

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

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Filière : Sciences biologiques
Option : Microbiologie en Secteur Génie Biologique



Réf :

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

MASTER

Thème

**Activité antimicrobienne et antioxydante
de souches d'actinomycètes isolées de la
région de Bejaïa**

Présenté par :

BENBARA Saida & LALALI Sihem

Soutenu le : 20/06/2017.

Devant le jury composé de :

Mr NOURL. H	MCB	Président
Mme BOUDRIES. S	MAA	Encadreur
Mme LAINCER. F	MAA	Examinatrice

Année universitaire : 2016/2017



DEDICACE

Je dédie ce modeste travail à :

Deux personnes les plus chers au monde que

***Je ne remerciais jamais assez pour leurs aides,
encouragements, Soutiens, sacrifices et leur patience***

pendant toute ma vie :

Mes chers parents

Mes chers frères : Abid, Faouzi et Ghilas.

Ma chère et unique sœur : Yasmina

A toute la famille BENBARA

Tous mes chers amis qui ont été toujours avec moi

avec leurs aides et soutiens:

Khadidja, Fatima, Nadia, Kenza, Wawa, Yuba et kouka.

***A ma Binôme «Sihem» qui a partagée avec moi les moments
difficiles de ce travail et sa famille.***

Sans oublier mes braves Amies de la promotion Master II

Génie Biologique 2016/2017.

SAIDA

DEDICACE

Je dédie ce modeste travail à :

Deux personnes les plus chers au monde que

Je ne remerciais jamais assez : leurs aides, encouragements,

Soutiens, sacrifices et patience pendant toute ma vie :

Mes chers parents

Mes chères sœurs : Samira et Lamia, ainsi que leurs maries.

Mes chers frères: Karim et Aïmed Eddine

Ma chère tata Nadia

A toute la famille LALALI

Tous mes chers amis qui ont étaient toujours avec moi avec leurs aides et soutiens:

Khadidja, Lydia, Tinhinane, Khalissa, Yasmine et Yuba.

A ma Binôme «Saida» qui a partagé avec moi les moments difficiles de ce travail et sa famille.

Sans oublier mes braves Amies de la promotion Master II Génie Biologique 2016/2017.

SIHEM



Remerciements

Avant tous nous remercions ALLAH le tout puissant de nous avoir aidé à surmonter toutes les difficultés lors de nos études et ce ne sont pas ces quelques mots qui expriment nos sentiments les plus sincères.

Nous tenons en premier lieu à exprimer nos sincères remerciements à notre encadreur Mme BOUDRIES pour avoir dirigé ce travail, pour son aide, ses précieux conseils, sa compréhension et son soutien moral lors de la Réalisation de ce travail.

Nous exprimons à Mr NOURI, toutes nos reconnaissances, d'avoir accepté de présider ce jury. Nous le remercions infiniment et sincèrement.

Mme LAINCER, pour son aide, son examination et ses corrections sérieuses pour ce travail.

Melle TOUATI pour son aide, ses orientations dans la partie activité antioxydante et ses corrections sérieuses pour ce travail.

Ainsi nous adressons nos sincères remerciements à tous les enseignants du département de Microbiologie, et les techniciennes de laboratoire de Mycologie de l'Université de Bejaia. Sans oublier Mme AYAD, responsable du laboratoire de la DSP pour son aide à nous fournir

certains produits et matériel dont nous avons besoin.

Enfin nous remercions nos familles : nos parents pour leurs soutiens sans faille, parfois inquiets mais toujours compréhensifs, tout au long de ces années.

Pour tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce mémoire d'une manière directe ou indirecte, surtout Khadidja.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Concentrations des extraits bruts des 4 isolats étudiés obtenus après macération.
P : 25.

Liste des figures

Figure	Titre	Page
1	Cycle de développement des actinomycètes (<i>Streptomyces Sp.</i>)	4
2	Métabolites secondaires bioactifs produits par les actinomycètes	7
3	Secteur angulaire de la répartition de production des antibiotiques entre les microorganismes	8
4	Exemple de Mutations de l'ADN formées par attaque radicalaire	11
5	Initiation de la peroxydation lipidique	13
6	La propagation de la peroxydation lipidique à d'autres AGPI	13
7	Produits terminaux de la peroxydation lipidique	14
8	Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants	15
9	Photographie du Rotavapor	17
10	Test de mise en évidence d'activité antimicrobienne par la méthode des puits.	18
11	Schéma du mode opératoire du dosage des polyphénols totaux	19
12	Schéma du mode opératoire du dosage des flavonoïdes	20
13	Réaction de test DPPH (2,2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl)	21
14	Schéma du mode opératoire du piégeage du radical DPPH	22
15	Génération du radical-cation ABTS ^{•+} avec le persulfate de potassium et sa réaction avec un antioxydant (AOH)	23
16	Schéma du mode opératoire du piégeage du radical ABTS	24
17	Schéma de la réaction de teste du pouvoir réducteur du Fe ³⁺ en Fe ²⁺ .	25
18	Schéma du mode opératoire du pouvoir réducteur	26

19	Histogramme représentant l'activité antimicrobienne des extraits bruts des souches <i>SC20</i> , <i>B01</i> , <i>NA44</i> et <i>ND101</i> à l'égard de 5 germes cibles	28
20	Résultats du test des puits des souches d'actinomycètes sélectionnées	30
21	Histogramme de la teneur en polyphénols des extraits bruts des souches d'actinomycètes étudiées	31
22	Histogramme de la teneur en polyphénols des extraits bruts des souches d'actinomycètes étudiées	32
23	Présentation des pourcentages d'inhibition du DPPH de 4 extraits bruts de souches d'actinomycètes étudiées	33
24	Histogramme des IC ₅₀ de l'activité du piégeage du radical libre DPPH par les extraits bruts des isolats étudiés	34
25	Présentation circulaire des pourcentages d'inhibition d'ABTS des extraits bruts de souches d'actinomycètes étudiées	35
26	Histogramme présentant les IC ₅₀ de l'activité du piégeage du radical libre ABTS par les extraits bruts des isolats étudiés	36
27	Activité réductrice des extraits bruts des isolats d'actinomycètes étudiés	38
28	Histogramme IC ₅₀ du pouvoir réducteur des ions ferriques des extraits bruts étudiés.	39

Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ABTS : sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique).

