripathi C.K.M. and Bihari V. (2008). Studies on optimum fermentation conditions for actinomycin-D production by two new strains of *Streptomyces* spp. *Med. Chem. Res.*, **17**, 114-122.

Prescott LM., Harley J.P., Klein D.A., Bacq-Calberg C.M. et Dusart J., (2002). Microbiologie. De Boeck Université. 1147 p.

-S-

Sabaou N., Boudjella H., Bennadji A., Mostefaoui A., Zitouni A., Lamari L., Bennadji H., Lefebvre G. et Germain P. (1998). Les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes rares producteurs d'antibiotiques. *Sécheresse.*, **9**, 147-153.

Sadeghi A., Hesani A.R., Askari H., Qomi D.N., Farsi M. and Hervan E.M. (2009). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of sugar beet with native *Streptomyces* strains under field conditions. *Biocontrol Sci. Technol.*, **19**, 985-991.

Sanchez S., Chavez A., Forero A., Garcia-Hunte Y., Romero A., Sanchez M., Rocha D., Sanchez B., Avalos M., Guzman-Trampe S., Rodriguez-Sanoja R., Langley E., Ruiz B. (2010). Carbon source regulation of antibiotic production. *J. Antibiot.*, **63**, 442-459.

Sanglier J.J., Haang H., Huck T.A. and Fehr T. (1993). Novel bioactive compounds from actinomycetes: a short review (1988-1992). *Res. Microbiol.*, **144**, 633-642.

Satoh A., Ogawa A. H., Satomura Y. (1976). Regulation of N-acetylkanamycin amidohydrolase in the idiophase in kanamycin fermentation. *Agr. Biol. Chem.*, **40**, 191-196.

Saurav K. et Kannabiran K. (2012). Cytotoxicity and antioxidant activity of 5-(2, 4 dimethylbenzyl) pyrrolidin-2-one extracted from marine *Streptomyces* VITSVK5 spp. *Saudi. J.Biol. Sci.*, **19** (1): 81-86.

Schumacher R.W., Harrigan B.L. and Davidson B.S. (2002). Kahakamides A and B, new neosidomycin metabolites from a marine-derived actinomycete. *Tetrahedron Letters*, **42** (31), 5133-5135.

Shimizu K. (2013). Metabolic Regulation of a Bacterial Cell System with Emphasis on *Escherichia coli* Metabolism. ISRN *Biochem.* 47 p.

Singh L.S, Baruah I. and Bora.T.C. (2006). Actinomycetes of lakeLoktatHabitat: Isolation and screening for Antimicrobial Activities. *Biotechnology.*, 5 (2) : 217-221.

Singh L.S., Mazumder S., et Bora T. C. (2009). Optimisation de la croissance se de la production de métabolite bioactive par *Streptomyces tanashiensis* souche A2D, une actinomycète alcaliphile et tolérant au sel. *J. Mycol. Méd.* **19**,225-233.

Smaoui (2010). Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat, Université de Toulouse, 181p.

Smaoui S., Mathieu F., Elleuch L., Coppel Y., Merlina G., Karray-Rebai I. et Mellouli L. (2011). Taxonomy, purification and chemical characterization of four bioactive compounds from new *Streptomyces* sp. TN256 strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.*,**28** (n°3). pp. 793-804. ISSN 0959-3993.

Smith G.M. and Calam C.T. (1980). Variations in inocula and their influence on the productivity of antibiotic fermentations. *Biotechnol. Lett.*, **2**, 261–266.

Solanki R., Khanna M. and Lal R. (2008). Bioactive compounds from marine actinomycetes. *Ind. J. Microbiol.*, **48**, 410-431.

Solecka J., Zajko J., Postek M. et Rajnisz A. (2012). Biologically active secondary metabolites from actinomycetes. *Cent Eur J Biol.*, **7**:373–390.

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 de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, France. 203 p.

-T-

Takahashi A., Hotta K., Saito N., Morioka M., Okami Y. and Umuzawa H. (1986). Production of novel antibiotic, dopsisamine, by a new subspecies of *Nocardioopsis mutabilis* with multiple antibiotic resistance. *J. Antibiot.*, **39**, 175-183.

Takahashi E., Kimura T., Nakamura K., Arahira M. and Iida M. (1995). Phosphonothrixin, a novel herbicidal antibiotic produced by *Saccharothrix* sp. ST-888. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *J. Antibiot.*, **48**, 1124-1129.

Takeuchi M., Takahashi S., Enokita R., Sakaida Y., Haruyama H., Nakamura T., Katayama T. and Inukai M., (1992). Galacardins A and B, new glycopeptide antibiotics. *J. Antibiot.*, **45**, 297-305.

