

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

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de microbiologie
Spécialité microbiologie fondamentale



جامعة بجاية
Tasdawit n Bgayet
Université de Béjaïa

Réf :.....

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

MASTER

Thème

Etude de l'activité antimicrobienne
et antioxydants d'un extrait d'alcaloïde de
la souche d'actinobactérie

Présenté par :

M^{elle} REGRADJ Amira & M^{elle} KASSAT Asma

Soutenu le : 13 Septembre 2022

Devant le jury composé de :

M^{me} Mouici. K
M^{elle} Yanat. B
M^{me} Saidani. K

MCB
MCA
MCB

Présidente
Encadreur
Examinatrice

Année universitaire : 2021 / 2022

Remerciement

*Avant tout, nous remercions **ALLAH** le tout puissant, qui nous a donné le courage, la volonté, la force, la santé et la patience pour réaliser ce travail et qui nous a éclairé vers le bon chemin.*

*Nos plus grands remerciements à nos **parents** pour leur soutien et encouragement.*

*On tient à remercier, **Madame Yanat betitra**, de nous avoir encadré.*

*Pour la même occasion, nous tenons à remercier **Madame Mouici** La présidente et **Madame Saidani** pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Nous remercions également **Mr Bribi** pour son soutien et sa gentillesse ainsi que ses **doctorants**.*

DEDICACE

Merci Allah de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir, la force d'y croire, la patience d'aller jusqu'au bout du rêve.

*Je dédie ce modeste travail à mes très chers et précieux **parents**, qui m'ont doté d'une éducation digne, leur amour a fait de moi ce que je suis aujourd'hui.*

*À celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, à ma chère mère **MELKHIR**.*

*À mon père **HAKIM**, école de mon enfance, qui a été mon ombre durant toutes les années des études, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger.*

Que dieu les garde et les protège.

*À mon cher frère **Massinissa** et l'agréable petite sœur **NADJET***

*À mes grandes mères: **FATIMA et ZAHRA***

*Mes oncles: **BAKLI, MOUMLLOUD, OMAR et SMAIL***

*Mon oncle paternel: **MUSTAPHA***

*À toute personne spéciale dans ma vie et à toutes mes ami (es): **SIREM,***

CHAHINAZ, THILELLI

*À ma Binôme **ASMA**, que je la souhaite toute la réussite dans sa vie.*

Amira

Dédicace

Je dédie ce modeste travail:

*À mon très cher papa **MADANI**,*

Aucun dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour toi, rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

*À ma très chère mère **SALIHA**,*

autant de phrases aussi expressives soient elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours, tu n'as pas cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études.

*À mes très chers frères **ADEL & AMINE**, mes sœurs **AMINA, LINDA ET THIZIRI**,*

Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous. Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

*À mes belles sœurs **SONIA & HANANE** et toute ma famille.*

À toutes mes amis et les personnes qui me sont chères, qui m'ont soutenue, supporté et encouragé.

*À ma Binôme **AMIRA**, que je la souhaite toute la réussite et la joie dans sa vie.*

Asma

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction.....1

Partie I : Synthèse bibliographique

CHAPITRE I : ACTINOBACTERIES

I-Description générale des Actinobacteries	3
II-Classification des Actinobacteries.....	4
III-Ecologie et distribution des Actinobacteries dans la nature.....	5
III.1. Souches d'actinobactéries isolées en Algérie.....	6
IV-Métabolisme des Actinobacteries.....	7
IV-1- Métabolisme primaire.....	7
IV- 2- Métabolisme secondaire.....	7
V. Importance des actinobactéries.....	7
V .1. Domaine pharmaceutique.....	7
V .2. Domaine de la biotechnologie.....	7
V .3. Domaine écologique.....	8
V.4. Domaine de lutte biologique.....	8

CHAPITRE II : ALCALOÏDES

I- Historique.....	9
II- Structure et classification des alcaloïdes	9
III- Propriétés physico-chimiques	12
IV- Source des alcaloïdes.....	12
V. Alcaloïdes des Actinobacteries.....	13
VI. Propriétés pharmacologiques des alcaloïdes.....	14
VI.1. Activité antimicrobienne.....	15

VI.2. Activité antioxydants.....	15
VI.3. Activité anti-inflammatoire	15
VII. Application des alcaloïdes	19

Partie II : Partie pratique

MATERIEL ET METHODES

I. Matériel.....	20
I.1 Matériel analytique	20
I.2 Matériel biologique	20
I.2.1 Microorganisme étudié : Actinobactéries	20
I.2.2 Souches cibles testées	21
II. Méthodes.....	22
II.1 La mise en culture de P ₂ et production des molécules actives	22
II.2 Extraction des molécules actives des souches de P ₂	22
II.3 Détection de la présence des alcaloïdes	24
II.4 Étude de l'activité antibactérienne.....	24
II.4.1 Méthode des puits.....	24
II.4.2 Méthode de micro-dilution en milieu liquide.....	26
II.5 Évaluation de l'activité antioxydant des extraits.....	28
II.5.1 Activité de piégeage du radical libre DPPH.....	28

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Résultats.....	31
I.1. Détermination du rendement d'extraction et mise en évidence de la présence des alcaloïdes	31
I.2. Résultats du test d'activité antimicrobienne	32
I.3. Résultat de l'activité antioxydant.....	36
II. Discussion.....	37
Conclusion.....	39

Références bibliographiques

Liste des abréviations

ATCC	American type culture collection
ADNr	Acide Désoxyribo Nucléique ribosomique
ABS	Absorbance
CCM	Chromatographie sur couche mince
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
DPPH	1, 1-diphényl-2-picrylohydrazyl
DMSO	Diméthylsulfoxyde
ED	Extrait DMSO
EM	Extrait méthanolique
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
MH	Mueller – Hinton
MHB	Bouillon Mueller – Hinton
SARM	Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline
UFC	Unité Formant Colonie

Liste des tableaux

Tableaux	Titres	Pages
Tableau I	Classification des actinobactéries selon le « Bergey's Manual de systématique bactériologique	05
Tableau II	Habitats des actinobactéries	05
Tableau III	Quelques exemples de molécules antibiotiques et microorganismes producteurs	08
Tableau IV	Alcaloïdes provenant d'actinobactéries d'origine marine	14
Tableau V	Exemples d'activités biologiques des alcaloïdes extraits à partir des actinobactéries	17
Tableau VI	Composés isolés du <i>Nocardiopsis</i> pendant mars 2018–2021	18
Tableau VII	Listes des souches cibles	21
Tableau VIII	Rendement de l'extraction d'alcaloïdes après évaporation par le chloroforme	31
Tableau IX	Résultats de test Mayer	31
Tableau X	Résultats des CMI d'extraits méthanolique et DMSO d'alcaloïdes.	33
Tableau XI	Résultats du test DPPH	36

Liste des figures

Figures	Titres	Pages
Figure 01	(a) Photographie au microscope électronique à balayage illustrant les chaînes de spores du genre <i>Streptomyces</i> (b) Aspect macroscopique d'une souche de <i>Streptomyces</i>	03
Figure 02	Actinobactéries isolées sur milieu amidon caséine agar après incubation à 30 C/14 jour	04
Figure 03	Distribution des sites d'échantillonnage des Actinobactéries les plus explorés en Algérie.	06
Figure 04	Structures hétérocycliques du squelette constituant le groupe des alcaloïdes.	10
Figure 05	Exemple d'un alcaloïde vrai : L'usambaeensine	11
Figure 06	Exemple d'un proto-alcaloïde : La mescaline	11
Figure 07	Exemple d'un pseudo-alcaloïde : La pinidine	11
Figure 08	Photographies de la souche P2 sur milieu SCA	20
Figure 09	Schéma de l'extraction d'alcaloïdes	23
Figure 10	Schéma du protocole expérimental suivi pour la détermination de l'activité antibactérienne (tests des puits)	25
Figure 11	Détermination des CMI par la méthode de micro-dilution sur microplaque	27
Figure 12	Forme réduite du radical DPPH	28
Figure 13	Extrait sec obtenu après l'évaporation	31
Figure14	Photographies de résultats du test par le réactif de Mayer.	32
Figure 15	Photographies des résultats des CMI de l'extrait méthanolique	34
Figure 16	Photographies des résultats des CMI de l'extrait DMSO	35

INTRODUCTION

Introduction

Le monde est entré dans l'âge d'or des antibiotiques et au cours de cette période d'utilisation généralisée de ces dernières, les infections bactériennes étaient considérées comme apprivoisées. Les antibiotiques étaient largement utilisés pour améliorer la santé globale des sociétés du monde entier notamment pour guérir des infections potentiellement mortelles, les coupures et les plaies infectées et diverses maladies bactériennes, comme la syphilis et le choléra, étant alors considérées comme en voie d'éradication. Cependant, la résistance aux antibiotiques a inévitablement suivi la sortie de chaque nouvelle molécule et la propagation rapide des agents pathogènes résistants est devenue un problème grave de santé publique, rien qu'aux États-Unis, 2,8 millions de personnes sont infectées chaque année par des bactéries résistantes aux antibiotiques, et environ 35 000 d'entre elles en meurent. (Hochvaldová L *et al.*, 2022). Aujourd'hui, presque tous les antibiotiques sur le marché ont au moins une souche de bactérie qui leur résiste. De plus l'augmentation des bactéries multi-résistantes (MDR), associée à la diminution de la découverte de nouveaux antibiotiques, constitue une menace majeure pour la santé mondiale. (Van Groesen *et al.*, 2022).

Suite à cela, ces dernières décennies des travaux se sont orientés vers la recherche de nouvelles molécules ayant un spectre d'activité important. La recherche de nouvelles molécules bioactives produites par les actinobactéries, et notamment les souches d'origines marines qui sont peu exploitées, pourrait faire face à ce phénomène de résistance aux antibiotiques (Huttner *et al.*, 2013). En effet, les actinobactéries sont des bactéries à Gram positif largement réparties dans l'environnement, qui jouent un rôle important dans divers domaines: industriel, médical et vétérinaire, ainsi que dans le domaine de l'agriculture et l'agro-alimentaire (George *et al.*, 2012; Solecka *et al.*, 2012). Connues tout particulièrement pour la richesse et la diversité en métabolites secondaires, elles sont potentiellement intéressantes pour la découverte de nouveaux antibiotiques et enzymes (Overbye et Barret 2005).

Parmi les actinobactéries, *Streptomyces* est le genre le plus connu pour la production des métabolites secondaires biologiquement actifs. En effet, ce genre bactérien est à l'origine d'environ 70% des molécules antibiotiques utilisées en médecine et 60% des antifongiques utilisés en agriculture (Sujatha *et al.*, 2005). En outre, d'autres métabolites secondaires intérêt médical peuvent être produits tels que les vitamines, les immunosuppresseurs ainsi que les alcaloïdes (Genilloud *et al.*, 2011).

Les alcaloïdes présentent un groupe très étendu de métabolites secondaires, avec des structures chimiques extrêmement divergentes, comprenant des systèmes cycliques hétérocycliques différents dans les organismes. Certains sont d'utilisation médicale importante tels que les antihypertenseurs, antipaludiques, antiviraux, anticancéreux et anti-inflammatoires. De plus, les alcaloïdes sont doués d'activité antibactérienne pouvant ainsi éventuellement remplacer les antibiotiques (Eguchi et *al.*, 2019).

Les alcaloïdes sont produits par une grande variété d'organismes, notamment des bactéries, des champignons, des plantes et des animaux, dont la principale source est constituée par les plantes supérieures. Plus de 12 000 alcaloïdes, dont plus de 150 familles, ont été identifiés dans les plantes, et environ 20% des "espèces de plantes à fleurs" contiennent des alcaloïdes.(Dr. Lucie et Dr. Jakub, 2022).Toutefois, ils peuvent être produits par certains animaux ou microorganismes. Ces derniers étant très peu étudiés ce qui amène à l'objectif de notre travail qui est l'étude de l'activité antibactérienne *in vitro* des alcaloïdes extraits à partir d'actinobactéries ainsi que l'activité antioxydant.

A cet effet, nous avons suivi la méthodologie suivante:

- Extraction d'alcaloïdes à partir d'une souche de *Streptomyces* isolée de rivage.
- Étude de l'activité antibactérienne de ces alcaloïdes vis-à-vis d'espèces bactériennes Gram positives et Gram négatives de référence ou résistantes aux antibiotiques par la méthode des puits et micro-dilution (détermination des CMI).
- Etude de l'activité antioxydants.

Chapitre I:

Actinobactéries

I. Description des actinobactéries

Les actinobactéries sont des microorganismes ubiquitaires que l'on rencontre dans la plupart des niches écologiques. La grande majorité est d'origine tellurique et c'est à partir du sol que ces bactéries peuvent coloniser de nombreux biotopes: air, composts, eaux, fourrages, fumiers, grains de céréales, systèmes d'air climatisé, poussière de maison, foin et pailles, résidus fibreux de canne à sucre, pollen des plantes et bien d'autres substrats (Boudjelal, 2012).

Elles forment un groupe diversifié de bactéries à Gram positif filamenteuses, septées ramifiées, organotrophes, hétérotrophe, aérobies stricts et micro-aérophiles. Leur coefficient de Chargaff (G+C%) est supérieur à 55%, généralement compris entre 60 et 75% (Larpent et sanglier, 1989). Appelées autrefois actinomycètes, terme utilisé pour la première fois par Bollinger en 1877, emprunté du grec « aktis » et « mykes » pour « champignons à rayons », explique que ces microorganismes ont d'abord été considérés comme des champignons en raison de leur capacité à former un véritable mycélium ramifié (Gottlieb et al., 1973). On rencontre des espèces dont le mycélium est rudimentaire au point d'être inexistant (la plupart des *Mycobacterium*), d'autres forment un mycélium du substrat bien développé et ramifié mais n'ont pas de mycélium aérien (*Micromonospora*) (Figure 1 a) (Supong et al., 2013), et enfin des espèces organisées en mycélium végétatif et/ou en mycélium aérien comme pour le genre, *Streptomyces* (Figure 1 b) (Belyagoubi, 2014).



Figure 1: (a) Photographie au microscope électronique à balayage illustrant les chaînes de spores du genre *Streptomyces* (b) Aspect macroscopique d'une souche de *Streptomyces* (Belyagoubi, 2014).

En culture solide, les actinobactéries forment en une semaine environ des colonies souvent pigmentées (gris, vert, rouge...) provenant de l'accumulation d'hyphes ramifiés à

contours lisses ou échancrés à aspect compact, poudreux ou en chou-fleur (figure 2) (Kitouni, 2007).

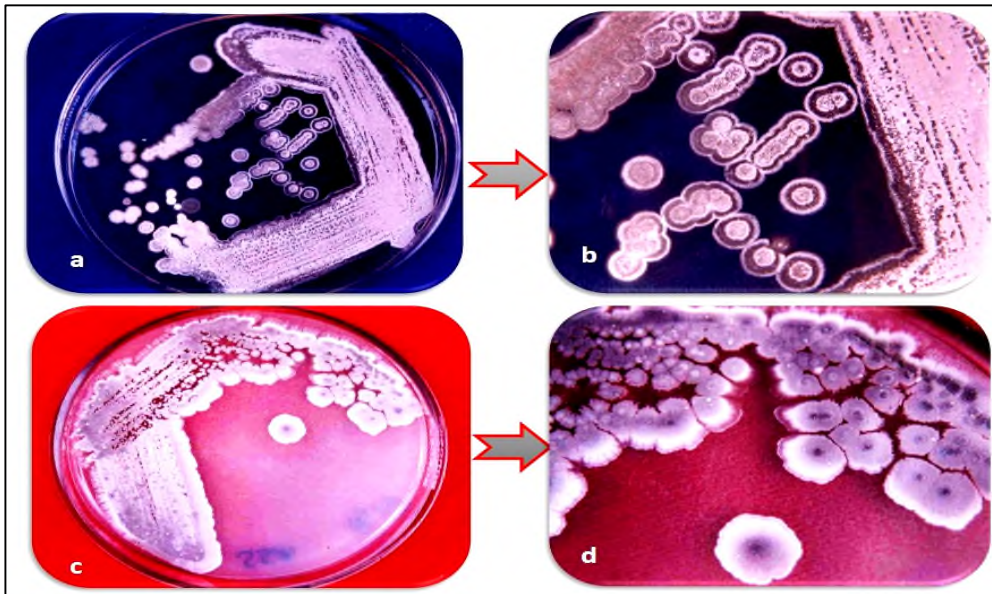


Figure 2 : Actinobactéries isolées sur milieu amidon caséine agar après incubation à 30 C/14 jour (Ananda, 2016).