AlCl₃ : Chlorure d'aluminium.

Ae: Absorbance de l'échantillon.

At: Absorbance du témoin.

BHA : Hydroxy-anisol butylé.

BHT : Hydroxy toluène butylé.

C. albicans : *Candida albicans*.

C₆N₆FeK₃ : Ferricyanure de potassium.

CI₅₀ : Concentration inhibitrice 50%.

°C : Degré Celsius.

DAP : Acide Diamino Primilique.

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle.

e⁻ : Electron.

E. coli : *Escherichia coli*.

Fe²⁺ : Fer ferrique.

Fe³⁺ : Fer ferreux.

FeCl₃ : chlorure de fer.

GN : Gélose nutritif.

GC% : Coefficient de Chargaff.

H₂O₂ : Peroxyde hydrogène.

H₂PO₄ : Tampon phosphate.

HOCl : Acide hypochloreux (Eau de javel).

L. innocua : *Listeria innocua*.

MA : Mycélium aérien.

MH : Muller Hinton.

mm : millimètre.

MS : Mycélium de substrat.

ml : Millilitre.

nm : Nanomètre.

Na₂CO₃ : Carbonate de sodium.

O₂⁻ : Anion peroxyde.

PI % : Pourcentage d'inhibition.

R² : Coefficient de corrélation.

ROOH : Lipoperoxyde.

ROS : Espèce réactives de l'oxygène.

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthiciline.

Sb: Sabouraud.

SCA: Starch Caséine agar.

SOD : Superoxyde de dismutase.

TCA : Acide trichloracétique.

V/V : Volume par volume.

V. Cholerae : *Vibrio cholerae*.

Vit C : Vitamine C.

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction..... 1

Partie I : Revue Bibliographique

I. Généralités sur les actinomycètes.....	3
II. Identification des actinomycètes	4
II.1. Critères morphologiques.....	4
II.2. Critères chimiotaxonomiques	4
II.3. Critères physiologiques	5
II.4. Critères moléculaires	5
III. Importance des actinomycètes et leurs métabolites secondaires	6
III.1. Importance des actinomycètes.....	6
III.2. Métabolites des actinomycètes	7
IV. Les antibiotiques	7
V. Les antioxydants	9

Travail Expérimental

Partie II : Méthodologie

I. Matériel biologique	12
I.1. Les souches d'actinomycètes productrices.....	12
I.2. Germes cibles utilisés	12
II. Méthodes.....	12
II.1. Repiquage des souches.....	12
II.2. Production de biomolécules par fermentation solide	12
II.3. Extraction des molécules actives	12
II.4. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des extraits bruts.....	13

II.5. Etude de l'activité antioxydante.....	14
II.5.1 Dosage des polyphénols totaux.....	14
II.5.2 Dosage des flavonoïdes.....	16
II.5.3. Mise en évidence de l'activité antioxydante.....	17
II.5.3.1. Piégeage du radical libre ABTS.....	19
II.5.3.2. Pouvoir réducteur de l'ion ferrique.....	21
II.5.3.3. Pouvoir réducteur de l'ion ferrique.....	21

Partie III : Résultats et Discussion

I. Production et extraction des molécules actives par fermentation solide.....	25
II. Etude de l'activité antimicrobienne.....	25
III. Etude de l'activité antioxydante.....	27
III.1. Dosage des polyphénols totaux.....	27
III.2. Dosage des flavonoïdes.....	28
III.3. Piégeage du radical libre DPPH.....	29
III.4. Piégeage du radical libre ABTS.....	32
III.5. Evaluation du pouvoir réducteur.....	34
Conclusion.....	38

Références bibliographiques

Annexes

Depuis l'introduction des antibiotiques dans l'arsenal thérapeutique des maladies infectieuses, les microorganismes ont développé des moyens de défense leur conférant une insensibilité aux antimicrobiens. Ces résistances aux antibiotiques aux doses thérapeutiques apparaissent plus ou moins rapidement selon la complexité chimique des antibiotiques et du patrimoine génétique de la bactérie (**Genné et Siegrist, 2003**). Ce qui a poussé les chercheurs à mettre en évidence de nouvelles molécules d'antibiotiques plus actives afin de surmonter le problème de la résistance.

Les produits naturels issus du métabolisme des microorganismes constituent l'une des principales sources des bioindustries de fermentation dans divers domaines. Reconnu comme des agents performants pour la transformation, la dégradation et la production de plusieurs métabolites d'intérêt, les microorganismes sont largement exploités en biotechnologies pour la production de plusieurs métabolites primaires et secondaires ayant des valeurs ajoutées et des activités biologiques très importantes (**Demain, 2000**).

Dans la recherche pharmaceutique, les produits naturels jouent un rôle important en raison de leurs diversités chimiques et leur large éventail d'activités biologique. En effet, selon **Newman et al., (2003)**, 80% des médicaments utilisés dans le traitement de diverses maladies sont d'origine naturel.

Les actinomycètes est un groupe de bactérie filamenteuses à Gram positif, septées et ramifiées en mycélium de structure analogue à celle des champignons auxquels elles étaient autre fois assimilées. Mais malgré leur aspect morphologique de type fongique, leur physiologie et leur organisation cellulaire sont de type procaryotes conformément leur classification parmi les bactéries (**Embly et al., 1994 et Xu et al., 1996**). Ils ont une distribution très large dans la nature (air, aliment, sols,...), et jouent un rôle important dans production de métabolites secondaires actifs telle que les antimicrobiens, enzymes et antioxydants (**Lecterch et al., 1983**).