Tanaka Y., Taki A., Masuma R., Omura S. (1986). Mechanism of nitrogen regulation of protylonolide biosynthesis in *Streptomyces fradiae*. *J. Antibiot.* **39**, 813-821.

Tata S. (2015). Effet des sources de carbone et d'azote sur la production d'antibiotique par *Streptomyces* sp. PAL114 en milieu synthétique. Magister de Microbiologie, Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger. 56 p.

Thakur D., Bora T.C., Bordoloi G.N., Mazumdar S. (2009). Influence of nutrition and culturing conditions for optimum growth and antimicrobial metabolite production by *Streptomyces* sp. 201. *J. Mycologie Médicale.*, **19**, 161-167.

Tiwari K. and Gupta R.K. (2011). Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel Antibiotics. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **32**, 108-132.

Toumatia O. (2010). Actinomycetes sahariens producteurs d'antifongiques: isolement, taxonomie, caractérisation des antibiotiques et essais de lutte contre les maladies de plantes. Magister de Microbiologie, Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger. 115 p.

Toumatia O. (2015). Etude de quelques souches de *Streptomyces* des sols arides d'Algérie antagonistes de *Fusarium culmorum*: taxonomie, caractérisation des antibiotiques et essais de lutte contre la fusariose du blé. Thèse de Doctorat. ENS de Kouba, Alger. 173 p.

-V-

Valdugan E., Ribeiro A. H. R., Cence K., Colet R., Tiggemann L., Zeni J., Toniazzo G. (2014). Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain using agroindustrial substrates. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, **3**, 207-213.

Vastrad B. M., Nelagund S.E. (2011). Optimization and production of neomycin from different agro industrial wates in solid state fermentation, *IJPSDR.*, **3**, 104-111.

Velho-Pereira S., Kamat N.M. (2011). Antimicrobial Screening of Actinobacteria using a Modified Cross-Streak Method. *Indian J Pharm Sci.*, **73**(2), 223-228.

Verheecke C., Liboz T., Darriet M., Sabaou N. et Mathieu F. (2014). *In vitro* interaction of actinomycetes isolates with *Aspergillus flavus*: impact on aflatoxins B1 and B2 production. *Letters in Applied Microbiology.*, **58**, 597-603.

Vertesy L., Barbone F. P., Cashmen E., Decker H., Ehrlich K., Jordan B., Knauf M., SchummerD., Segeth M. P., Wink J. and Seibert G. (2001). Pulraflavins, potent antitumor antibiotics from *Saccharothrix* sp. DSM 12931. *J. Antibiot.*, **54**, 718-729.

Viguié C (2000). Médecine thérapeutique. 3, (3), *Thérapeutique*.

Vijayakumar R., Panneerselvam K., Muthukumar C., Thajuddin N., Panneerselvam A., et Saravanamuthu R. (2010). Optimization of antimicrobial production by a marine Actinomycete *Streptomyces afghaniensis* VPTS3-1 isolated from Palk Strait, East Coast of India. *Indian J. Microbiol.* **52**(2),230-239.

Vilches C., Mendez C., Hardisson C., Salas J.A. (1990). Biosynthesis of oleandomycin by *Streptomyces antibioticus*: influence of nutritional conditions and development of resistance. *J. Gen. Microbiol.* **136**, 1447-1454.

-W-

Waksman S.A. (1945). Microbiological antagonism and antibiotic substances. The Commonwealth Fund, New York.

Wang, Z.X., Li, S.M. and Heide, L. (2000). Identification of the coumermycin A, biosynthetic gene cluster of *Streptomyces rishiriensis* and biochemical SSM 40489. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**, 3040-3048.

Wang X., Huang L., Kang Z., Buchenauer H. and Gao X. (2010). Optimization of the Fermentation Process of Actinomycete Strain Hhs.015T. *J. Biomed Biotechnol.*, **2010**, 141876 141886.

Wang, Y., Fang, X., An, F., Wang, G., and Zhang, X. (2011). Improvement of antibiotic activity of *Xenorhabdus bovienii* by medium optimization using response surface methodology. *Microb. Cell Fact.* 10:98. doi: 10.1186/1475-2859-10-98.

Wang X., Tabudravu J., Jaspars M. and Deng H. (2013). Tianchimycins A-B, 16 membered macrolides from the rare actinomycete *Saccharothrix xinjiangensis*. *Tetrahedron.*, **69**, 6060- 6064.

Watanabe Y., Muro T., Sugihara A., Shimada Y., Nagao T., Takenishi S. and Tominaga Y. (1997). A unique enzyme from *Saccharothrix* sp. catalyzing D-amino acid transfer. *Bioch Bioph. Acta.*, **1337**, 40-46.

Williston E.H., Zia-Walrath P., Youmans G.P. (1947). Plate methods for testing antibiotic activity of actinomycetes against Virulent human type Tubercle Bacilli. *J. Bacteriol.*, **54**, 563-568.