II. Classification des actinobactéries

La classification des actinobactéries est basée principalement sur l'analyse de la séquence de l'ADNr 16S selon « Bergey's Manual » (2012) (Tableau I), les actinobactéries sont ainsi classées dans le phylum des *Actinobacteria* qui est organisé en classe, ordres, familles, genres et espèces. Les genres de ce phylum présentent une énorme diversité en termes de morphologie, de physiologie et de capacités métaboliques.

Les Streptomycètes représentent le plus grand genre appartenant à l'ordre des Actinomycétales qui renferment une diversité de morphotypes comprenant des formes unicellulaires sphériques, des hyphes fragmentés et des mycéliums ramifiés (Barka et *al.*, 2016).

Tableau I. Classification des actinobactéries selon le « Bergey's Manual » de systématique bactériologique (2012)

Classe	Ordre	Famille	Genre
<i>Nitriliruptoria</i>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Actinomycetales</i> • <i>Streptomycetales</i> • Plus les 13 ordres 	<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Actinomyces</i> plus les 6 autres genres
<i>Acidimicrobiia</i>			
<i>Actinobacteria</i>			
<i>Rubrobacteria</i>		<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptomyces</i> plus les 2 autres genres
<i>Coriobacteria</i>			
<i>Thermoleophilia</i>			

III. Ecologie et distribution des actinobactéries dans la nature

Les actinobactéries colonisent une large variété d'habitats comme le montre le Tableau II. Elles sont capables de se développer sur une large gamme de substrats. Une majorité des actinobactéries sont saprophytes mais, il existe des formes parasites et symbiotiques des plantes ou des animaux.

Tableau II. Habitats des actinobactéries (Tanaka et Omura, 1990 ; Vonothini et *al.*, 2008).

Habitats		Références
Milieus aquatiques	Sédiments marins	Maldonado et <i>al.</i> , 2009
	Eau de mer	Subramani et Aalbersberg, 2013
	Ecosystèmes d'eau douce	Allgaier et Grossart, 2006
	Sédiments océaniques	Jensen et <i>al.</i> , 2005 ; Solano et <i>al.</i> , 2009
	Invertébrés marins	Cheng et <i>al.</i> , 2016
Environnements terrestres	Commensaux végétaux, Symbiotes fixateurs d'azote, Les habitants du tractus gastro-intestinal et les pathogènes des animaux et des plantes	Fiedler et <i>al.</i> , 2005
Ecosystèmes plus extrêmes	Sédiments profonds, les sols désertiques hyperarides	Stach et Bull, 2005 ; Stackebrandt et Schumann, 2006 ; Goodfellow et Fiedler, 2010

III.1. Souches d'actinobactéries isolées en Algérie

Avec une superficie de plus de 2 millions de kilomètres carrés, l'Algérie présente une diversité climatique impressionnante, allant des montagnes enneigées des régions du nord surplombant la mer Méditerranée au désert saharien le plus chaud du monde. Ceci a pour effet une grande biodiversité, riche et diversifiée en actinobactéries, à laquelle correspond une grande chimio diversité de métabolites. Un certain nombre d'actinobactéries ont été isolées de différents écosystèmes, y compris des plantes sahariennes, des grottes, des eaux usées, sédiments de rivière, zones hyper salines, sol du désert saharien, et algues dérivées. (Djinni et al., 2018). Les sites de prélèvement les plus étudiés pour l'isolement des actinobactéries sont répertoriés dans la figure 3.

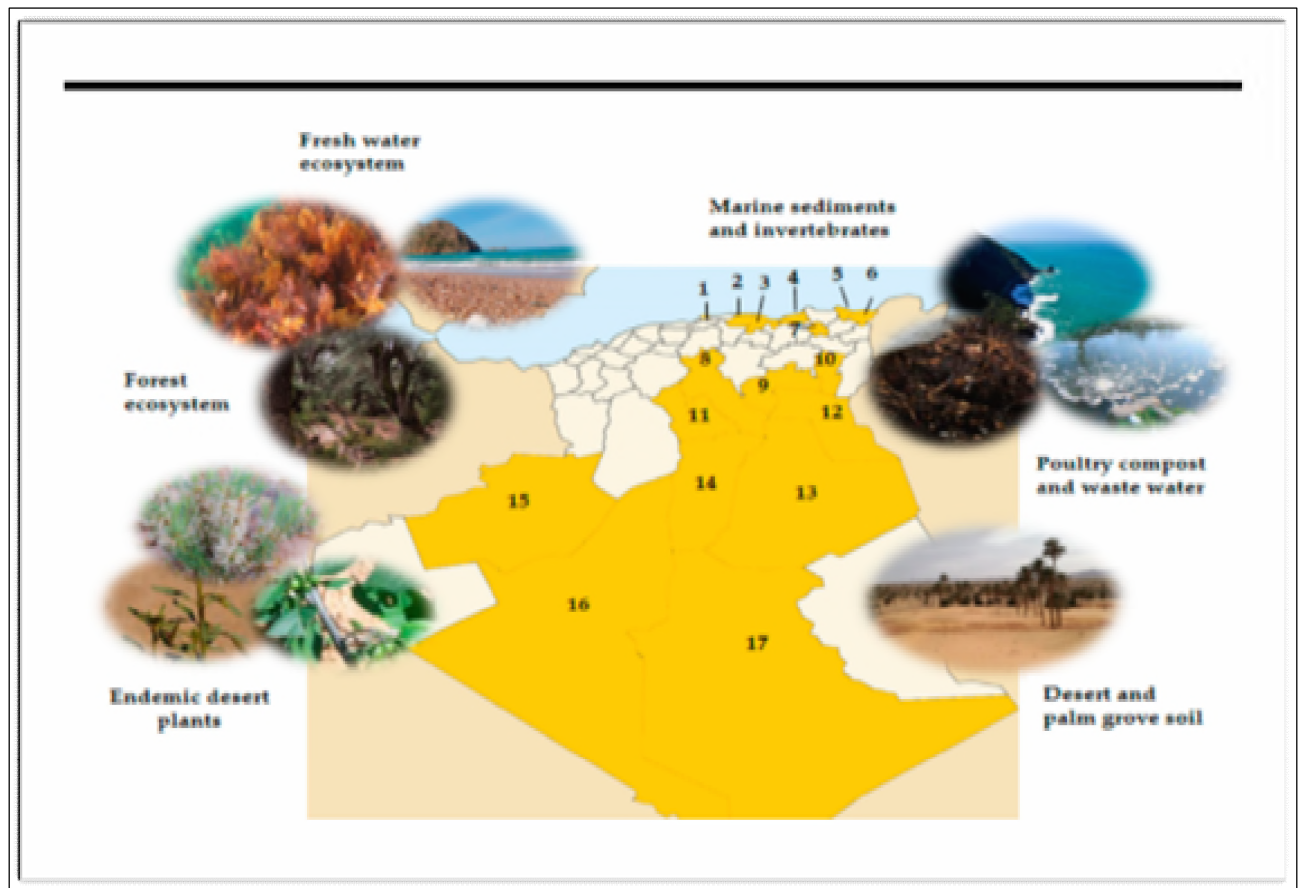


Figure 3 : Distribution des sites d'échantillonnage des Actinobactéries les plus explorés en Algérie. 1 : Alger, 2 : Tizi Ouzo, 3 : Bejaia, 4 : Jijel, 5 : Annaba, 6 : El Taref, 7 : Constantine, 8 : Djelfa, 9 : Biskra, 10 : Khenchela, 11 : Laghouat, 12 : El Oued, 13 : Ouargla, 14 : Ghardaïa, 15 : Bechar, 16 : Adrar, 17 : Tamanrasset. (Djinni *et al.*, 2018)

IV. Métabolisme des actinobactéries

IV.1. Métabolisme primaire

Le métabolisme primaire des actinobactéries est semblable à celui des autres organismes. Les métabolites primaires ou généraux essentiels forment la structure cellulaire et permettent le fonctionnement du métabolisme général (Theilleux, 1993).

IV. 2. Métabolisme secondaire

Les métabolites secondaires obtenus à partir des actinobactéries constituent une source potentielle de nombreux nouveaux composés incluant les antibiotiques, les alcaloïdes, les peptides, les stérols et autres. Les membres du genre *Streptomyces* sont des producteurs de métabolites secondaires les plus connus, isolés pour la plupart des sols terrestres, de la rhizosphère des racines des plantes et, depuis peu, des sédiments marins (Solecka *et al.*, 2012).

V. Importance des actinobactéries

V.1. Domaine pharmaceutique

Les métabolites secondaires produits par certaines souches d'actinobactéries ont des propriétés antibactériennes, antitumorales, antifongiques, antivirales, antiparasitaires, antiinflammatoire, antioxydants et immunosuppressive (Manivasagan *et al.*, 2013). Ces produits naturels ont des potentialités de lutter contre certaines maladies majeures comme le cancer, le VIH et des inflammations sévères (Hassan *et al.*, 2017).

V.2. Domaine de la biotechnologie

Plusieurs sociétés de biotechnologie comme Diversa, Cubiste et Protéus, ainsi que des établissements universitaires travaillent actuellement sur de nouvelles stratégies pour les applications pharmaceutiques de nouveaux composés produits par les microorganismes marins et extrêmophiles dont les actinobactéries. Plusieurs antibiotiques produits par les actinobactéries marins ont été rapportés (Maskey *et al.*, 2003).

Les actinobactéries représentent une grande proportion de la biomasse microbienne du sol. Ils ont la capacité de produire une large variété de molécules bioactives de haute valeur commerciale entre autres les antibiotiques (tableau III) et les enzymes (Mahyudin *et al.*, 2012).

Tableau III. Quelques exemples de molécules antibiotiques et microorganismes Producteurs (Aboul-Enein et Ali, 2000)

Microorganismes producteurs	Antibiotiques
<i>Streptomyces orientalis</i>	Vancomycine
<i>Streptomyces azureus</i>	Thiostreptone
<i>Actinoplanes teichomyceticus</i>	Teicoplanine
<i>Nocardia lurida</i>	Ristocetine
<i>Nocardia mediterranei</i>	Rifamycine
<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Kanamycine
<i>Streptomyces griseus</i>	Streptomycine

V.3. Domaine écologique

Les actinobactéries jouent un rôle écologique essentiel dans le recyclage de biomatériaux réfractaires et produisent des métabolites secondaires nouveaux qui participe dans la minéralisation de la matière organique, l'immobilisation d'éléments nutritifs minéraux, la fixation d'azote, la solubilisation du phosphate et l'amélioration des paramètres physiques (Dastager et *al.*, 2013; Hassan et *al.*, 2017) .

V.4. Domaine de lutte biologique

Dans le domaine de la pathologie végétale, la lutte biologique est la lutte menée contre les agents responsables des maladies des plantes au moyen de micro-organismes antagonistes. Les actinobactéries possèdent les principales propriétés de l'antagoniste idéal défini par plusieurs auteurs. Ces critères laissent supposer que ce groupe de micro-organismes peut jouer un rôle primordial dans le domaine de la protection des plantes contre leurs bio-agresseurs. D'une manière générale, ces micro-organismes se caractérisent par: un taux de multiplication très élevé. La forte sporulation permet une importante dissémination. Un taux élevé de colonisation de la rhizosphère et leur maintien en conditions défavorables (Sabaou *et al.*, 1990). Une adaptation à la vie aérienne et souterraine le met en contact direct avec de nombreux pathogènes. Les facultés antagonistes des actinobactéries s'expliquent de façon diverses (compétition spatiale et nutritionnelle, hyper parasitisme et antibiose) (Omrane, 2014).

Chapitre II :

Alcaloïdes

I. Histoire des alcaloïdes

En 1805, le premier alcaloïde à être isolé sous forme brute, la morphine, identifié par Sertürner; issue de l'opium, elle reste un agent médical important (Devereaux *et al.*, 2018). C'est qu'en 1818 que le terme alcaloïde a été introduit pour la première fois par le pharmacien W. Meissner (1792-1853) en Allemagne (Funayama et Cordell, 2014b). Quelques années plus tard, l'agent antipaludéen quinine a été identifié (Teodoro et Edmundo, 2005).

De 1817 jusqu'à 1821, les deux pharmaciens Pierre Joseph Pelletier et Joseph Benaim Ceventou, découvrirent une large gamme de principes actifs tels que la brucine, la fébrifuge, la quinine, la caféine et la vératrine (Aniszewski, 2015).

II. Structure et classification des alcaloïdes

Les alcaloïdes constituent un groupe important et structurellement diversifié de métabolites secondaires. La classification la plus courante des alcaloïdes est leur répartition selon la structure principale, le squelette principal C-N. Selon cette dernière caractéristique, les alcaloïdes sont répartis parmi les grands groupes suivants: **pyrrolidine, pyridine, quinoléine, isoquinoléine, indole, quinazoline, stéroïdiens, diterpénoïdes et autres alcaloïdes**. Chacun de ces groupes est subdivisé en plusieurs sous-groupes en fonction des caractéristiques structurelles de ses représentants (figure 04) (Ahmed, 1998).

Ils sont aussi classés de par leurs précurseurs moléculaires communs, en fonction de la voie biologique utilisée pour construire la molécule. D'un point de vue structurel, les alcaloïdes sont divisés en fonction de leur forme et de leur origine de sorte qu'il existe trois principaux types d'alcaloïdes (Tableau IV et figure 05, 06 et 07).

- ✚ **Alcaloïdes vrais** : Composés qui dérivent d'acides aminés et possédants un atome d'azote dans un système hétérocyclique. Ces alcaloïdes sont biologiquement très réactifs même à des petites doses. Ils peuvent se présenter dans les plantes à l'état libre ou sous forme de sels. Ils sont formés de la condensation d'un acide aminé décarboxylé avec une molécule dépourvue d'azote (Aniszewski, 2007).
- ✚ **Proto- alcaloïdes** : Composés dont l'atome d'azote dérivé d'un acide aminé n'est pas inclus dans le système hétérocyclique. Ce sont des composés dérivés de la L-tyrosine, du L-tryptophane, et de la L-ornithine. Ils forment un groupe minoritaire d'alcaloïdes, l'hordenine, mescaline et yohimbine sont des exemples types de cette famille d'alcaloïdes (Shakil, 1988)

✚ **Pseudo- alcaloïdes** : Ce sont des composés alcaloïdiques qui ne dérivent pas d'acides aminés. Il s'agit généralement d'isoprenoïdes, et des dérivés de l'acétate (Bruneton, 1999).