Dernièrement les nouvelles études ont montré que les radicaux libres d'oxygènes possèdent un rôle critique dans diverses maladies telles que le cancer, l'Alzheimer, plusieurs infections et les maladies auto-immunes et cardiovasculaire (**Lee et al., 2014**). Du fait de l'impact négatif de l'utilisation d'antioxydants synthétiques sur la santé humaine, il est devenu un sujet très étudié (**Barlow, 1990**). Pour l'utilisation des antioxydants et leurs

substitution plusieurs limites et restrictions seront suivi (**Frankel, 1993 et Moure, 2001**). Afin de résoudre ce problème les chercheurs s'intéressent à identifier des antioxydants naturels dérivant des plantes ou des microorganismes telle que les actinomycètes qui sont riches en métabolites secondaire (**Lee *et al.*, 2014**).

Dans la même optique, nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'extraction des molécules bioactives et mettre en évidence l'activité antimicrobienne et antioxydante des extraits bruts de quatre souches d'actinomycètes productrices de métabolites secondaires actifs isolées du sol de la région de Bejaia.

La première partie de ce travail est consacrée à la Synthèse bibliographique sur les actinomycètes et à un aperçu général sur les métabolites secondaires dotés d'effets effet antibactériens et antioxydants.

La deuxième partie est consacrée à la méthodologie qui traite les principes généraux du matériel et méthodes utilisées afin de :

- ✓ Produire et extraire des molécules bioactives des souches étudiées ;
- ✓ Mettre en évidence l'activité antibactérienne des souches étudiées ;
- ✓ Et mettre en évidence l'activité antioxydante de ces souches.

Enfin, la troisième partie présente les résultats obtenus ainsi que leurs discussion pour pouvoir entirer une conclusion.

I. Généralités sur les actinomycètes

Les actinomycètes ont été décrits pour la première fois par Ferdinand Cohn en 1878. Ils font partie du règne des procaryotes à Gram positif (**Williams et al., 1993 ; Sanglier et Trujillo, 1997**) qui ont un GC% supérieur à 55% (**Goodfellow, 1983**). La plupart sont saprophytes et aérobies et utilisent une variété de sources d'énergie ce qui permet de les caractériser comme chimioorganotrophes mais certains sont des chimioautotrophes (**Mariat et Seballd, 1990 ; Ensign et al., 1993**). Le genre *Streptomyces* est le plus étudié dans ce groupe (**Perry et al., 2004**).

Les actinomycètes possèdent une structure filamenteuse avec un diamètre des filaments allant de 0.5 à 2µm (**Lamari, 2006**), ces filaments sont ramifiés en mycélium et présentent des septums, leur cycle biologique est semblable à celui de certains champignons (**Kalakoutski et Agre, 1976**). Leurs temps de génération moyen est d'environ 2 à 3 heures (**Ottow et Math, 1968 ; Lapent et Sanglier, 1989**). La figure 1 représente le cycle de développement de *Streptomyces* sp.

Les actinomycètes constituent une proportion importante de la microflore tellurique (**Dommergues et Mangenot, 1970**). Ils se retrouvent aussi dans l'air, le fumier et les composts, le foin et les pailles, les grains de céréales, les résidus fibreux de cannes à sucre, le pollen et bien d'autres substrats (**Lacey, 1973 ; Breuilland et al., 1974 ; Couch et Bland, 1974**). Ils sont présents dans les débris végétaux et les litières, les sols glaciaires de l'arctique, les déserts chauds et secs de divers continents, les sols des régions industrielles pollués par du pétrole ou des métaux lourds. Généralement neutrophiles, Ils poussent de façon optimale dans une gamme de pH 5,0 à 9,0 avec une proximité optimale à la neutralité. Ils peuvent cependant être prédominants dans certains sols très acides (**Takahashi et al., 1996 et Harvey, 1999**), dans des lacs extrêmement alcalins et dans certains milieux très salés (**Lechevalier, 1981**). Les actinomycètes sont aussi retrouvés dans les milieux aquatiques : dans les lacs, les rivières et les ruisseaux, dans les mers et les océans et même dans des sédiments océaniques situés à plus de 4 000 m de profondeur (**Cross, 1981 ; Goodfellow et Williams, 1983**).

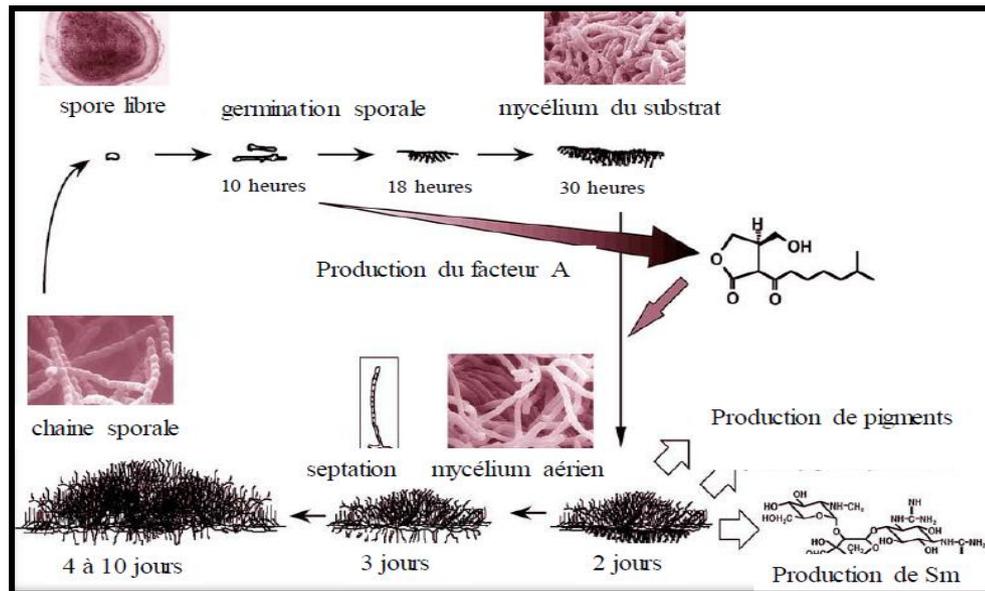


Figure 1 : Cycle de développement des actinomycètes (*Streptomyces Sp.*) (Horinouchi, 2002)

II. Identification des actinomycètes

L'identification des genres d'actinomycètes est facilitée par les études morphologiques et chimiques tandis que les critères physiologiques et moléculaires sont utilisés à fin de séparer les espèces (Badji, 2006).