-X-

Xi Y., Chen K., Dai W., Ma J., Zhang M., Jiang M., Wei P., Ouyang P. (2013). Succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* NJ113 using corn steep liquor powder as nitrogen source. *Bioresour. Technol.*, **136**, 775-779.

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

-Y-

Yan X., Huang L.L., Tu X., Gao X.N. and Kang Z.S. (2012). *Saccharothrix yanglingensis* sp. nov., an antagonistic endophytic actinomycete isolated from cucumber plant. *Antonie van Leeuwenhoek.*, **101**, 141-146.

Yen K, Vinayachandran V, Pugh BF (2013). SWR-C and INO80 Chromatin Remodelers Recognize Nucleosome-free Regions Near +1 Nucleosomes. *Cell* **154**(6):1246-56.

Yoshimura S., Tsurumi Y., Takase S. and Okuhara M. (1995). WS75624 A and B, new endothelin converting enzyme inhibitors isolated from *Saccharothrix* sp. No. 75624. II. Structure elucidation of WS75624 A and B. *J. Antibiot.*, **48**, 1073-1075.

Yuting H., Fenghua R., Peijin Z., XIA Min X. and Shuangjiang L. (2003). Degradation of pyrene and characterization of *Saccharothrix* sp. PYX-6 from the oligotrophic Tianchi Lake in Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. *Chin. Sci. Bull.*, **48**, 2210-2215.

Yu L., Lei T., Ren X., Pei X., Feng Y. (2008). Response surface optimization of l-(+)-lactic acid production using corn steep liquor as an alternative nitrogen source by *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466. *Biochem. Eng. J.*, **39**, 496-502.

-Z-

Zhou T.C. et Zhong J.J. (2015). Production of validamycin A from hemicelluloses hydrolysate by *Streptomyces hygroscopicus* 5008. *Bioresour. Technol.*, **175**:160–166.

Zhu C.H., Lu F. P., He Y. N., Han Z. L., Du L. X. (2007). Regulation of avilamycin biosynthesis in *Streptomyces viridochromogenes*: effect of glucose, ammonium ion and inorganic phosphate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **73**, 1031-1038.

Zitouni A. (2005). Taxonomie et antibiotiques des *Saccharothrix* et des *Nocardioopsis* des sols sahariens et nouvelles molécules bioactives sécrétées par *Saccharothrix* sp. SA 103. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. 230 p.

Zitouni A., Lamari L., Boudjella H., Badji B., Sabaou N., Gaouar A., Mathieu F., Lebrihi A. and Labeda D.P. (2004a). *Saccharothrix algeriensis* sp. nov., isolated from Saharan soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, 1377-1381.

Zitouni A., Boudjella H., Mathieu F., Sabaou N., Lebrihi A. (2004a). Mutactimycin PR, a New Anthracycline Antibiotic from *Saccharothrix* sp. SA 103. I. Taxonomy, Fermentation, Isolation and Biological Activities. *J. Antibiot.*, **57**, 367 - 372.

Zitouni A., Mathieu F., Coppel Y., Pont F., Sabaou N. and Lebrihi A. (2004b). Mutactimycin PR, a new anthracycline antibiotic from *Saccharothrix* sp. SA 103. II. Physico-chemical properties and structure elucidation. *J. Antibiot.*, **57**, 373-378.

Zitouni A., Mathieu F., Coppel Y., Pont F., Sabaou N. and Lebrihi A. (2004c). Mutactimycin PR, a new anthracycline antibiotic from *Saccharothrix* sp. SA 103. II. Physico-chemical properties and structure elucidation. *J. Antibiot.*, **57**, 373-378.

Zitouni A., Boudjella H., Lamari L., Badji B., Mathieu F., Lebrihi A. and Sabaou N. (2005). *Nocardioopsis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: Isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. *Res. Microbiol.*, **156**: 984-993.

ANNEXE

LES MILIEUX DE CULTURE

1. Milieu Mueller-Hinton : Milieu de culture pour déterminer la sensibilité des bactéries aux antibiotiques.

- Extrait de viande 3g ;
- Hydrolysate de caséine 17,5g ;
- Amidon 1,5g ;
- Agar 12g ;
- Eau distillée 1000 mL ;
- pH 7,4.

2. Milieu Sabouraud : Milieu de culture pour déterminer la sensibilité des champignons aux antibiotiques.

- Glucose 10g ;
- Peptone 7g ;
- Agar 12g ;
- Eau distillée 1000 mL ;
- pH 7,4.

3. Milieu ISP2

- Glucose 4g ;
- Extrait de levure 4g ;
- Extrait de malt 10g ;
- Agar 18g ;
- Eau distillée 1000 mL ;
- pH 7,4.