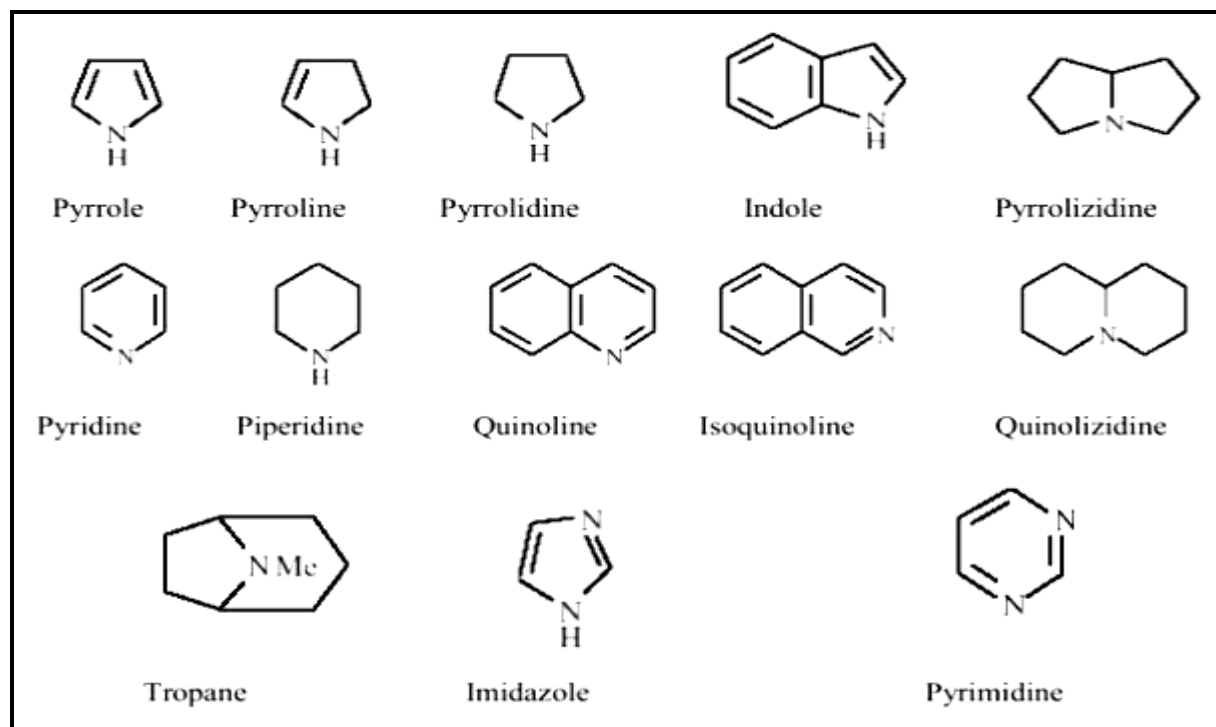


Figure 04. Structures hétérocycliques du squelette constituant le groupe des alcaloïdes.

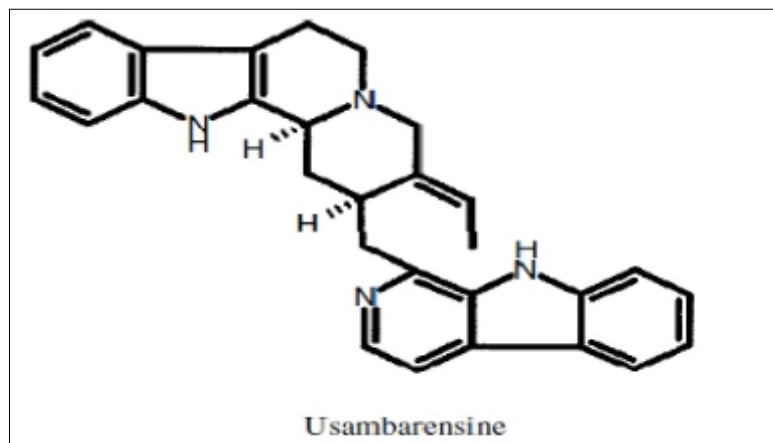


Figure 05 : Alcaloïde Usambarensine (Aniszewski, 1994).

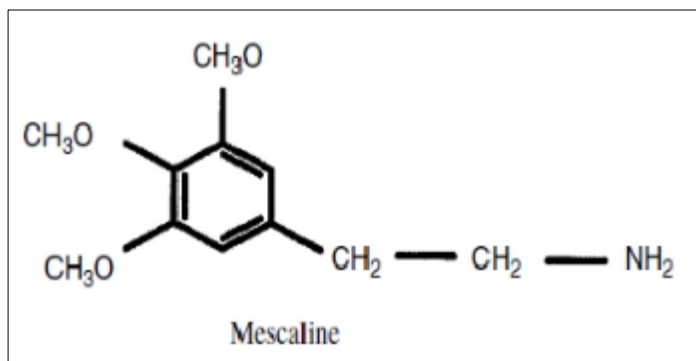


Figure 06 : Mescaline (Chini *et al.*, 1992).

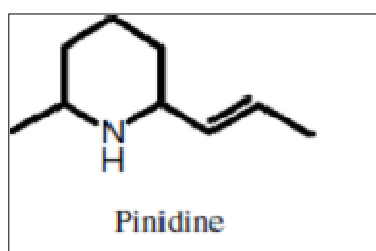


Figure 07 : Pinidine (Shakil, 1988).

III. Propriétés physico-chimiques

Le seul caractère unique qui distingue tous les alcaloïdes est probablement qu'ils contiennent de l'azote. En général, cet azote provient d'un acide aminé, est incorporé dans un noyau hétérocyclique et basique (Seigler, 2012).

Le caractère basique des alcaloïdes permet la formation de sels avec des acides minéraux (chlorhydrates, sulfates, nitrates) ou des acides organiques (tartrates, sulfamates et maléates). Les sels d'alcaloïdes sont généralement solubles dans l'eau et dans les alcools dilués, et ils ne sont, sauf dans de rares cas, pas solubles dans les solvants organiques. Les sels cristallisés peuvent être conservés assez bien et constituent la forme commerciale courante de ces composés (Jean 2008). La connaissance de la solubilité des alcaloïdes et de leurs sels revêtent une importance pharmaceutique considérable. Non seulement les substances alcaloïdes sont souvent administrées en solution, mais aussi les différences d'insolubilité entre les alcaloïdes et leurs sels fournissent des méthodes pour l'isolement des alcaloïdes de la plante et leur séparation des substances non alcaloïdes également présentes (Trease, 2009).

Les alcaloïdes sont caractérisés par une solubilité faible dans l'eau, facilement soluble dans l'alcool et peuvent donner des colorations spécifiques avec certains réactifs (réactifs de Mayer, de Dragendorff, de Wasicky, de Bouchardat). Ils exercent en générale de puissantes actions pharmacologiques. Les alcaloïdes ayant des masses moléculaires très variables de 100 à 900 g/mol. La plupart des bases non oxygénées sont liquides à température ordinaire celles qui comportent dans leur formule de l'oxygène sont des solides cristallisables, rarement colorés (Rakotonahary, 2012).

IV. Source des alcaloïdes

Les alcaloïdes se retrouvent principalement chez les végétaux (300 familles de plantes) présents dans n'importe quelle partie, ainsi les membres de la famille *Berberidaceae* (la berbérine et l'épiberbérine extraits de *Rhizoma coptis*) qui peut se rencontrer au niveau des racines, rhizomes, et dans l'écorce des tiges. Bien que certains composés spécifiques puissent être limités à une certaine partie, par exemple, la quinine dans l'écorce de cinchonatre (Stermitz *et al.*, 2000).

Bien que les alcaloïdes soient des produits typiquement des plantes, les recherches de dernière décennies ont montré qu'ils peuvent également être d'origine animale notamment chez les animaux terrestres, les insectes, les amphibiens, les reptiles, les oiseaux et les

mammifères, ainsi que chez les animaux marins tels que les éponges, les astéroïdes, les tuniciers, les scléractiniens et l'aiguillat. Cependant les alcaloïdes des animaux agissent généralement comme des composés défensifs et/ou signaux chimiques (phéromones). Parmi les plus étudiés la Bufoténine et bufoténidine (Braekman *et al.*, 1998).

De même, les recherches ont montré que les microorganismes (bactéries, champignons, microalgues) produisent des alcaloïdes. Toutefois, il existe très peu d'information à propos des alcaloïdes d'origine microbienne, les recherches sont basées pour la plupart sur les alcaloïdes extraites à partir des plantes.

V. Alcaloïdes des Actinobactéries

Les bactéries, notamment les actinobactéries, ne vivent pas de manière isolée dans l'environnement, mais plutôt dans des communautés microbiennes complexes qui interagissent, partagent et échangent des processus métaboliques et des signaux. Ces interactions microbiennes sont souvent caractérisées par une compétition pour des ressources limitées ou l'espace disponible et l'antagonisme, qui déclenchent l'activation de groupes de gènes silencieux, conduisant à la production de métabolites spécialisés bioactifs comme mécanismes de défense (Boon E *et al.*, 2014).

Le genre *Streptomyces* est le plus prolifique en ce qui concerne la production de métabolites secondaires. Plus de 50 % de tous les antibiotiques connus aujourd'hui sont produits par des représentants de ce genre, qui, jusqu'à récemment, ont été préférentiellement isolés de sources terrestres. Toutefois, des recherches récentes dans la culture d'espèces microbiennes marines, notamment *Streptomyces* et d'autres actinobactéries provenant de sédiments des profondeurs animaux marins ont permis d'isoler et de caractériser de nouveaux métabolites. Les bactéries marines sont une source riche et peu explorée de métabolites secondaires structurellement divers, dont beaucoup possèdent des activités biologiques uniques. Une grande partie de ces produits naturels sont représentés par des composés qui peuvent être classés comme des alcaloïdes (Boon E *et al.*, 2014). Il convient de noter que les alcaloïdes marins généralement isolés des éponges et des tuniciers marins peuvent, en fait, être synthétisés par des bactéries marines associées, y compris des actinobactéries (tableau IV) (Kim et Dewapriya, 2012).

Tableau IV : Alcaloïdes provenant d'actinobactéries d'origine marine

Alcaloïde	Sous classe	Espèce	Origine	Référence
TP-1161	Thiazolyl peptide	<i>Nocardioopsis sp.</i> De sédiment marin	Norvège	Engelhardt <i>et al.</i> , 2010a
Caerulomycin I	Bipyridine	<i>Actinoalloteichus cyanogriseus</i> De sédiment marin	Weihai en Chine	Fu <i>et al.</i> , 2011
Ammosamide D	Pyrroloquinoline	<i>Streptomyces variabilis</i> De sédiment marin	Non mentionné	Pan, Jamison, Yousufuddin, and MacMillan, 2012
Spiroindimicins	Bisindole	<i>Streptomyces sp.</i> De sédiment marin en eau profondes	Océan Indien	Zhang <i>et al.</i> , 2012
Venezuelins	Phenoxazine	<i>Streptomyces venezuelae</i> De sédiment marin	L'île de Guam dans l'océan pacifique	Ren <i>et al.</i> , 2013

VI. Propriétés pharmacologiques des alcaloïdes

Les alcaloïdes exercent généralement leur activités pharmacologiques sur les mammifères comme l'Homme leurs propriétés biologique, aussi variées que leurs structures, continuent à être bénéfiques dans les différentes maladies ou des dysfonctionnements de l'organisme humain (Hartmann et witte, 1995).

Les alcaloïdes présentent en fréquemment des propriétés pharmacologiques marquées

et ont de nombreuse utilisation thérapeutique, notamment au niveau de système nerveux central, du système nerveux autonome et du Système cardiovasculaire (Gazengel et Orecchioni, 2013).

Ils sont connus pour une variété d'activités biologiques et chacun ayant son propre mécanisme d'action spécifique. La plupart de ces mécanismes ont été prouvés, mais certains ont fait l'objet d'hypothèses. Nous abordons ici les activités biologiques importantes des alcaloïdes.

VI.1. Activité antimicrobienne

Les activités antibiotiques sont communes aux alcaloïdes et quelques un sont même utilisés comme antiseptiques en médecine (Cordell, 1983).

Il est généralement reconnu que les alcaloïdes ont de fortes propriétés antimicrobiennes. Les alcaloïdes ont une activité vis-à-vis des bactéries Gram positive (ex. *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*) et négative (ex. *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*). Ils possèdent également une activité antifongique (ex. *Candida albicans*, *Aspergillus niger*). Cette activité antimicrobienne des alcaloïdes est liée à la stéréochimie du cycle de carbone, à sa substitution aromatique et à son oxydation (Caron *et al.*, 1988.)

VI.2. Activité antioxydants

Un antioxydant est une substance ou un composé qui évite la détérioration, les dommages ou la destruction par le processus d'oxydation. Ces composés bioactifs confèrent une protection contre le stress oxydatif dans un organisme en bloquant ou en retardant les dommages oxydatifs causés par les espèces réactives de l'oxygène (ROS). Les antioxydants utilisent de multiples mécanismes pour éliminer les ROS tels que l'inhibition de la formation de radicaux libres, piégeant la molécule d'oxygène et chélatant les pro-oxydants métalliques (Soumya & Jayanthi, 2020).

VI.3. Activité anti-inflammatoire

L'inflammation est la réponse des tissus vivants vascularisés à une agression d'origine physique, chimique ou biologique dans le but d'assurer le maintien. Parfois elle peut être néfaste du fait de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, anomalies des régulations du processus inflammatoire, anomalie quantitative ou qualitative des cellules intervenant dans l'inflammation (Roussele *et al.*, 2005).

Les alcaloïdes font partie de la liste des anti-inflammatoire tels que:

La colchicine: Possède plusieurs mécanismes d'action qui affectent les processus anti-inflammatoires. Elle empêche l'assemblage des microtubules et perturbe ainsi l'activation de l'inflammasome, la chimiotaxie des cellules inflammatoires, la génération de leucotriènes et de cytokines et la phagocytose. Cet alcaloïde est utilisé dans la prévention et le traitement de l'arthrite goutteuse (Dalbeth *et al.*, 2014).

Au cours d'une étude menée par Ma et al (2017) ayant pour objectif la recherche de nouveaux produits naturels et bioactifs à partir d'Actinobacéries d'origine fécale pour une éventuelle activité anti-inflammatoire intestinale, une souche de *Streptomyces violaceoruber* (YIM101131) a été isolée des excréments d'*Equus burchelli* (Zébre). les extraits alcaloidiques obtenus possédaient une activité anti-inflammatoire après avoir examiné leur capacité à inhiber la production de l'oxyde nitrique (NO) dans les cellules macrophages RAW 264,7 stimulées par le lipopolysaccharide (LPS). De plus, Il a été prouvé que l'alcaloïde nommé "La cyclomarine" de *Streptomyces sp.* possède une activité anti-inflammatoire efficace dans des tests *in vivo* et *in vitro* (Ajitha et Gothandam, 2016).

Toutefois, à l'heure actuelle, très peu de travaux ont été consacrés à l'étude de l'activité antiinflammatoire intestinale d'origine microbienne. Des recherches supplémentaires sont nécessaire pour explorer les potentiels anti-inflammatoire des alcaloides microbien, notamment, les Actinobactéries isolées d'environnement particuliers et les exemples d'activités biologique sont résumés dans le tableau V et des composés isolé d'actinobactéries du genre *Nocardiosis* dans le tableau VI.