II.1. Critères morphologiques

La couleur et le type du mycélium aérien (MA) et/ ou du mycélium de substrat (MS), la présence de spores (forme, mobilité, nombre, disposition sur les hyphes), la présence ou non du sporophores sur le mycélium, de sporanges, de sclérotés ainsi que la recherche de production et la couleur des pigments sont les critères morphologiques les plus importants à étudier chez les actinomycètes (Badji, 2006).

II.2. Critères chimiotaxonomiques

Le principal caractère sur lequel est basée, la chimiotaxonomie est la composition de la paroi cellulaire en acides aminés, glucides et lipides.

-Les deux acides aminés pariétaux les plus importants taxonomiquement sont l'acide diaminoprimitique (DAP) qui peut être remplacé parfois par la lysine ainsi que la glycine qui peut être présente ou non (Becker et al., 1965 ; Yamagushi, 1965).

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

-Les lipides cellulaires tels que les phospholipides, les acides mycoliques pariétaux qui peuvent être présent ou absents ainsi que les ménaquinones membranaires sont aussi d'une grande importance dans l'identification des actinomycètes (**Lechevalier et al., 1977**).

II.3. Critères physiologiques

Les caractères physiologiques sont une base pour l'identification des espèces qui consistent en des tests de dégradation de différents composés glucidiques, lipidiques, protidiques et des polymères complexes ainsi que la tolérance à certains agents physiques (pH, température) et chimiques (phénol, tellurite de potassium, antibiotiques, etc.) (**Lamari, 2006**).

II.4. Critères moléculaires

Actuellement il n'est plus possible de proposer la création d'une nouvelle espèce sans passer par leur analyse génétique. Ces études génétiques ont permis de tracer toute la phylogénie des actinomycètes, de grouper ou de séparer des espèces entre elles ou fusionner des genres entre eux (**Zitouni, 2005**).

Les principales analyses moléculaires utilisées dans la taxonomie des actinomycètes sont :

- Le séquençage des ADNr 16S : constitue un outil précieux pour déterminer le degré de relation entre souches, espèces et genres (**Larpent et Gourgaud, 1985 ; Larpent, 2000**).
- Hybridation ADN/ADN : Deux espèces sont considérée différentes si elles ont un taux de ressemblance (Taux de réassociation de leurs brins d'ADN) inférieur à 70%. (**Devereux et al., 1990**).
- Le coefficient de Chargaff ou GC% : C'est un critère important non seulement dans l'identification des genres mais aussi des familles d'actinomycètes dont l'ADN contient un pourcentage de G+C supérieur à 55% (**Badji 2006**).

III. Importances des Actinomycètes et leurs métabolites secondaires.

III.1. Importances des Actinomycètes :

Les actinomycètes font partie des procaryotes les plus précieux économiquement et biotechnologiquement. Ils sont responsables de la production d'environ la moitié des métabolites secondaires bioactifs, antibiotiques, agents anticancéreux et enzymes. Environ 23 000 métabolites produits par des microorganismes ont été signalés dont plus de 10 000 sont produits par les actinomycètes, représentant 45% de tous les microorganismes découverts pour leur synthèse de métabolites bioactifs (**Khamna et al., 2010, Sobathra et al., 2012**). En effet, les actinomycètes sont recherchés de façon routinière dans le but de découvrir de nouvelles substances bioactives parce qu'ils fournissent un nombre considérable de composés bioactifs d'une grande valeur commerciale.

III.1.1. Dans le domaine médicale, vétérinaire et industriel

Plus de 60% des médicaments approuvés dérivent des composés naturels et la plupart ont été extraits à partir d'actinomycètes (**Demain et Laicini, 2006, Anibo et al., 2008 ;**). En plus de leur effet médical pour lutter contre les maladies infectieuses, les antibiotiques produits par les actinomycètes trouvent également une application dans les élevages industriels d'animaux (**Khachatourians, 1998**).

Les enzymes sont, après les antibiotiques, les plus importants produits des actinomycètes, certaines sont utilisées à cet effet dans l'industrie alimentaire (glucose isomérase) et dans celle des détergents (protéases). Les glycosidases des actinomycètes jouent un rôle important dans la dégradation des biomasses végétales (amylases, xylanase) et animales (chitinases) (**Lechevalier, 1981**).

III.1.2. Dans le domaine agronomique

Un grand nombre de métabolites d'importances commerciale sont produites par les actinomycètes en plus d'autres potentiels de grande valeur telle que :

- Leur implication dans le processus de recyclage telle que le recyclage de la matière organique. Grâce à leur pouvoir de décomposition des algues bleues et d'autres bactéries et à leur capacité de dégradation des composés organiques complexes ils sont utilisés dans la bioremédiation (**Pizzul, 2006 ; Zaitlin et Watson, 2006**).

- Dans l'agriculture, les actinomycètes protègent les racines des plantes contre les invasions des champignons (Lamari, 2006). Il a été rapporté que les actinomycètes influencent la croissance des plantes grâce à leurs activités antimicrobiennes au niveau du sol et augmentent la vitesse de synthèse et de minéralisation de la matière organique permettant ainsi une bonne nutrition pour les plantes (Yilma *et al.*, 2008).

III.2. Métabolites des actinomycètes

Comme tous les autres microorganismes les actinomycètes ont des métabolites dits « primaires » qui s'impliquent essentiellement dans la formation de la structure cellulaire et permettent le bon fonctionnement du métabolisme général (Thailleux, 1993). Les métabolites secondaires concerne ceux qui ne s'impliquent pas directement dans la vie et la croissance de l'organisme (Theilleux, 1993 ; Ginolhac, 2006).

Les actinomycètes ont prouvé leur capacité à produire divers métabolites secondaires présentant des activités biologiques très variées telle que : antifongiques, antitumorales, antibactériennes, immunosuppressives, insecticides et inhibitrices d'enzymes (Solanki *et al.*, 2008). La figure 2 résume les différentes molécules bioactives produites par les actinomycètes.

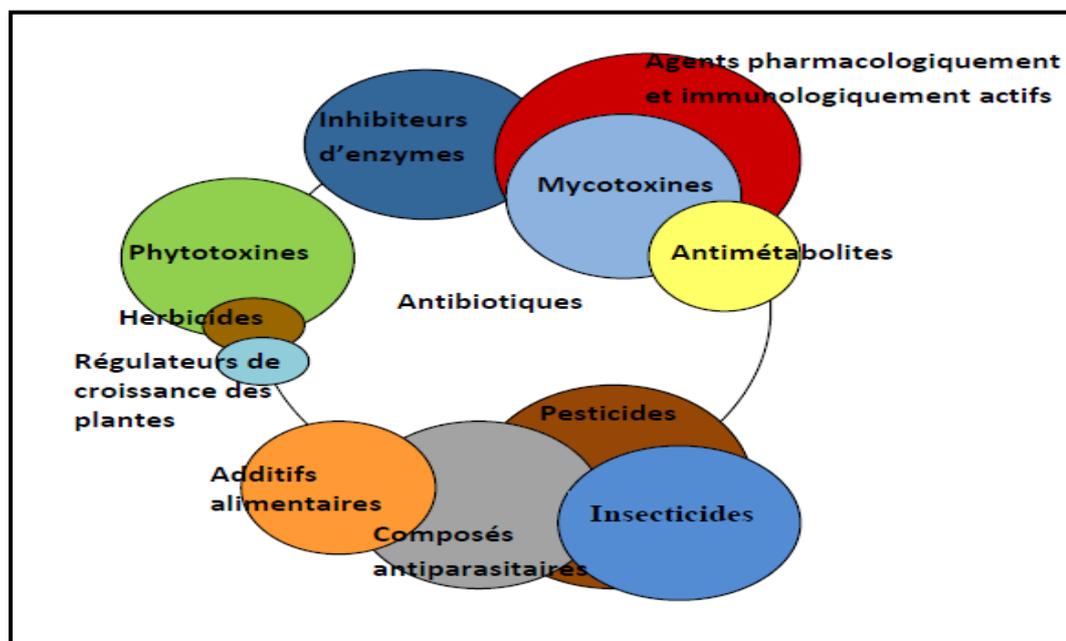


Figure 2 : Métabolites secondaires bioactifs produits par les actinomycètes (Conn, 2005).

III.2.1. Les antibiotiques

Après la découverte de la Pénicilline par Alexander Fleming en 1928, le début de la production industrielle des premiers médicaments à base de cette molécule a eu lieu pendant la deuxième guerre mondiale. Ces molécules ont été étudiées particulièrement pour leurs valeurs et importances en thérapie humaine et vétérinaire suite à leur effet majeur sur la santé, la nutrition et même l'économie de la société (Coates et Hu, 2007).

Les antibiotiques sont des métabolites secondaires dont la synthèse, dans la majorité des cas, débute à la fin de la phase exponentielle de la croissance microbienne (Bu'Lock, 1965). Ils sont produits par un large éventail de microorganismes fongiques et bactériens, et inhibent ou tuent à faibles concentrations spécifiquement d'autres microorganismes. Un grand nombre d'antibiotiques a été identifié en milieu naturel, mais moins de 1% sont utiles. (Singleton, 1994 ; Madigan et Martinko, 2007).

Ces molécules peuvent être synthétisées par plusieurs microorganismes tels que les bactéries non mycéliennes qui couvrent près de 12 % puis les champignons avec un pourcentage de 22 % et la grande proportion est prise par les actinomycètes avec un pourcentage de 66% (chez lesquelles le genre *Streptomyces* domine avec 55 %) (Berdey *et al.*, 2005). Un microorganisme peut produire plusieurs antibiotiques et divers microorganismes taxonomiquement éloignés peuvent produire le même antibiotiques (Von Dahlen *et al.*, 1997).