Tableau V : Exemples d'activités biologiques des alcaloïdes extraits à partir des actinobactéries

Molécules d'alcaloïdes	Sources	Distributions	Activités biologiques	Références
Streptovercillin, et le nouveau 2-azetidione, streptovercillinone alcaloïde carbazole	<i>Streptovercillium morookaense</i> .	Sud de la Chine	Activité antifongique	Na Feng <i>et al.</i> , 2007
2(1H)-Pyrazinones et Alkaloides diketopiperazine	Tunicier dérivé de Actinomycete <i>Streptomyces sp.</i>	Non mentionné	Activité cytotoxique	Lamiaa A. Shaala <i>et al.</i> , 2016
Dérivé de 3-acides phenylpropionique (1–3)l'alcaloïde diketopiperazine	Les Actinomycète de la mer rouge <i>Streptomyces coelicolor LY001</i>	Non mentionné	Activité antibactérienne	Lamiaa A. Shaala <i>et al.</i> , 2020
les strepchazolines A (1) et B (2) et la streptazoline (3),	actinomycètes marins, <i>Streptomyces chartreusis NA02069</i>	Côte de l'île de Hainan, Chine.	Activité antibactérienne acetylcholinestérase Activité inhibitrice	Cheng-Long Yang <i>et al.</i> , 2017
Iminimycin A	<i>Streptomyces griseus OS-3601</i>	Non mentionné	Activité antibactérienne Activité cytotoxique	Takuji Nakashima ¹ , <i>et al.</i> , 2016
Benhamycin	<i>Streptomyces sp.</i> Terrestre	Non mentionné	Activités antibactérienne et antifongique	Mohamed Shaaban <i>et al.</i> , 2007
Pimprinine	<i>Streptomyces CDRIL-312</i>	Non mentionné	Activité antimicrobienne	Naik SR <i>et al.</i> , 2001
Alcaloïde indolique et diketopiperazines	Dérivé marin fongique et antibactérien	Non mentionné	Cancer colorectal Cytotoxicité	Elin Julianti <i>et al.</i> , 2022
Alcaloïde de quinoléine 1 et cinq composés connus (2–6)	Dérivé marin fongique et antibactérien	Non mentionné	Activités antimicrobienne	Shouzheng Tian <i>et al.</i> , 2012
Deux nouveaux 4-alcaloïde aminoimidazole: Nocarimidazoles A and B	Dérivé marin Actinomycète de la <i>Genus Nocardiosis</i>	Non mentionné	Activité antibactérienne	Alain S. Leutou <i>et al.</i> , 2015
Trois nouveaux alcaloides indolocarbazole(1–3).	Dérivé marin <i>Nocardiosis f laveszens NA01583</i>	Non mentionné	Activité cytotoxique	Cheng Long Yang <i>et al.</i> , 2020
Alcaloïde indolique	<i>Streptomyces sp. MA37</i>	Legon, Ghana	Non mentionné	Fleurdeliz Maglangit <i>et al.</i> , 2020

Tableau VI. Composés isolé du *Nocardiosis* pendant mars 2018–2021 (Ting Shi *et al.*, 2022)

Types	Composés	Sources	Distributions	Activités biologiques	Références
Alcaloïdes	24	Dérivé marin <i>Nocardiosis</i> <i>sp.CNY-503</i>	Non mentionné	Non mentionné	Castro-Falcon <i>et al.</i> , 2018
	27	Sédiments marins dérivés de <i>N.flavescens</i> NA01583 (GenBank No.MT371575)	Hainan China	Cytotoxique	Yang CL <i>et al.</i> , 2020
	28, 29	Sédiments marins dérivés de <i>N.flavescens</i> NA01583 (GenBank No.MT371575)	Hainan Chine	Non mentionné	Yang CL <i>et al.</i> , 2020
	30	Sédiments marins <i>Nocardiosis</i> <i>sp.</i> SCA30(GenBank No. MT573349)	L'île Havelock	Activités antibactérienne et anti- cancer	Siddharth S <i>et al.</i> , 2021
	31,32	Eponge <i>Petrosia</i> <i>sp.</i> -dérivé <i>N.dassonvillei</i> SCSIO 40065(GenBank No.MW492395)	Mer de chine méridionale	antibactérienne et cytotoxique	Zhang X <i>et al.</i> , 2021
	33,34	Sédiments marins dérivés <i>N.dassonvillei</i> JS106 (GenBank No.MN416229)	Lianyungang, Chine	Activité Antiquorum sensing	Miao L <i>et al.</i> , 2021

VII. Applications des alcaloïdes

Les applications médicales des alcaloïdes ont conduit à la production de médicaments et leurs composants. Ils peuvent être basés sur des alcaloïdes naturels purs, comme dans le cas des extraits. Les alcaloïdes purifiés, composés partiellement et même totalement synthétisés sur la base de la structure de l'alcaloïde naturel, sont également utilisés. Les alcaloïdes modifiés chimiquement sont un autre exemple. La modification chimique de la structure affecte l'activité biologique. La tendance générale de la médecine moderne est de développer des composés biologiquement plus actifs que ceux que l'on trouve dans la nature. Cet objectif est atteint dans de nombreux cas par la modification et la synthèse d'alcaloïdes.

Les alcaloïdes ont un rôle important, comme principes actifs des médicaments, Ils sont utilisés soit tels quels, soit sous forme de dérivés plus actifs, ou manifestant des effets différents. Ils ont souvent servi de modèle pour imaginer de nouvelles molécules de synthèse. Par exemple la morphine reste le produit de référence des analgésiques (médicaments de la douleur). Son dérivé, la codéine (méthylmorphine), est un analgésique mais surtout un calmant de la toux à la morphine se rattachent également des alcaloïdes hémi-synthétiques comme la naloxone, utilisée dans le traitement des toxicomanies (JacquesE, 2016).

Partie pratique :
Matériel et Méthodes

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire mycologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la vie, Université de Bejaia ainsi qu'au laboratoire de l'animalerie durant la période de Mai à juin 2022.

I. Matériel

I.1 Matériels analytique

Le matériel, les milieux de culture et les solutions utilisées dans ce travail sont résumés en annexe I et II.

I.2 Matériel biologique

I.2.1 Souche d'actinobactérie

La souche d'actinobactérie P₂ (figure 08) étudiée dans ce travail a été aimablement fournie par Dr. DJINNI.I. Il s'agit d'une souche de *Streptomyces* isolée à partir d'un sol riche en plastique (rivage de Jijel).

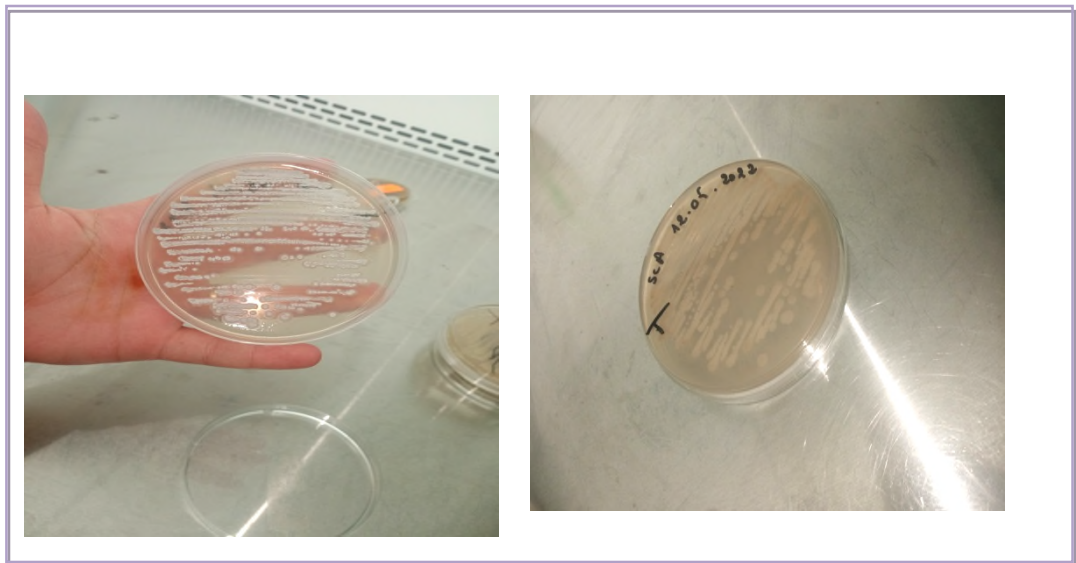


Figure 08 : Photographies de la souche P₂ sur milieu SCA

I.2.2 Souches cibles testées

Le tableau VII représente la liste des souches cibles testées pour les activités antibactériennes des extraits alcaloïdiques.

Tableau VII: Listes des souches cibles

Souches	Origine	Gram
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 258	Clinique/multirésistante aux antibiotiques	Négatif
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Référence ATCC [®] 700603	
<i>Vibrio cholerae</i>	Référence ATCC [®] 14035	
<i>Escherichia coli</i>	Référence ATCC [®] 25922	
<i>E. coli</i> O ₂₉ mcr1	Clinique/ résistante à la colistine <i>mcrI</i> positive	
<i>Salmonella Typhi</i>	ATCC 14028	
<i>Escherichia coli</i> oxa-48	Clinique multirésistante productrice de betalactamase OXA-48	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Clinique multirésistante productrice de betalactamase OXA-23	
<i>Escherichia coli</i> 94 ST (131)	Multirésistante productrice de betalactamase CTX-M15	
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13047	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	ATCC 25923	Positif
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 43300 Résistante à la méthicilline (SARM)	
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 23857	
<i>Candida albicans</i>	ATCC 90029	Levure

II. Méthodes

II.1. Mise en culture de P₂ et production des molécules actives

La souche P₂ a étéensemencée en stries serrées sur 25 boîtes de Pétri contenant le milieu de culture Starck Caséine Agar. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 7 jours.

II .2. Extraction des molécules actives des souches de P₂

Après 7 jours d'incubation à 28°C, l'extraction des alcaloïdes produits par la souche de *Streptomyces P₂* a été réalisée par macération selon le protocole de Naik SR, (2001) (figure 9).

- Le mycélium et les géloses sont découpés dans un erlenmeyer puis un volume de 500 ml d'acétate d'éthyle est rajouté.
- Le mélange est par la suite laissé macérer sous agitation pendant une nuit à température ambiante.
- L'extrait brut est récupéré puis filtré, à l'aide du papier Whatman N°1 puis évaporé à sec en utilisant un Rotavapor.
- A partir d'extrait brut sec ainsi obtenu un volume de 200ml de chloroforme a été ajouté suivi d'une évaporation de l'extrait pour une seconde fois pour obtenir un extrait d'alcaloïde.
- Récupération des alcaloïdes dans un solvant (méthanol) et le reste des molécules restantes dans du DMSO. La concentration massique d'extrait brut a été déterminée puis le flacon a été conservé à 4°C jusqu'à une utilisation ultérieure.

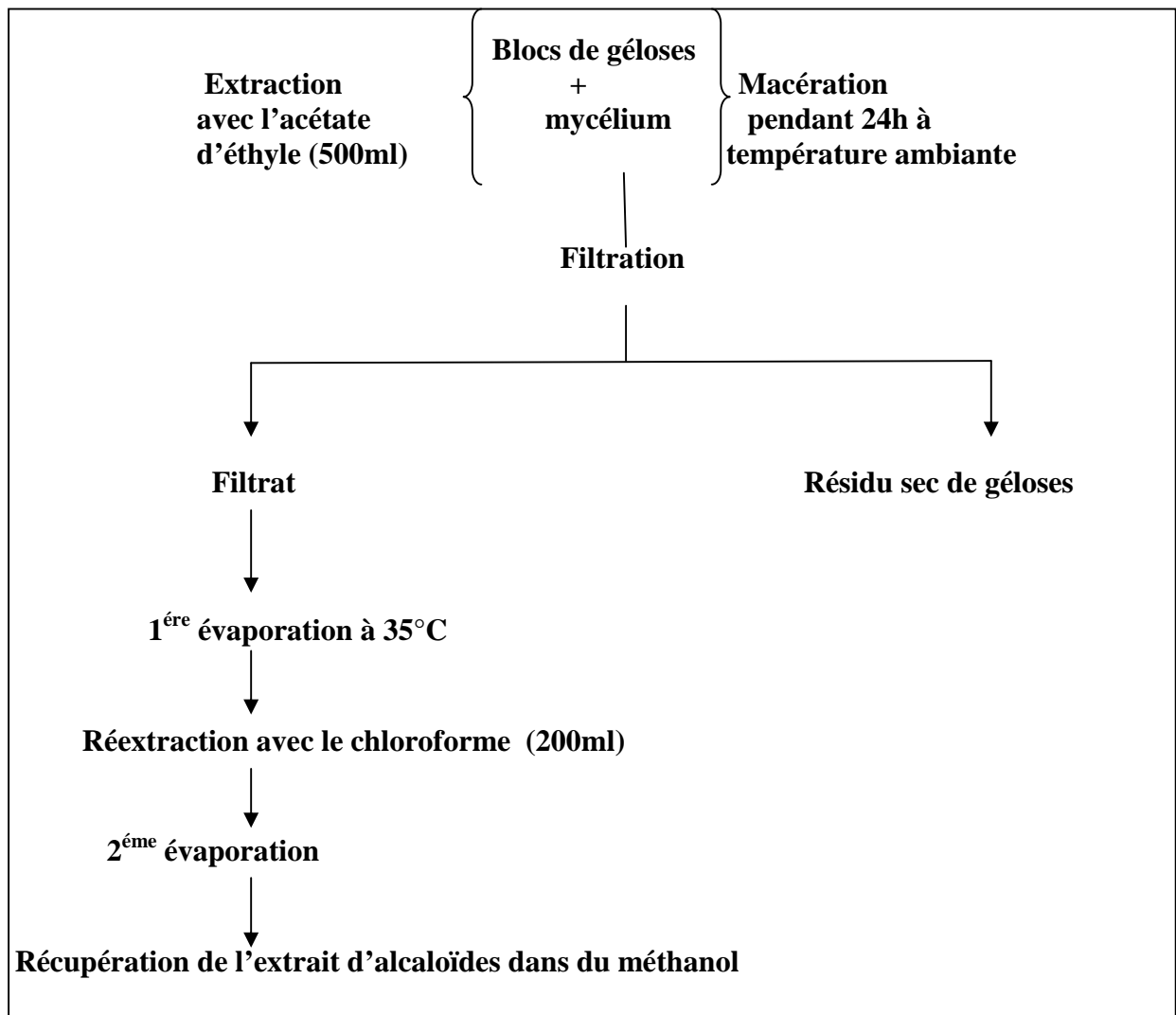


Figure 09 : Schéma de l'extraction d'alcaloïdes (Naik SR, 2001)

II.3. Détection de la présence des alcaloïdes

C'est une étape préliminaire, qui permet de s'assurer de la présence des alcaloïdes dans l'échantillon à analyser.

🚧 Principe de la méthode

- Suivant Badiaga (2011), la mise en évidence des alcaloïdes est basée sur leur capacité à former des précipités ou des complexes insolubles avec des métaux lourds et/ou des métalloïdes (bismuth, mercure, tungstène, iode...). Le réactif utilisé dans notre analyse est : Le tétraiodomercurate de sodium " réactif de Mayer" (qui donne des précipité blanc-jaune).
- 1ml de chaque extrait a été introduit dans deux épendorffs et 3 gouttes de réactif Mayer ont été ajoutées.
- L'apparition d'une couleur blanche montre la présence d'alcaloïdes dans l'extrait.

II.4. Étude de l'activité antibactérienne

II.4.1. Méthode des puits

➤ Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture fraîche de 18h à 24h, quelques colonies ont été prélevées à l'aide d'une pipette pasteur, et mises en suspension dans un tube de 9 mL d'eau physiologique. Après homogénéisation, la suspension obtenue a été standardisée à l'aide d'un spectrophotomètre (Vis-723G) pour une DO de 0.08 à 0.1 à 625 nm correspondant à 108 UFC/ml.

➤ Ensemencement

Des boîtes des Muller Hinton molle (1 % d'agar) de 4 mm d'épaisseur ont été ensemencées par la méthode d'écouvillonnage à partir des suspensions bactériennes standardisées d'environ 108 UFC/ml.

➤ Réalisation des puits

Des puits de 6 mm de diamètre ont été réalisés à l'aide d'un emporte-pièce (embout), une goutte de gélose blanche a été versée au fond des puits

Dans chaque puit, un volume de 70µl d'extrait alcaloïdique (Méthanol / DMSO) a été ajouté. Pour chaque boîte, des témoin négatifs contenant du DMSO ou du méthanol ont été utilisés et un témoin positif qui est un disque d'antibiotique (Gentamicine).

➤ **Incubation**

Les boîtes ont été incubées à 4°C pendant 4 heures afin de permettre la diffusion des extraits puis à 37°C/24 heures.

➤ **Lecture.**

La lecture des résultats de ce test se fait en mesurant le diamètre des zones d'inhibitions autour des puits. Le protocole expérimental suivi est représenté dans la figure 10.