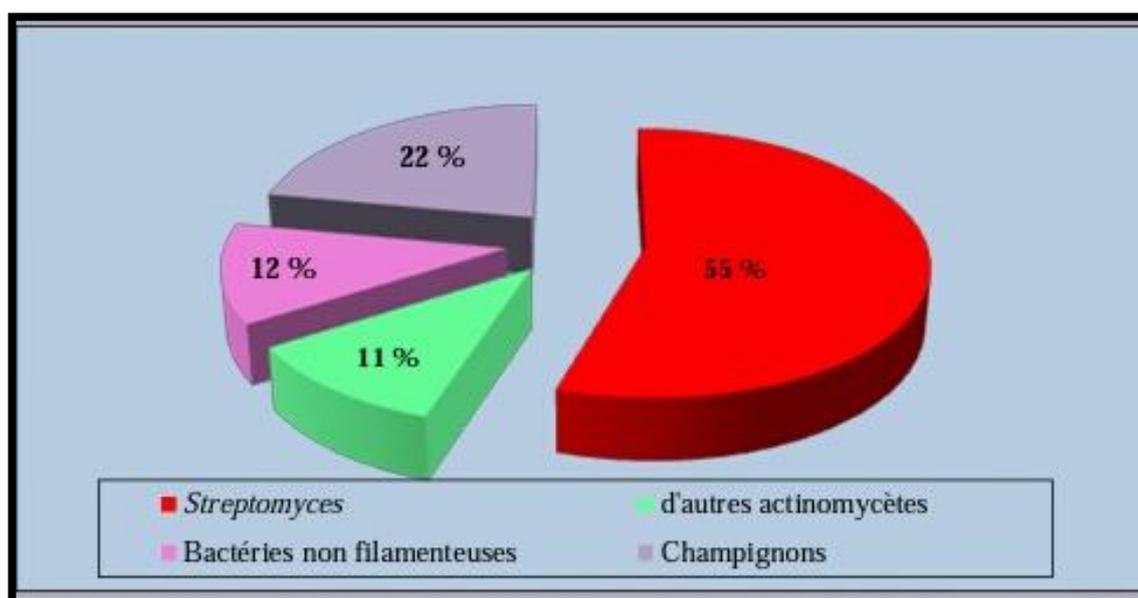


Figure 3: Secteur angulaire de la répartition de production des antibiotiques entre les microorganismes (Berdy, 2005).

Les antimicrobiens utilisés à l'heure actuelle peuvent être classés selon divers critères (l'origine, la nature chimique, le mécanisme d'action et le spectre d'action), pour qu'ils soient toxiques pour les bactéries, mais inoffensifs pour l'hôte à qui on administre le traitement, les antibiotiques utilisés ont pour cibles principales les constituants moléculaires proprement bactériens ou fongiques et actuellement, les molécules disponibles agissent en priorité au niveau de la biosynthèse et le maintien de la paroi cellulaire, des protéines, et l'ADN bactériens (**Walsh, 2000**).

Plusieurs d'antibiotiques naturels ont été structurellement modifiés au laboratoire pour augmenter leur efficacité formant la classe des antibiotiques semi-synthétiques (**Madigan et Martinko, 2007**).

III.2.2 Les antioxydants

De nos jours, il existe un intérêt croissant vis-à-vis de la biologie des radicaux libres. Ce n'est pas seulement dû à leur rôle dans des phénomènes aigus tels que le traumatisme ou l'ischémie, mais aussi à leur implication dans de nombreuses pathologies chroniques associées au vieillissement tels que le cancer, les maladies cardiovasculaires et inflammatoires et la dégénérescence du système immunitaire (**Guinebert et al., 2005**).

Lorsqu'une surcharge de radicaux libres ne peut pas être détruite, leur accumulation dans le corps génère des maladies dégénératives. Les radicaux libres et les oxydants jouent un double rôle à la fois toxique ou ils ont été impliqués dans le développement de nombreuses maladies (tel que : cancer, cataracte, Alzheimer, Parkinson, Syndrome de détresse respiratoire aiguë, œdème pulmonaire, infections intestinales, le diabète, etc.) (**Atawodi, 2005**) comme ils peuvent avoir des composés bénéfiques (**Mohankumar et al., 2012**).

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié. Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se réappairer, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne (**Dacosta, 2003**).

Le rôle des RL est très complexe car ils peuvent assumer une fonction physiologique ou un effet toxique en fonction de leur concentration. À l'état physiologique, il existe un équilibre entre la production des radicaux libres dérivés de l'oxygène (ERO) et les systèmes antioxydants. Par contre, une production exagérée d'ERO provoquée essentiellement par un déséquilibre des défenses antioxydantes peut aboutir à des pathologies telles que les maladies dégénératives et le cancer (**Baudin, 2006**).

➤ Rôles physiologiques

Les radicaux libres remplissent de très nombreuses fonctions utiles. Ils participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes (**Favier, 2003**). Ils sont aussi impliqués dans la destruction des cellules tumorales par apoptose, le cycle cellulaire et la différenciation cellulaire (**Favier, 2003**). Ils peuvent aussi jouer un rôle de messagers secondaires ou activateurs des facteurs de transcription (**Haleng et al., 2007**).

➤ Rôles pathologiques

En excès, les radicaux libres deviennent pathologiques, par activation de l'expression des gènes codant pour des cytokines proinflammatoires ou des protéines d'adhésion. En outre, leur nature instable les rend très réactifs vis-à-vis de substrats biologiques et capables d'induire des modifications oxydatives délétères potentiellement impliquées dans l'apparition de plusieurs pathologies comme le cancer et les maladies neurodégénérative (**Haleng et al., 2007**).

Les antioxydants sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques des ROS., donc notre organisme réagit constamment à cette production permanente de radicaux libres (**Pincemail et al., 1999**). En effet, dans l'ensemble de nos tissus sains, les antioxydants sont capables de faire face et détruire les radicaux libres produits en excès. Cependant, dans certaines situations, en raison d'une surproduction radicalaire (tabac, alcool, pollution, ...) ou d'une diminution des capacités antioxydante (insuffisance d'apports des micronutriments antioxydants, inactivation enzymatiques) un déséquilibre entre la production des radicaux libres et le système de défense est à l'origine d'un état redox altéré de la cellule appelé stress oxydatif (**Sarma et al., 2010 et Mohankumar et al., 2012**).

Selon leur nature ces molécules peuvent être divisées en deux groupes :

- Antioxydants naturels : Qui peuvent être des composés phénoliques tels que (les tocophérols, les flavonoïdes, et les acides phénoliques), composés azotés (alcaloïdes, dérivés de chlorophylle, acides aminés, et amines), ou bien les caroténoïdes et l'acide ascorbique (**Favier, 2006**). Et Plusieurs substances pouvant agir en tant qu'antioxydants *in vivo* ont été proposés. Elles incluent : la vitamine E, l'acide

ascorbique, les β -carotènes, les flavonoïdes, les composés phénoliques,...etc. (Kohen et Nyska, 2002).

- Antioxydants synthétiques : Qui sont généralement préparés au laboratoire, et principalement à partir de composants chimiques avec des structures phénoliques de divers degrés de substitution alkylique, on cite parmi les antioxydants synthétiques : l'hydroxyanisole butylé (BHA) et l'hydroxy toluène butylé (BHT). Dans l'industrie alimentaire, l'ajout d'antioxydants naturels dans les aliments est une technique complètement nouvelle (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1972). Depuis à peu près 1980, les antioxydants naturels sont apparus comme alternative aux antioxydants synthétiques et sont aujourd'hui généralement préférés par les consommateurs. Toutefois, le fait de trouver communément une substance dans un aliment ne constitue pas une garantie de son absence totale de sa toxicité. Les antioxydants synthétiques ont été testés quant à leurs effets carcinogènes ou mutagènes, mais de nombreux constituants naturels des aliments n'ont pas encore été testés (Pelli et Lyly, 2003).

Les principales cibles biologiques touchées par les antioxydants sont :

- ✓ L'ADN :

L'ADN est une cible privilégiée des ERO. La guanine, par exemple, peut réagir avec le OH^\bullet pour former la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OH-dG) qui, en s'appariant avec l'adénine, entraîne des mutations au sein de l'ADN (Figure 4) qui peut aboutir au déclenchement du cancer (Haleng *et al.*, 2007).

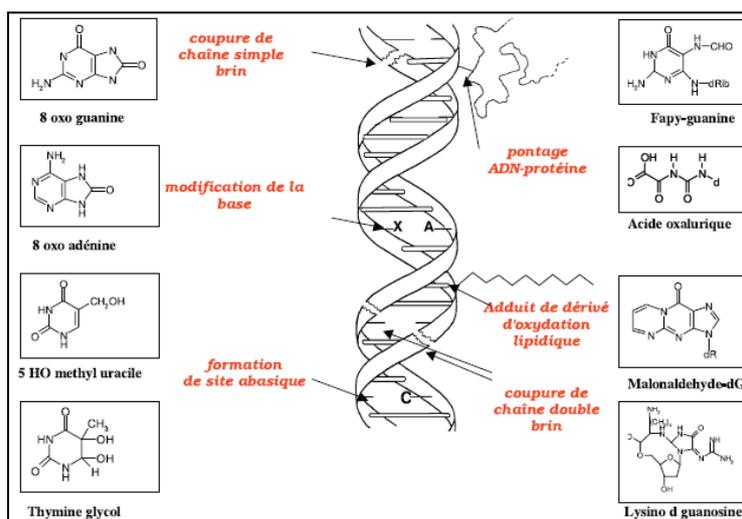


Figure 4 : Exemple de Mutations de l'ADN formées par attaque radicalaire (Favier, 2003).

✓ Les lipoprotéines :

L'attaque radicalaire des lipoprotéines circulantes aboutit à la formation de LDL oxydées, qui seront captées par des récepteurs spécifiques des macrophages. L'activité de ces récepteurs n'étant pas régulée par la concentration intracellulaire en cholestérol, les macrophages se transforment petit à petit en cellules spumeuses (rôle important dans les premières étapes de l'athérosclérose) (**Nakajima, 2006**).

✓ Les protéines et acides aminés :

Les modifications des structures primaires, secondaires et tertiaires des protéines par les ERO sont à la base de la formation de dérivés protéiques carbonylés (**Pincemail et al., 2009**). Les acides aminés les plus réactifs sont l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine. Toute attaque radicalaire provoque des dommages qui sont, pour la plupart irréparables et peuvent entraîner des modifications fonctionnelles importantes (non reconnaissance d'un récepteur par un ligand et perte d'activité enzymatique) (**Haleng et al., 2007**).

✓ Les lipides membranaires :

Le mécanisme d'attaque oxydante des RL sur la membrane cellulaire est appelé la peroxydation lipidique (**Baudin, 2006**). Il est discuté dans la section suivante :

❖ La peroxydation lipidique :

La peroxydation lipidique est engendrée par des attaques radicalaires sur les composés les plus sensibles de la membrane cellulaire qui sont les acides gras polyinsaturés (AGPI), dont l'oxydation est d'autant plus importante que le nombre de doubles liaisons est élevé (**Acar et Lecert, 2007**). Le dommage oxydatif des lipides membranaires (phospholipides, cholestérols), modifie la perméabilité et la fluidité de la membrane et altère son intégrité cellulaire (**Guéraud et al., 2010**). Ce processus est constitué d'une réaction en chaîne divisée en trois étapes:

-L'initiation

Le radical hydroxyle arrache un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons d'un acide gras polyinsaturé (AGPI), pour former un radical diène conjugué, qui en présence d'oxygène va être oxydé en radical peroxy (Figure 3) (**Hennebelle et al., 2004**).

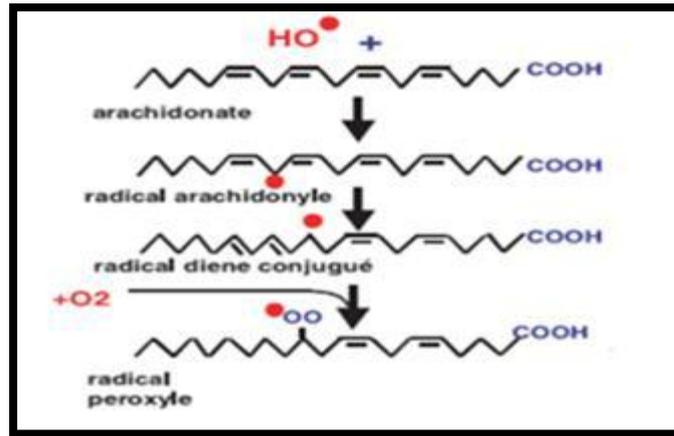


Figure 5 : Initiation de la peroxydation lipidique (Favier, 2003).