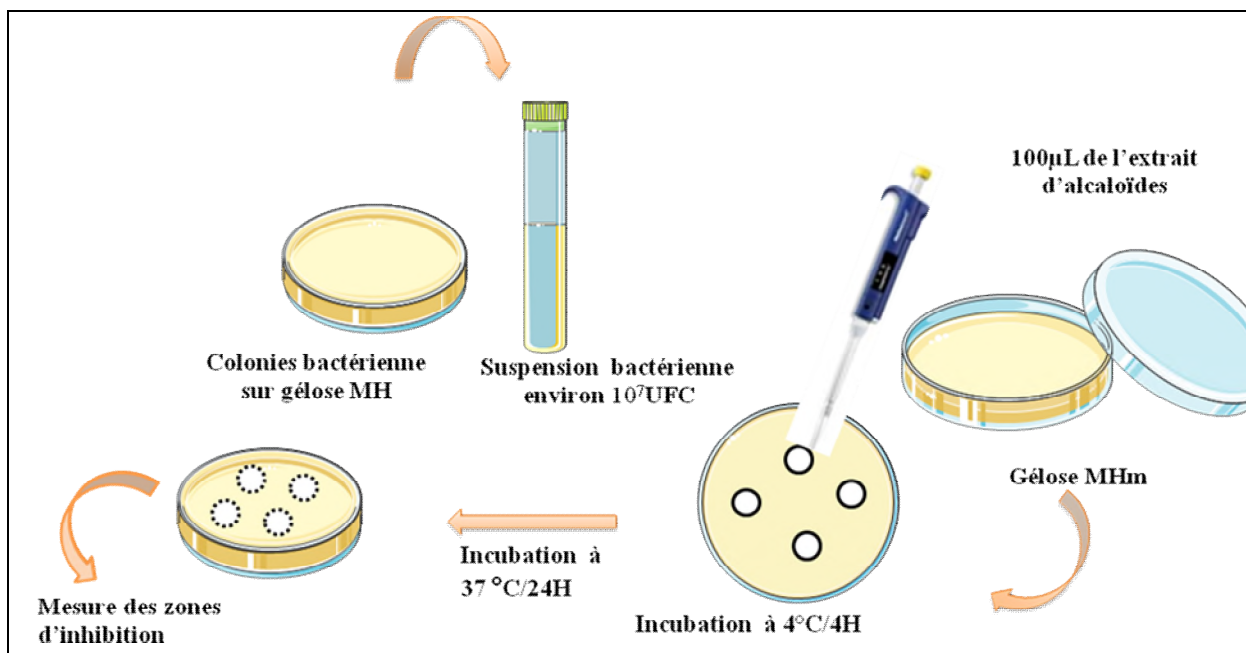


Figure 10 : Schéma du protocole expérimental suivi pour la détermination de l'activité antibactérienne (tests des puits).

II.4.2. Méthode de micro-dilution en milieu liquide

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme étant la plus faible concentration capable d'inhiber toute croissance bactérienne visible à l'œil nu, après un temps d'incubation de 18 à 24h (Martini, 1998). La méthode de micro-dilution en milieu liquide (MHB) a été utilisée sur des microplaques à fond incurvé de 96 puits.

Cette méthode est basée sur les étapes suivantes (**figure 11**)

❖ Standardisation de l'inoculum

Une suspension bactérienne a été standardisée à 10^8 UFC/ml comme précédemment décrit. Par la suite, une dilution 1/10 a été réalisée.

❖ Préparation de la microplaque

Un volume de 50µl de bouillon de Mueller-Hinton (MHB) a été distribué dans les 96 puits que contient la microplaque.

❖ Dilution

Afin d'obtenir des concentrations décroissantes des extraits alcaloïdiques (méthanoliques à $6,2 \cdot 10^{-2}$ mg/ml / DMSO à $0,12 \cdot 10^{-2}$ mg/ml), 50µl d'une solution de chaque extrait ont été prélevés puis mélangés aux 50µl de MHB contenus déjà dans la première cupule. Ensuite, 50µl du contenu de la première cupule ont été prélevés puis introduit dans la cupule adjacente et ainsi de suite. Ces dilutions permettent d'obtenir des concentrations décroissantes de l'extrait alcaloïdique à raison de 2.

Une rangée de puits ne contenant que du MHB est utilisée comme contrôle négatif afin de vérifier que le bouillon ne soit pas contaminé.

A partir de la suspension bactérienne standardisée à 10^7 ufc/ml, 50µl ont été déposés dans tous les puits de la microplaque qui est ensuite incubée à 37°C pendant 18 h.

Une rangée de puits ne contenant que du MHB estensemencée et est utilisée comme témoin afin de vérifier l'inoculum.

❖ Lecture :

Après incubation, la CMI correspond à la concentration du premier puits à partir duquel aucun trouble à l'œil nu n'a été observé. (Choukchou-Braham *et al.*, 2010).

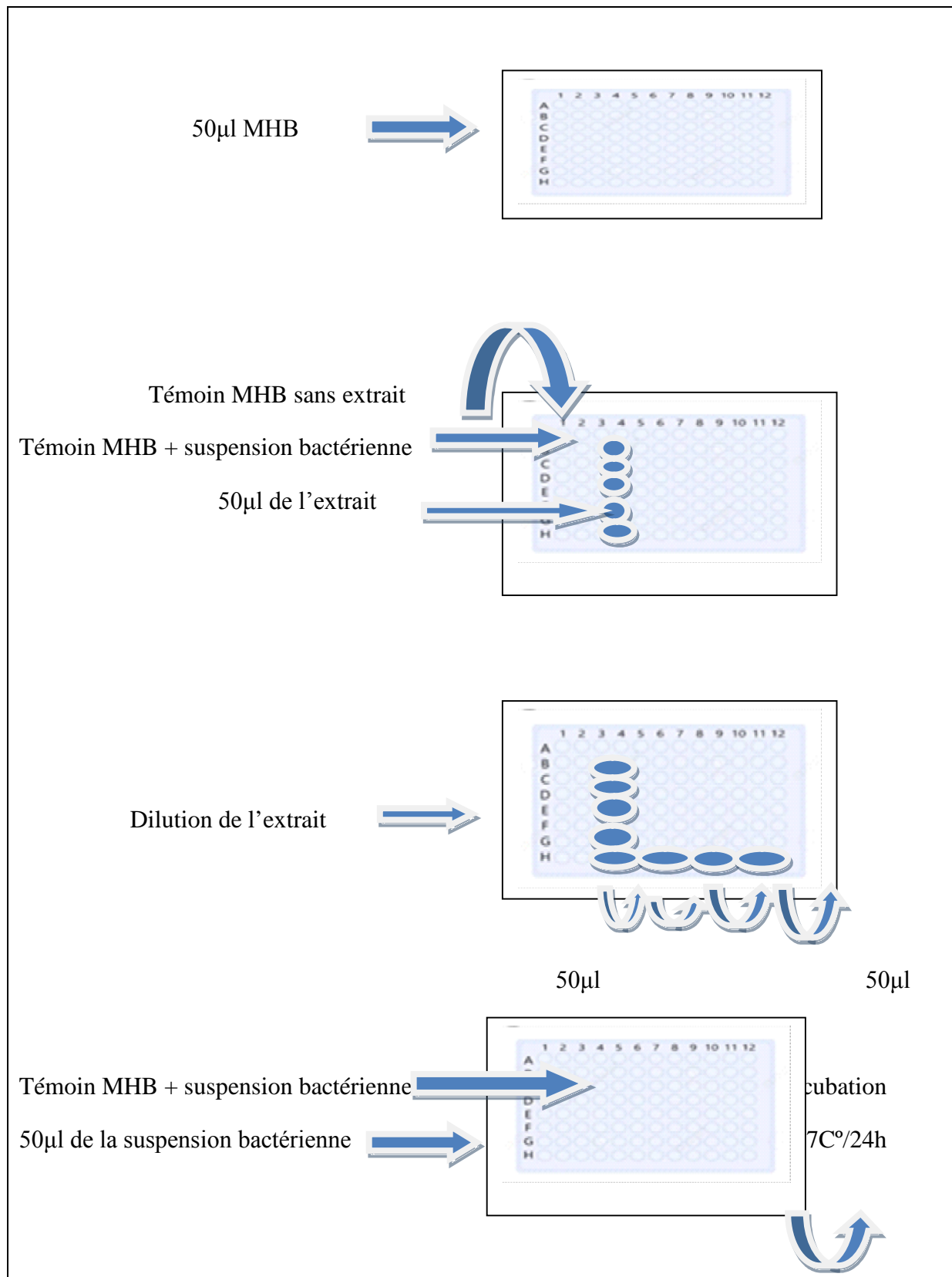


Figure 11 : Détermination des CMI par la méthode de micro-dilution sur microplaque

II. 5. Évaluation de l'activité antioxydants des extraits

Dans le présent travail, nous avons évalué les capacités totales antioxydants de l'extrait méthanolique et DMSO en utilisant la méthode spectrophotométrique à savoir :

L'activité anti-radicalaire pour le radical DPPH• (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl, DPPH).

II. 5. 1. Activité de piégeage du radical libre DPPH

Le DPPH (2,2 diphényl-1-picrylhydrazyl) est généralement le substrat le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydants en raison de sa stabilité en forme radical libre et la simplicité de l'analyse.

Le test consiste à mettre le radical DPPH (de couleur violette) en présence des molécules dites « antioxydants » afin de mesurer leur capacité à réduire ce radical (Figure 12). (Haddouchi *et al.*, 2016)

L'effet de l'antioxydant est proportionnel à la disparition du radical DPPH• et à la décoloration de la solution du violet au jaune.

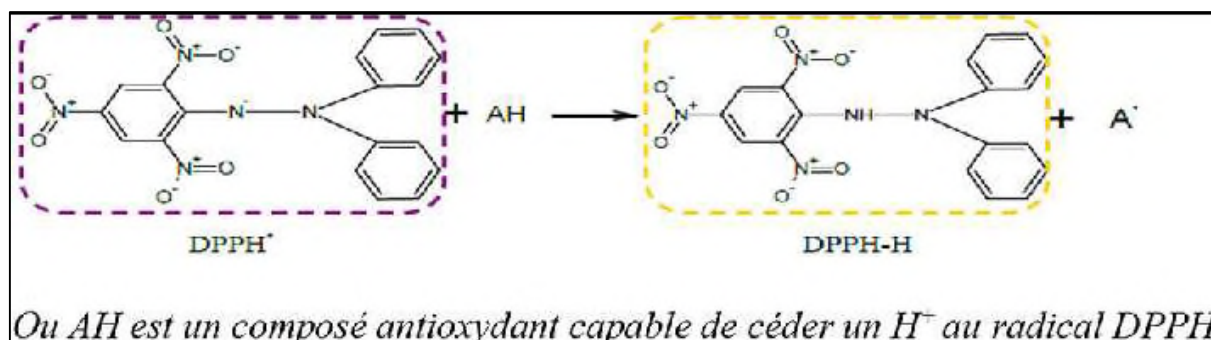


Figure 12 : Forme réduite du radical DPPH (Haddouchi *et al.*, 2016)

● Mode opératoire

L'activité anti-radicalaire envers le radical DPPH est mesurée selon la méthode de Sreenivasan *et al.*, (2007).

- À une seule concentration, 200µL de chaque extrait sont ajoutés à 1000µL d'une solution méthanolique de DPPH.

- Le mélange est soumis à une agitation au vortex, Après incubation à l'obscurité pendant 30 minutes et à la température ambiante.

- La lecture des absorbances est effectuée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Le blanc est représenté par le solvant d'extraction, et 1000µL de la solution méthanolique de DPPH
- Le pouvoir anti-radicalaire vis-à-vis le DPPH* est exprimé en pourcentage d'inhibition du radical, selon la formule suivante:

$$PI\% = \frac{Abs\ T - Abs\ Ech}{Abs\ T} \times 100$$

Où :

Abs témoin : Absorbance de témoin après 30 min.

Abs échantillon : Absorbance d'extrait après 30min.

Résultats et Discussion

I. Résultats et discussion

I.1. Détermination du rendement d'extraction et mise en évidence de la présence des alcaloïdes

Le rendement obtenu lors de l'extraction des alcaloïdes est montré dans le tableau VIII

Tableau VIII : rendement de l'extraction d'alcaloïdes après évaporation par le chloroforme.

Souche	Poids d'extrait sec	Correspondant
Actinobactéries	0,037mg /ml	3,7%

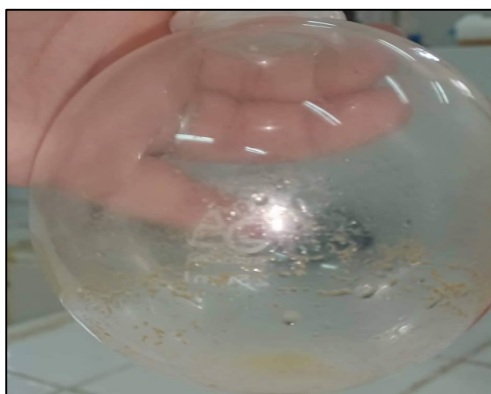


Figure 13 : Extrait sec obtenu après l'évaporation

La présence des alcaloïdes est mise en évidence par l'apparition d'un précipité (test de Meyer). Les résultats sont consignés dans le tableau IX et la figure 14.

Tableau IX : Résultats de test : Mayer

	Témoin	Extrait DMSO	Extrait méthanolique
Couleur	Blanc	jaune	Jaune
Réaction de précipitation	/	++	+

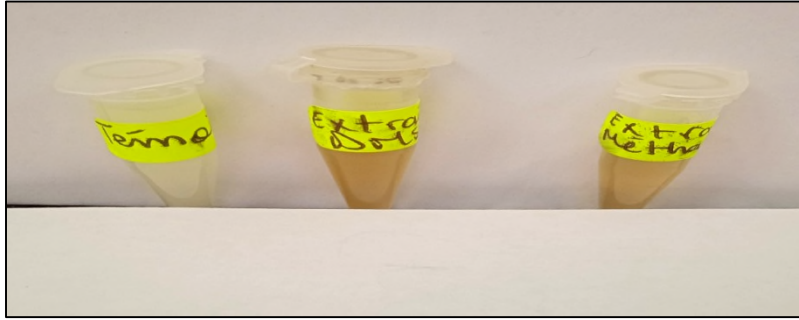


Figure 14: Photographie des résultats du test par le réactif de Mayer.

I.2. Résultats du test d'activité antimicrobienne

Selon les résultats du test des puits, aucune zones d'inhibition n'a été obtenues. Toutefois, les CMI obtenues par la méthode de microdilution étaient assez faibles allant $0,03\mu\text{g/ml}$ à $0,06\mu\text{g/ml}$. Les résultats sont montrés sur les figures (15 et 16) et résumés dans le tableau X.

Tableau X : Résultats des CMI d'extrait Méthanolique et DMSO d'alcaloïdes.

Espèces bactériennes	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	
	Extrait méthanolique (10^{-2})	Extrait DMSO (10^{-2})
<i>Escherichia coli oxa 48</i>	/	0,03
<i>Salmonella typhi</i>	> 6,2	0,06
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	6,2	> 0,12
<i>Vibrio cholerae</i>	/	0,06
<i>Escherichia Coli ATCC</i>	> 6,2	0,06
<i>Escherichia Coli 94 St (131)</i>	> 6,2	0,06
<i>SARM</i>	> 6,2	0,06
<i>Acinetobacter baumannii</i>	> 6,2	0,06
<i>Enterobacter cloacae</i>	> 6,2	0,06
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 258	> 6,2	0,06
<i>Escherichia coli O₂₉</i>	0,775	0,06
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,775	0,06
<i>Vibrio cholerae</i>	1,55	/
<i>Bacillus subtilis</i>	1,55	0,03
<i>Candida albicans</i>	< 6,2	<0,12

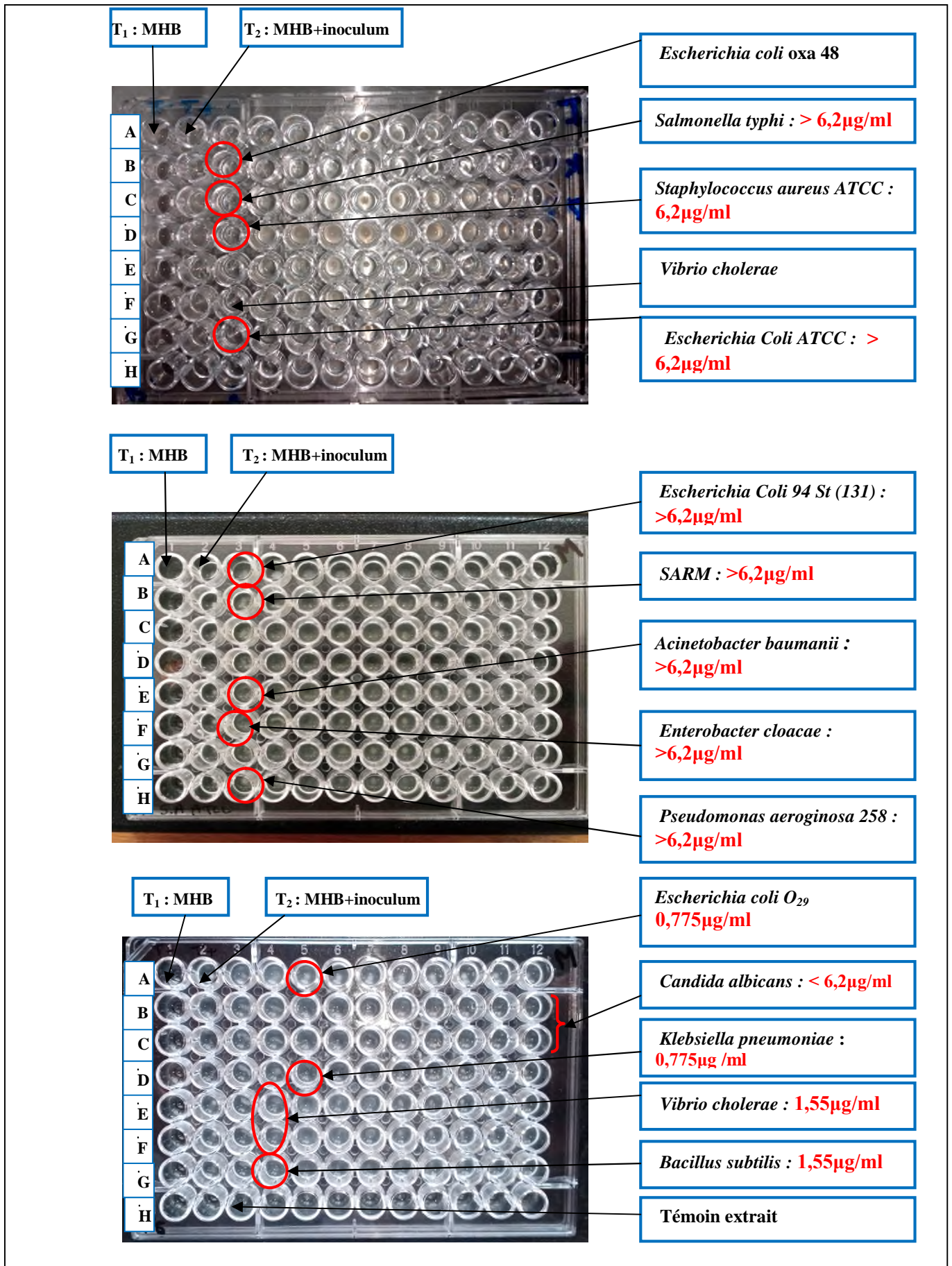


Figure 15 : Photographies des résultats des CMI de l'extrait méthanolique

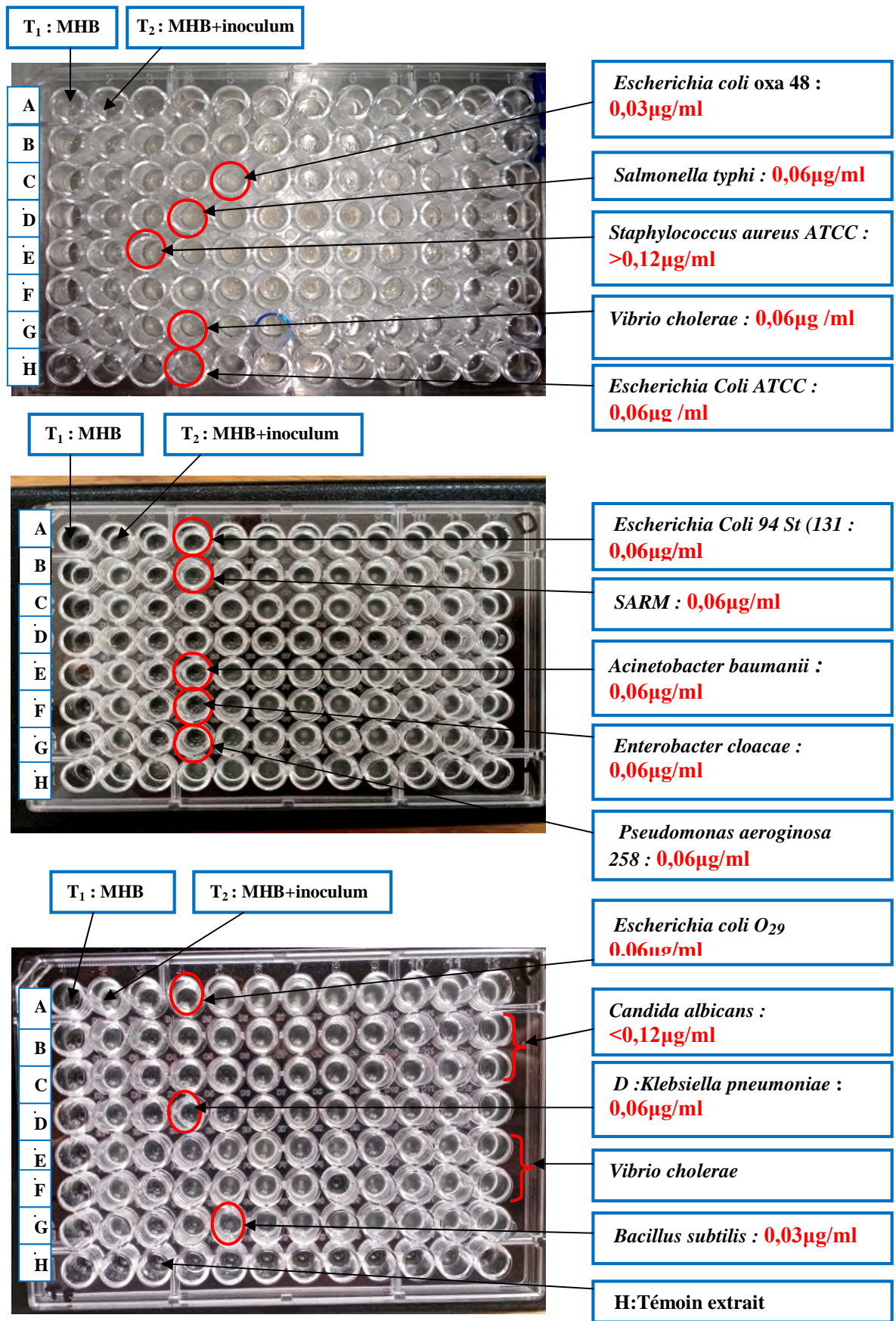


Figure 16 : Photographies des résultats des CMI de l'extrait DMSO.

I.3. Résultat de l'activité antioxydant

L'activité antioxydant de l'extrait alcaloïdique vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette (DPPH) à la couleur jaune (DPPH-H).

L'effet des antioxydants sur le radical DPPH est dû à leur capacité à donner des hydrogènes. Dans ce test aucun changement de couleur n'est observé. Toutefois, pas de réaction de réduction et donc la forme non radicalaire DPPH-H n'est pas formée.

Les résultats du test DPPH présentés dans Le tableau XI indiquent que les deux extraits alcaloïdiques (méthanol et DMSO) ne réduisent pas le radical DPPH. le pourcentage d'inhibition est très faible (32% et 9% respectivement) relativement aux concentrations des deux extraits qui sont aussi faible. Tandis que, les deux extraits ne contiennent pas un antioxydant qui réduira le radicale DPPH en DPPH-H, c'est-à-dire absence de transfert d'hydrogène. Les valeurs des absorbances ont été mesurées avec le spectrophotomètre ensuite les pourcentages d'inhibitions ont été calculés.

Tableau XI : Résultats du test DPPH

Extraits	Concentrations	Pourcentages d'inhibitions	Couleurs
Méthanolique	$6,2 \cdot 10^{-2}$ mg/ml	32%	(-)
DMSO	$1,2 \cdot 10^{-3}$ mg/ml	9%	(-)

II. Discussion

Les actinobactéries sont connues particulièrement pour leur richesse et leur diversité en métabolites secondaires. Elles sont potentiellement intéressantes pour la découverte de nouveaux antibiotiques. Toutefois, peu d'études ont été menées sur l'activité antimicrobienne des alcaloïdes produites par celles-ci. L'objectif de ce travail était donc d'évaluer l'activité antimicrobienne et antioxydants d'extraits alcaloïdiques d'une souche de *Streptomyces* isolée de rivage.

L'activité antimicrobienne par le test des puits des extraits alcaloïdiques récupérés à partir du méthanol ou du DMSO n'a révélé aucune zone d'inhibition. L'absence d'activité antibactérienne ou antifongique ne signifie pas forcément que la substance est absente ou pas assez active, mais cela peut être dû à une mauvaise diffusion de celle-ci, dans le milieu, car n'étant pas polaire ou bien constituée de composés non polaires (Lemriss, 2003). Alors que le test de microdilution sur milieu liquide a permis de constater que l'extrait DMSO ($0,12 \cdot 10^{-2} \mu\text{g/ml}$) ainsi que l'extrait méthanolique ($6,2 \cdot 10^{-2} \mu\text{g/ml}$) ont montré une activité antibactérienne aussi bien sur les souches Gram positives que Gram négatives. En effet, la souche cible la plus sensible à l'égard de l'extrait DMSO était *E. coli* OXA-48 et *Bacillus subtilis* avec une CMI de $0,03 \mu\text{g/ml}$. Concernant l'extrait méthanolique, la souche la plus sensible était *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli* O₂₉ avec des CMI de $0,775 \mu\text{g/ml}$, suivi de *Bacillus subtilis*, *E. coli* O₂₉ et *Vibrio cholerae* avec des CMI de $1,55 \mu\text{g/ml}$. Alors qu'aucune activité n'a été révélée contre la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Candida albicans*. Les résultats montrent clairement que les activités antimicrobiennes des deux extraits alcaloïdiques repris dans du méthanol ou du DMSO diffèrent d'un germe cible à un autre et d'un extrait à un autre. Ce qui peut être expliqué par la variation de la composition chimique des molécules produites par la souche étudiée (Boudjouref, 2011).

Les travaux menés par Shaaban *et al* (2007) sur l'effet antibactérien d'un nouvel alcaloïde nommé "benhamycine" extrait à partir d'une souche de *Streptomyces sp* NR12 isolée du sol, ont rapporté un effet antibactérien et antifongique par la méthode de diffusion sur gélose vis-à-vis des souches cibles suivantes: *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger*, avec une activité légèrement supérieure comparé à l'extrait brut de la souche. Tandis qu'une autre étude souligne une faible activité antimicrobienne de la pimprinine, alcaloïde extrait à partir de la souche de *Streptomyces* C DRIL-312 (Naik SR *et al.*, 2001). L'activité antimicrobienne des alcaloïdes reste plus faible que celle de

l'extrait brut qui est un mélange de métabolites secondaires, notamment, les antibiotiques.

D'autres travaux ont mis en évidence l'activité antimicrobienne des alcaloïdes par la méthode de microdilution sur milieu liquide. Ainsi, une étude menée par Wence Jiao *et al* (2013) a permis découvrir un nouvel alcaloïde, la xinghaiamine A, extrait d'une souche actinobactérie d'origine marine, *Streptomyces xinghaiensis* NRRL B24674T. La xinghaiamine A a présenté des activités antibactériennes à large spectre contre les agents pathogènes hospitaliers persistants exemple *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*

Cependant, une autre étude a rapporté une faible activité antimicrobienne d'un alcaloïde isoquinoléique extrait de *Streptomyces sp.* 8812. JS-1 contre les bactéries Gram-négatives, comme *Bordetella bronchiseptica*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Proteus vulgaris*, *P. mirabilis*, *Burkholderia cepacia* et *Acinetobacter baumannii*, avec des valeurs de CMI de 10-160µg/ml, et contre les bactéries Gram-positives, telles que *Staphylococcus aureus*, avec des valeurs de CMI de 40-206µg/ml (Solecka *et al.*, 2009).

Les résultats de l'étude de l'activité antioxydant montrent que les deux extraits alcaloïdiques (méthanol ou DMSO) ne réduisent pas le radical DPPH. Ainsi, le pourcentage d'inhibition est très faible (32% et 9%). Le pourcentage d'inhibition du DPPH augmente avec la concentration d'extrait, jusqu'à un seuil où le pourcentage d'inhibition se stabilise avec l'élévation de la concentration des extraits.

Cette activité est relativement faible en comparaison à d'autres études menées sur des extraits bruts d'actinobactéries d'origine marines telles que celle réalisées par Jemimah *et al.*, (2015), Saurav et Kannabiran (2014), Thenmozhi et Kannabiran (2012) dont les valeurs ont été estimées à 85%, 59,32%, 43,20%, respectivement. Par ailleurs, la capacité réductrice d'un composé peut servir d'indicateur significatif de son activité antioxydant potentielle (Hsu *et al.*, 2006).

Conclusion et Perspectives

Conclusion

Ce travail avait pour objectif l'étude de l'activité antimicrobienne et antioxydant des extraits d'alcaloïdes d'une souche d'actinobactéries P₂ isolée à partir de rivage. Au vu des résultats obtenus un certain nombre de conclusion peuvent être tirées :

- Les extraits alcaloidiques (méthanolique, DMSO) obtenus á partir de la souche d'actinobactérie présentent une activité antimicrobienne sur les souches bactériennes testés á Gram positif (*Bacillus subtilis*) et á Gram négatif (*Escherichia coli* OXA-48 et *Vibrio cholerae*) avec la méthode de microdilution avec des CMI de 0,03µg/ml, 0,775µg/ml 1,55µg/ml respectivement. Tandis que la méthode des puits n'a révélé aucuns résultats.

- Les extraits alcaloidiques possèdent une activité antioxydant avec un pourcentage d'inhibition (32% et 9%).

En Algérie, les milieux marins sont peu explorés et demeurent une bonne approche pour caractériser de nouvelles souches d'actinobactéries et ainsi de nouvelles molécules bioactives y compris les alcaloïdes. Selon notre étude, les alcaloides extraits á partir de la souche d'actinobactérie étudiée ont une activité antibactérienne á l'égard de souches bactériennes multirésistantes aux antibiotiques. Ainsi, les alcaloides peuvent être une alternative potentielle dans le traitement des infections bactériennes due aux souches multirésistantes.

En outre, le fait que les alcaloïdes naturels peuvent avoir différents mécanismes d'action sur une même bactérie, ceci minimise le phénomène de résistance á ces molécules. Des modifications synthétiques de ces molécules naturelles peuvent également générer de nouveaux composés ayant une meilleure activité antibactérienne.

Les résultats de ces travaux sont intéressants, mais l'étude reste incomplète et laisse lieu á d'innombrables perspectives á envisager á savoir :

- Extraction d'une plus grande concentration d'alcaloides et ce á partir d'une plus grande quantité de biomasse bactérienne. Ce qui n'a pas été possible lors de notre étude vu les conditions.
- Purification et caractérisation structurales des molécules d'alcaloides
- Tester d'autres activités biologiques telles que les activités : antifongique, antivirale, anti-inflammatoires ect

- Réaliser des tests d'activité antibactérienne en associant des antibiotiques avec les extraits alcaloidiques.
- Réaliser des tests d'activités en comparant entre l'extrait brut d'alcaloïde et l'extrait alcaloidique.

Références Bibliographiques

A

- **Aboul-enein HY., Ali I. (2000).** Macrocyclic antibiotics as effective chiral selectors for enantiomeric resolution by liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Chromatographia* 52, 679–691. <https://doi.org/10.1007/BF02490991>.
- **Ahmed, Shakil. 1998.** « Isolation and Structural Elucidation of Chemical Constituents from *Fumaria Indica*, *Ferula Oopoda* and *Withania Somnifera* ». Thesis, University of Karachi Karachi. <http://pr.hec.gov.pk/jspui/handle/123456789/3042>.
- **Ajitha G and Gothandam KM (2016):** Ocean Dwelling Actino-bacteria as Source of Antitumor compounds." *Brazilian Archives of Biology and Technology* 59.
- **Anandan R., Dharumadurai D., Manogaran G.P.(2016).** An Introduction to Actinobacteria. In: Dhanasekaran D., Jiang Y. (eds) *Actinobacteria: Basics and Biotechnological Applications*. Intech, Rijeka, Pp. 3-37
- **Aniszewski, T. (1994).** The biological basis of quinolizidine alkaloids. *Science of Legumes*, 1: 1–24.
- **Aniszewski, T. (2015).** *Alkaloids: chemistry, biology, ecology, and applications*: Elsevier.2nd
- **Aniszewski, T.(2007).**Alkaloids-Secrets of life alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role.1^{ère} edition. ELSEVIER. pp 316.

B

- **Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Meier-Kolthoff JP, Klenk HP, Clément C, Ouhdouch Y, van Wezel GP. (2016).** Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2015 Nov 25;80(1):1-43. doi: 10.1128/MMBR.00019-15. Erratum in: *Microbiol Mol Biol Rev.* Nov 9;80(4):iii. PMID: 26609051; PMCID: PMC4711186.
- **Belyagoubi L. (2014).** Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. Thèse de doctorat. Université de tlemcen.<http://dspace.univ-tlemcen.dz/handle/112/5635>.
- **Boon Eva,** Conor J. Meehan, Chris Whidden, Dennis H.-J. Wong, Morgan G.I. Langille, Robert G. Beiko, *Interactions in the microbiome: communities of organisms and communities of genes*, *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 38, Issue 1, January 2014, Pages 90–118.

Les références bibliographiques

- **Boudjellal-bencheikh F. (2012).** Taxonomie et antagonisme des actinomycètes halophiles d'origine saharienne et caractérisation des composés bioactifs sécrétés par *Actinoalloteichus* sp. AH97. Thèse de doctorat en sciences agronomiques, Ecole nationale supérieure agronomiques El-harrach, Alger.
- **Boudjouref. M. (2011).** Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L. Thèse de magister. Université Ferhat Abbas, Sétif.
- **Braekman, J, C., Dalaz, D. and Pasteels, J, M. (1998).** Alkaloids in Animals. In : *Alkaloids : Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications*. New York : Roberts and Wink. 1. 349-378.
- **Bruneton J.(1999).** Pharmacognosie, Phytochimie et plantes médicinales. Edition Technique et Documentation, 1120 pp. Doctorat de Biologie. Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, Tlemcen, 90 p.

C

- **C Azevedo, B., Roxo, M., C Borges, M., Peixoto, H., Crevelin, E. J., W Bertoni, B., . . . S Pereira, A. M. (2019).** Antioxidant activity of an aqueous leaf extract from *Uncaria tomentosa* and its major alkaloids mitraphylline and isomitraphylline in *Caenorhabditis elegans*. *Molecules*, 24(18), 3299.
- **Caron, C., Hoizey, M. J., Le Men-Olivier, L., Massiot, G., Zeches, M., Choisy, C., Le Magrex, E. and Verpoorte, R. 1988.** Antimicrobial and antifungal activities of quasi-dimeric and related alkaloids. *Planta Medica*, 409–412.
- **Castro-Falcon, G.; Millan-Aguinaga, N.; Roullier, C.; Jensen, P.R.; Hughes, C.C.** Nitrosopyridine probe to detect polyketide natural products with conjugated alkenes: Discovery of novodaryamide and nocarditriene. *ACS Chem. Biol.* **2018**, 13, 3097–3106.[CrossRef].
- **Chini, C.; Bilia, A. R.; Keita, A. and Morelli, I. (1992).** Protoalkaloids from *Boscia angustifolia*. *Planta Medica*, **58**: 476-530.
- **Cordell, G.A. 1983.** Introduction to Alkaloids : A Biogenic Approach, Wiley, New York.
- **Cushnie,T,P,T.,Cushnie,B. and Lamb, A, J. (2014).** Alcaloids : An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *International journal of Antimicrobial Agent*, 44(2-6) : 377-386

D

- **Dalbeth N, Lauterio TJ, Wolfe HR.** Mechanism of action of colchicine in the treatment of gout. *Clin Ther.* 2014 Oct 1;36(10):1465-79.
- **Dastager. S.G, Damare. S., (2013).** Marine actinobacteria showing phosphate-solubilizing efficiency in Chorao Island, Goa, India. *Curr.Microbiol.* 66(5): 421-427
- **Devereaux Andrea L, Susan L. Mercer, et Christopher W. Cunningham. 2018.** « DARK Classics in Chemical Neuroscience: Morphine ». *May 14, 2018*, 13.
- **Djinni I, Defant A, Kecha M, Mancini I.** Actinobacteria Derived from Algerian Ecosystems as a Prominent Source of Antimicrobial Molecules. *Antibiotics (Basel).* 2019 Oct 1;8(4):172. doi: 10.3390/antibiotics8040172. PMID: 31581466; PMCID: PMC6963827.
- **Dr. Lucie, Cahlíková, et Dr. Jakub. 2022.** « Alkaloids and Their Synthetic Derivatives as Inspiration for Medicinal Chemistry », sect. *Natural Products Chemistry.*

E

- **Eguchi R, Ono N, Hirai Morita A, Katsuragi T, Nakamura S, Huang M, Altaf-Ul-Amin M, Kanaya S.** Classification of alkaloids according to the starting substances of their biosynthetic pathways using graph convolutional neural networks. *BMC Bioinformatics.* 2019 Jul 9;20(1):380. doi: 10.1186/s12859-019-2963-6. PMID: 31288752; PMCID: PMC6617615.
- **Engelhardt, K., Degnes, K. F., Kemmler, M., Bredholt, H., Fjaervik, E., Klinkenberg, G., et al. (2010a).** Production of a new thiopeptide antibiotic, TP-1161, by a marine *Nocardioopsis* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 4969–4976.

F

- **Feng N, Ye W, Wu P, Huang Y, Xie H, Wei X.** Two new antifungal alkaloids produced by *Streptovercillium morookaense*. *J Antibiot (Tokyo).* 2007 Mar;60(3):179-83. doi: 10.1038/ja.2007.19. PMID: 17446689.
- **Fu, P., Wang, S., Hong, K., Li, X., Liu, P., Wang, Y., et al. (2011).** Cytotoxic bipyridines from the marine-derived actinomycete *Actinoalloteichus cyanogriseus* WH1-2216-6. *Journal of Natural Products*, 74, 1751–1756.
- **Funayama, S., & Cordell, G. A. (2014b).** *Alkaloids: a treasury of poisons and medicines*: Elsevier.

G

- **GazengeL JM., Orecchioni AM.,(2013).** *Le préparateur en pharmacie –Guide théorique et pratique.* 2éme ed. Ed. Tec et Doc, Paris. France. 1443 p.

- **Genilloud O, González I, Salazar O, Martín J, Tormo JR, Vicente F.** Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2011 Mar;38(3):375-89. doi: 10.1007/s10295-010-0882-7. Epub 2010 Oct 8. PMID: 20931260.
- **George M.,Anjumol A.,Mohamed Halta A.A.2012.**Distribution and bioactive potential of soil actinomycetes from different ecological habitats.*African Journal of Microbiology Research* 6 (10) :2265-2271.
- **Gottlieb D. (1973).** General consideration and implication of the *Actinomycetales*. In: *Actinomycetales* characteristics and practical importance. Edited by Sykes. G and F. Skinner. Academic Press. London, New York.

H

- **Hartmann Thomas, et Witte Ludger. 1995.** «Chemistry, Biology and Chemoecology of the Pyrrolizidine Alkaloids». In *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*, 9:155- 233. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-042089-9.50011-5>.
- **Hassan. U. S. S, Anjum. K, Abbas. S. Q, Akhter. N, Shagufta. B. I, Shah. S. A. A, Tasneem .U., (2017).** Review Emerging biopharmaceuticals from marine actinobacteria. *Environmental Toxicology and Pharmacology*; 49: 34–47.
- **Hochvaldová L, Panáček D, Válková L, Pucek R, Kohlová V, Večeřová R, Kolář M, Kvítek L, Panáček A.** Restoration of antibacterial activity of inactive antibiotics via combined treatment with a cyanographene/Ag nanohybrid. *Sci Rep.* 2022 Mar 25;12(1):5222. doi: 10.1038/s41598- 022-09294-7. PMID: 35338239; PMCID: PMC8956642.
- **Hsu et al., 2006, Hsu B., Coupar IM., Ng K. (2006)** .Antioxidant Activity of Hot Water Extract from the Fruit of the Doum palm, *Hyphaenethebaica*. *Food. Chem.* 98, 17-328.
- **Huttner A, Harbarth S, Carlet J, Cosgrove S, Goossens H, Holmes A, Jarlier V, Voss A, Pittet D.** Antimicrobial resistance: a global view from the 2013 World Healthcare-Associated Infections Forum. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2013 Nov 18;2:31. doi: 10.1186/2047-2994-2-31. PMID: 24237856; PMCID: PMC4131211.

J

- **JacquesE, POISSON.** s. d. « Alcaloides ». In . Consulté le 22 mars 2016. <http://www.universalis.fr/encyclopedie/alcaloides>.

Les références bibliographiques

- **Jean, BRUNETON. 2008.** Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants (2e Ed. - Retirage Broch"). Lavoisier.
- **Jemimah Naine S., Devi S., Mohanasrinivasan ., Vaishnavi B. (2015),** Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activity of Marine *Streptomyces parvulus* VITJS11 Crude Extract. Braz .Arch .Biol .Technol . 58, 198-207.
- **Jolanta, Solecka, Rajnisz Aleksandra, et Laudy Agnieszka E. 2009.** « A novel isoquinoline alkaloid, DD-carboxypeptidase inhibitor, with antibacterial activity isolated from *Streptomyces* sp. 8812. Part I: Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities ». 28 August 2009.
- **Julianti E, Abrian IA, Wibowo MS, Azhari M, Tsurayya N, Izzati F, Juanssilfero AB, Bayu A, Rahmawati SI, Putra MY.** Secondary Metabolites from Marine-Derived Fungi and Actinobacteria as Potential Sources of Novel Colorectal Cancer Drugs. Mar Drugs. 2022 Jan 12;20(1):67. doi: 10.3390/md20010067. PMID: 35049922; PMCID: PMC8777761.

K

- **Kim, S. K., & Dewapriya, P. (2012).** Bioactive compounds from marine sponges and their symbiotic microbes: A potential source of nutraceuticals. Advances in Food and Nutrition Research, 65, 137–151.
- **Kitouni M. (2007).** Isolement de bactéries *Actinomycétales* productrices d'antibiotique à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse de Doctorat de Microbiologie Appliqué. Université Mentouri- Constantine, Faculté des sciences de la nature et de la vie, Constantine, 176p.
- **Kurek, J. (2019).** Alkaloids- their Importance in Nature and for Human life. Intechopen P.1-9.

L

- **Lam KS. (2006).** Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. Curr.Opin. Microbiol. 9, 245–251.
- **Larpent JP, Sanglier JJ. (1989).** Biotechnologie des antibiotiques. Edition : Masson. Paris : 481p.
- **Lemriss S, Laurent F, Couble A, Casoli E, Lancelin JM, Saintpierre-Bonaccio D, Rifai S, Fassouane A, Boiron P.** Screening of nonpolyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes. Can J Microbiol. 2003 Nov;49(11):669-74. doi: 10.1139/w03-088. PMID: 14735216.

- **Leutou AS, Yang I, Kang H, Seo EK, Nam SJ, Fenical W.** Nocarimidazoles A and B from a Marine-Derived Actinomycete of the Genus Nocardioopsis. *J Nat Prod.* 2015 Nov 25;78(11):2846-9. doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b00746. Epub 2015 Oct 16. PMID: 26474119

M

- **Ma J, Lei H, Chen X, Bi X, Jiang Y, Han L, Huang X.** New anti-inflammatory metabolites produced by *Streptomyces violaceoruber* isolated from *Equus burchelli* feces. *J Antibiot (Tokyo).* 2017 Oct;70(10):991-994. doi: 10.1038/ja.2017.75. Epub 2017 Jul 12. PMID: 28698676.
- **Maglangit F, Fang Q, Kyeremeh K, Sternberg JM, Ebel R, Deng H.** A Co-Culturing Approach Enables Discovery and Biosynthesis of a Bioactive Indole Alkaloid Metabolite. *Molecules.* 2020 Jan 8;25(2):256. doi: 10.3390/molecules25020256. PMID: 31936318; PMCID: PMC7024260.
- **Mahyudin NA., Blunt JW., Cole ALJ., Munro MHG. (2012).** The isolation of a new S-methyl benzothioate compound from amarine derived *Streptomyces* sp. *J Biomed Biotechnol.*, doi:10.1155/2012/894708.
- **Manivasagan. P, Venkatesan. J, Sivakumar. K, Kim.S.K., (2013).** Marine actinobacterialmetabolites:current status and future perspectives. *Microbiol.Res;*168(6): 311–332.
- **Martini, N., & Eloff, J. N. (1998).** The preliminary isolation of several antibacterial compounds from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 62(3).
- **Maskey RP., Li FC., Qin S., Fiebig HH., Laatsch H. (2003a).** Chandrananimycins A-C: production of novel anticancer antibiotics from a marine *Actinomadura* sp. isolate M048 by variation of medium composition and growth conditions. *J Antibiot.*, 56:622–629.
- **Maxson T, Mitchell D (2016)** Targeted treatment for bacterial infections: prospects for pathogen-specific antibiotics coupled with rapid diagnostics.*Tetrahedron* 72(25):3609–3624.
- **Miao, L.; Qian, S.; Qi, S.; Jiang,W.; Dong, K.** Culture medium optimization and active compounds investigation of an anti-quorum sensing marine actinobacterium *Nocardioopsis dassonvillei* JS106. *Microbiology* **2021**, 90, 112–123. [[CrossRef](#)]
- **Muster, D.(2005).** Médicaments de l'inflammation. *EMC-Stomatologie*, 1(2-3) :21 29.

N

- **Naik SR, Harindran J, Varde AB.** Pimprinine, an extracellular alkaloid produced by *Streptomyces* CDRIL-312: fermentation, isolation and pharmacological activity. *J*

Biotechnol. 2001 Jun 1;88(1):1-10. doi: 10.1016/s0168-1656(01)00244-9. PMID: 11377760.

- **Nakashima T, Miyano R, Iwatsuki M, Shirahata T, Kimura T, Asami Y, Kobayashi Y, Shiomi K, Petersson GA, Takahashi Y, Ōmura S.** Iminimycin A, the new iminium metabolite produced by *Streptomyces griseus* OS-3601. *J Antibiot* (Tokyo). 2016 Aug;69(8):611-5. doi: 10.1038/ja.2015.142. Epub 2016 Jan 13. Erratum in: *J Antibiot* (Tokyo). 2017 Jul;70(8):921. PMID: 26758492.
- **Nidorf, S. M., & Thompson, P. L. (2019).** Why colchicine should be considered for secondary prevention of atherosclerosis: an overview. *Clinical therapeutics*, 41(1), 41-48.

O

- **Omrane Toumatia, Yekkour A, Goudjal Y, Riba A, Coppel Y, Mathieu F, Sabaou N, Zitouni A.** Antifungal properties of an actinomycin D-producing strain, *Streptomyces* sp. IA1, isolated from a Saharan soil. *J Basic Microbiol*. 2015 Feb;55(2):221-8. doi: 10.1002/jobm.201400202. Epub 2014 Oct 3. PMID: 25284744.
- **Overbye KM, Barrett JF.** Antibiotics: where did we go wrong? *Drug Discov Today*. 2005 Jan 1;10(1):45-52. doi: 10.1016/S1359-6446(04)03285-4. PMID: 15676298

P

- **Pan, E., Jamison, M., Yousufuddin, M., & MacMillan, J. B. (2012).** Ammosamide D, an oxidatively ring opened ammosamide analog from a marine-derived *Streptomyces variabilis*. *Organic Letters*, 14, 2390–2393

R

- **R.BASKARAN, MOHAN P. M., SIVAKUMAR K., et KUMAR ASHOK. 2015.** « ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF *STREPTOMYCES PARVULUS* DOSMB-D105 ISOLATED FROM THE MANGROVE SEDIMENTS OF ANDAMAN ISLANDS ». <https://doi.org/10.1556/030.63.2016.1.2>.
- **Rakotonanahary Maldonado, M. Peumus boldus M. :** de la botanique à la thérapeutique : état des connaissances en 2012. *Sciences pharmaceutiques*, (2012), p16.
- **Ren, J., Liu, D., Tian, L., Wei, Y., Proksch, P., Zeng, J., et al. (2013).** Venezuelines A-G, new phenoxazine-based alkaloids and aminophenols from *Streptomyces venezuelae* and the regulation of gene target Nur77. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23, 301–304.
- **René T. (1950).** Alcaloïdes de L'erythropleom. Thèse de Doctorat. Université de Bruxelles. Belgique. p23.

- **Rousselet, M., Vignaud, J., Hofman, P., & Chatelet, F. (2005).** Inflammation et pathologie inflammatoire (Chapitre 3). *Copyright AFECAP*, 1-75.

S

- **Sabaou N., Amir H., and Raunaga D., 1990.,** Le palmier dattier et la fusariose. X. Denombrement des actinomycètes de la rhizosphère. Leur antagonisme vis à vis du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. *Anal of Phytopathology*, 12, 253-257.
- **Saurav K ., Kannabiran K. (2014) .** Cytotoxicity and antioxidant activity of 5-(2,4-dimethylbenzyl)pyrrolidin-2-one extracted from marine *Streptomyces* VITSVK5 spp. *Saudi. J. Biol. Sci.* 19 , 81-86.
- **Seigler, David S. 2012.** *Plant Secondary Metabolism.* Springer Science & Business Media.
- **Shaaban M, Abdel-Aziz MS.** Benhamycin, novel alkaloid from terrestrial *Streptomyces* sp. *Nat Prod Res.* 2007 Nov;21(13):1205-11. doi: 10.1080/14786410701526024. PMID: 17987502.
- **Shaala LA, Youssef DT, Badr JM, Harakeh SM.** Bioactive 2(1H)-Pyrazinones and Diketopiperazine Alkaloids from a Tunicate-Derived Actinomycete *Streptomyces* sp. *Molecules.* 2016 Aug 24;21(9):1116. doi: 10.3390/molecules21091116. PMID: 27563872; PMCID: PMC6273634.
- **Shakil, A.(1988).** Isolation and structural elucidation of chemical constituents from *Fumaria indica*, *Ferula oopoda* and *Withania somnifera*. Thèse de doctorat. University of karachi. pp 203.
- **Shi T, Wang YF, Wang H, Wang B.** Genus *Nocardiopsis*: A Prolific Producer of Natural Products. *Mar Drugs.* 2022 May 31;20(6):374. doi: 10.3390/md20060374. PMID: 35736177; PMCID:PMC9231205.
- **Shu-Feng, Bi, Guo Zhi-Kai, Jiang Nan, Jiao Rui-Hua, Ge Hui-Ming, et Tan Ren-Xiang. 2013.** « New alkaloid from *Streptomyces koyangensis* residing in *Odontotermes formosanus* ». *18 Feb 2013.*
<https://doi.org/10.1080/10286020.2013.767246>.
- **Siddharth, S.; Aswathanarayan, J.B.; Kuruburu, M.G.; Madhunapantula, S.R.V.; Vittal, R.R.** Diketopiperazine derivative from marine actinomycetes *Nocardiopsis* sp. SCA30 with antimicrobial activity against MRSA. *Arch. Microbiol.* **2021**, 203, 6173–6181. [CrossRef].
- **Solecka J., Zajko J., Postek M. and Rajnisz A., 2012.** Biologically active secondary metabolites from actinomycetes. *Cent. Eur. J. Biol.* 7:373– 390.
- **Stermitz ,R.F. ;Lorenz ,P. ;Tawara ,J.N. ;Zenewicz,L.A. and Lewis ,K.(2000).** Synergy in a medicinal plant: Antimicrobial action of berberine potentiated by 5*-

methoxyhydnocarpin, a multidrug pump inhibitor. *Applied biological sciences* ,5 :1433-1473.

- **Sujatha P, Bapi Raju KV, Ramana T.** Studies on a new marine streptomycete BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Res.* 2005;160(2):119-26. doi: 10.1016/j.micres.2004.10.006. PMID: 15881828.
- **Sujatha P., Bapi-Raju Soumya Nair and Jayanthi Abraham.(2020).** Advances in Pharmaceutical Biotechnology, Natural Products from Actinobacteria for Drug Discovery. Doi: 10.1007/978-981-15-2195-9-23.
- **Supong K., Suriyachadkun C., Pittayakhajonwut P., Suwanborirux K., Thawai C. (2013).** *Micromonospora spongicolasp. nov.*, an actinomycete isolated from a marine sponge in the Gulf of Thailand. *The Journal of Antibiotics.* 1-5.

T

- **Tadeusz, Aniszewski. 2007.** *Alkaloids - Secrets of Life.*
<https://www.elsevier.com/books/alkaloids-secrets-of-life/aniszewski/978-0-444-52736-3>.
- **Tanaka Y., Omura S. (1990).** Metabolism and products of Actinomycetes – An introduction. *Actinomycetologica.* 4, 13-14.
- **Teodoro S, Kaufman, et Rúveda Edmundo A. 2005.** « The quest for quinine: those who won the battles and those who won the war ». <https://doi.org/10.1002/anie.200400663>.
- **Theilleux J. (1993).** Les actinomycètes in *Microbiologie industrielle : Les microorganismes d'intérêt industriel, Leveau. J.Y et Mouix. M. Lavoisier Tech et Doc, Apria.* 612.425.
- **Thenmozhi M., Kannabiran K. (2012).** Antimicrobial and antioxidant properties of marine actinomycetes *Streptomyces sp* VITSTK7. *Oxi. Antioxi. Medi. Sci.* 1, 51-57.
- **Tian S, Yang Y, Liu K, Xiong Z, Xu L, Zhao L.** Antimicrobial metabolites from a novel halophilic actinomycete *Nocardiopsis terrae* YIM 90022. *Nat Prod Res.* 2014;28(5):344-6. doi: 10.1080/14786419.2013.858341. Epub 2013 Nov 18. PMID: 24236566.
- **Trease. 2009.** « (PDF) Trease and Evans Pharmacognosy SIXTEENTH EDITION | Fitri Tan - Academia.edu ». 2009.
https://www.academia.edu/40365155/Trease_and_Evans_Pharmacognos_SIXTEENTH_EDITION.

V

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

- **Van Groesen E, Innocenti P, Martin NI.** Recent Advances in the Development of Semisynthetic Glycopeptide Antibiotics: 2014-2022. *ACS Infect Dis.* **2022** Aug 12;8(8):1381- 1407. doi: 10.1021/acsinfecdis.2c00253. Epub 2022 Jul 27. PMID: 35895325; PMCID: PMC9379927.

W

- **Wence, Jiao, Zhang Fenghua, Zhao Xinqing, Hu Jiehan, et Suh Joo-Won. 2013.** « A Novel Alkaloid from Marine-Derived Actinomycete *Streptomyces xinghaiensis* with Broad-Spectrum Antibacterial and Cytotoxic Activities ». October 1, 2013.
- **Whitman W.B., Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H-J., Trujillo M.E., Ludwig, W and Suzuki K.-I., (Eds.) (2012).** *Bergey's manual of systematic bacteriology .The Actinobacteria, Part A. Volume 5, 2nd edition*, Springer New York, Dordrecht Heidelberg London.

Y

- **Y.-P. Liu, Hu, S., Liu, Y.-Y., Zhang, M.-M., Zhang, W.-H., Qiang, L., & Fu, Y.-H. (2019).** Antiinflammatory and antiproliferative prenylated carbazole alkaloids from *Clausena vestita*. *Bioorganic chemistry*, *91*, 103107.
- **Yang CL, Wang YS, Liu CL, Zeng YJ, Cheng P, Jiao RH, Bao SX, Huang HQ, Tan RX, Ge HM.** Strepchazolins A and B: Two New Alkaloids from a Marine *Streptomyces chartreusis* NA02069. *Mar Drugs.* 2017 Aug 2;15(8):244. doi: 10.3390/md15080244. PMID: 28767052; PMCID: PMC5577599.
- **Yang CL, Zhang B, Xue WW, Li W, Xu ZF, Shi J, Shen Y, Jiao RH, Tan RX, Ge HM.** Discovery, Biosynthesis, and Heterologous Production of Loonamycin, a Potent Anticancer Indolocarbazole Alkaloid. *Org Lett.* 2020 Jun 19;22(12):4665-4669. doi:10.1021/acs.orglett.0c01456. Epub 2020 Jun 2. PMID: 32484694.
- **Yerraguravagarilavanya Latha, Vasavithirumalanadhuni, V. M., and Maheswari, P.U. (2017).** In Vivo Anti-inflammatory Activity Of Ethyl Acetate Extract Derived From Marine *Streptomyces Caparticus*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences And Research*, 8(12) : 5221-5226.

Z

- **Zhang, W., Liu, Z., Li, S., Yang, T., Zhang, Q., Ma, L., et al. (2012).** Spiroindimicins A-D: New bisindole alkaloids from a deep-sea-derived actinomycete. *Organic Letters*, 14, 3364–3367.
- **Zhang, X.; Chen, S.; Zhang, L.; Zhang, Q.; Zhang, W.; Chen, Y.; Zhang, W.; Zhang, H.; Zhang, C.** Dassonmycins A and B, polycyclic thioalkaloids from a marine sponge-derived *Nocardopsis dassonvillei* SCSIO 40065. *Org. Lett.* **2021**, 23, 2858–2862. [[CrossRef](#)].

Annexes

Annexe I

Matériel analytique

- Autoclave
- Anse de platine
- Balance de précision
- Bain-marie
- Balance analytique (RADWAG référence : PS210/C/2)
- Barreaux magnétiques
- Bec Bunsen
- Béchers
- Boîtes de Pétri
- Ballons
- Eprouvettes
- Erlenmeyers
- Etuves à 37°C et à 28°C
- Embouts
- Ecouillons
- Flacons
- Micropipettes (500 et 1000µl)
- Microplaques de CMI de 96 puits
- Pipettes Pasteur
- Plaque chauffante agitatrice (Raypa AG-5)
- Spectrophotomètre (RAYLEIGH)
- Spatule
- Rotavapor
- Tubes à essais
- pH mètre
- Vortex (VELP scientifica)

Annexe II

Solutions et milieu de culture

- Mueller-Hinton (MH).
- Mueller Hinton molle (MHm).
- Eosine bleu de Méthylène (EMB).
- Bouillon Mueller Hinton (BMH).
- Acétate d'éthyle
- Ethanol: (C₂H₆O), 99%, MM=46.07 g/mol, d=0.81 (PROLABO).
- Méthanol: CH₃OH, 99%, MM=32.04 g/mol, d= 0.79 (PROLABO)
- DMSO
- DPPH (2,2-diphenyl-1-picrilhydrazyl).
- Eau physiologique (1g Na Cl dans un litre d'eau distillée).
- Extrait alcaloïdique méthanolique
- Extrait alcaloïdique DMSO
- Eau distillée

Annexe III

Composition des milieux de culture (Pour un litre d'eau distillée)

1.Composition du milieu SCA (Kuster et Williams, 1964)

Amidon.....	10g/l
Caséine.....	0,3g/l
Na Cl.....	2g/l
K ₂ Hpo ₄	2g/l
MgSo ₄ , 7H ₂ O.....	0,05g/l
CaCo ₃	0,02g/l
FeSo ₄ , 7H ₂ O.....	0,01g/l
Agar.....	18g
PH	7, 2 +/- 0,2

2. Gélose Mueller Hinton (Guiraud, 1998)

Extrait de viande.....	2 g
Hydrolysate acide de caséine.....	17,5 g
Amidon.....	1,5 g
Agar.....	10 g
PH.....	7,4

3.Gélose EMB (Éosine bleu de méthylène)(Farmer III , 2003; Jorgensen et al., 2015)

Peptone	10 g
Lactose	5 g
Hydrogénophosphate de potassium ...	2 g
Eosine	400 mg
Bleu de méthylène	65 mg
Agar	13,5 g
pH=7	

Résumé

L'objectif de ce travail était d'évaluer l'activité antimicrobienne et antioxydant d'extraits alcaloïdiques d'une souche d'actinobactérie.

L'extraction des alcaloïdes a été réalisée par macération dans de l'acétate d'éthyle suivi de l'extraction par le chloroforme puis récupération des extraits dans du méthanol et du DMSO. L'évaluation de l'activité antimicrobienne est déterminée par la méthode de diffusion sur milieu solide (test des puits) et la méthode de micro-dilution (CMI). L'activité antioxydant a été réalisée par le test du DPPH.

Aucune activité antimicrobienne par la méthode des puits, les résultats ont montré une faible activité des extraits alcaloïdiques par la méthode de microdilution (CMI), sur les souches bactériennes testés *E. coli OXA-48* et *Bacillus subtilis* avec une CMI de 0,03µg/ml et *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli O₂₉* avec des CMI de 0,775µg/ml et une absence d'activité sur la levure *Candida albicans*.

L'activité antioxydant était relativement faible avec des pourcentages d'inhibitions de 32% pour l'extrait méthanolique et de 9% pour l'extrait DMSO.

Les alcaloïdes produits par les actinobactéries restent une alternative potentielle aux antibiotiques afin de faire face au phénomène de résistance.

Mots clés : actinobactéries, activité antimicrobienne, activité antioxydant, alcaloïdes.

Abstract

The objective of this work was to evaluate the antimicrobial and antioxidant activity of alkaloid extracts of an actinobacterium strain.

The extraction of the alkaloids was carried out by maceration in ethyl acetate followed by extraction by chloroform and then recovery of the extracts in methanol and DMSO. The assessment of antimicrobial activity is determined by the solid media diffusion method (well test) and the micro-dilution method (MIC). Antioxidant activity was achieved by the DPPH test.

No antimicrobial activity by the well method, the results showed low activity of alkaloid extracts by the microdilution method (CMI), on the tested bacterial strains *E. coli OXA-48* and *Bacillus subtilis* with a MIC of 0.03µg/ml and *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli O₂₉* with MICs of 0.775µg/ml and no activity on *Candida albicans* yeast.

L'activité antioxydant était relativement faible avec des pourcentages d'inhibitions de 32% pour l'extrait méthanolique et de 9% pour l'extrait DMSO.

Les alcaloïdes produits par les actinobactéries restent une alternative potentielle aux antibiotiques afin de faire face au phénomène de résistance.

Keywords: actinobacteria, antimicrobial activity, antioxidant activity, alkaloids.