-La propagation

Le radical peroxyde (ROO•) formé dans la première phase est suffisamment réactif pour arracher un H⁺ à un (AGPI) voisin provoquant ainsi la propagation de la réaction (Figure 4) (Atkin *et al.*, 2005).

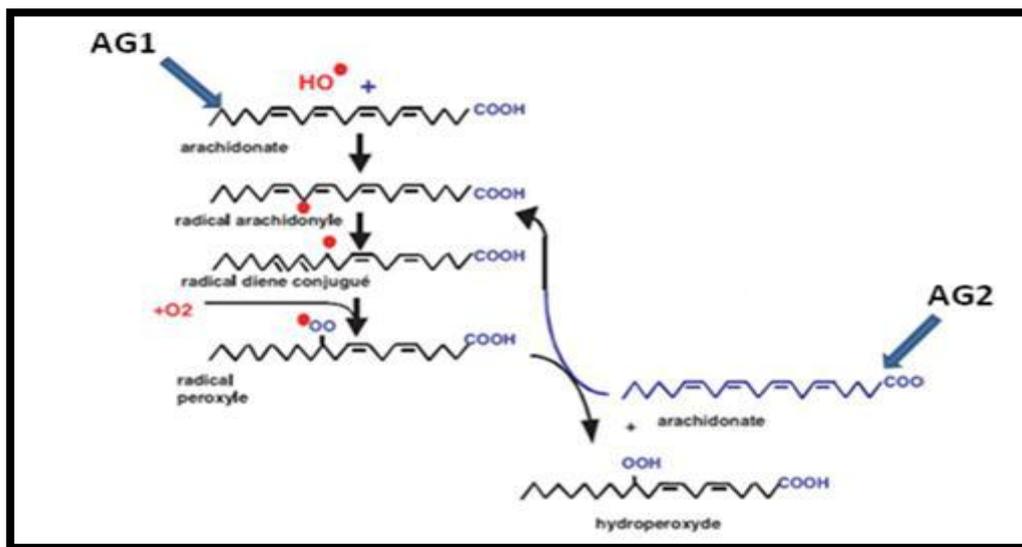


Figure 6 : La propagation de la peroxydation lipidique à d'autres AGPI (Favier, 2003).

-La terminaison

Cette phase consiste à la recombinaison des deux peroxyde pour former un peroxyde relativement stable ($RO_2^- + RO_2^- \rightarrow ROOR + O_2$). La décomposition des peroxydes libère de nombreux produits tels que des aldéhydes (malondialdéhyde, 4-hydroxynonéal) à partir de la

plupart des AGPI, et des isoprostanes à partir de l'acide arachidonique (Figure 5) (Baudin, 2006).

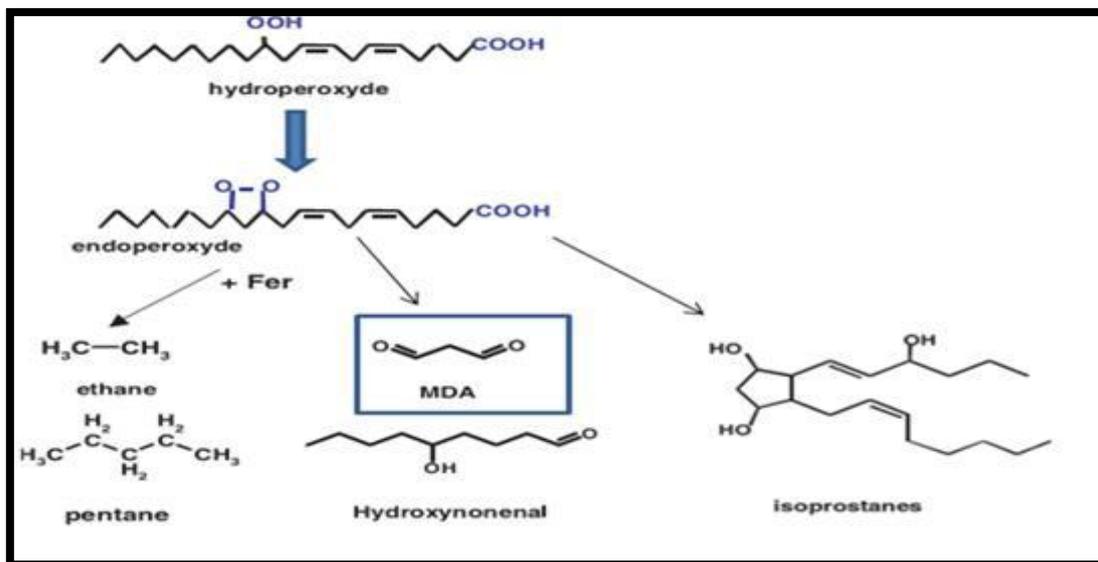


Figure 7 : Produits terminaux de la peroxydation lipidique (Favier, 2003).

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition (Favier, 2003).

- Les polyphénols possèdent des propriétés antioxydants et sont capables de piéger les radicaux libres générés en permanences par notre organisme ou formés en réponse à des agressions de notre environnement (cigarette, polluants, infection) tel que $O_2^{\cdot-}$ (superoxyde anion), HO_2^{\cdot} (perhydroxy radical), H_2O_2 (hydrogène peroxyde), OH^{\cdot} (hydroxyle radical), RO^{\cdot} (alkoxyl radical), ROO^{\cdot} (peroxyl radical), O_2 (singlet oxygène) (Moulaoui *et al.*, 2015).
- Les flavonoïdes ont la capacité de piéger les radicaux libres formés dans divers circonstances tels que : le cas d'anoxie (absence d' O_2) qui engendre la production de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), et en cas d'inflammation qui correspond à la production d'anions superoxydes par la NADPH-oxydase chez les leucocytes activés ou bien par dismutation et on va également obtenir le radical hydroxyde (OH^{\cdot}) (Bruneton, 2009).

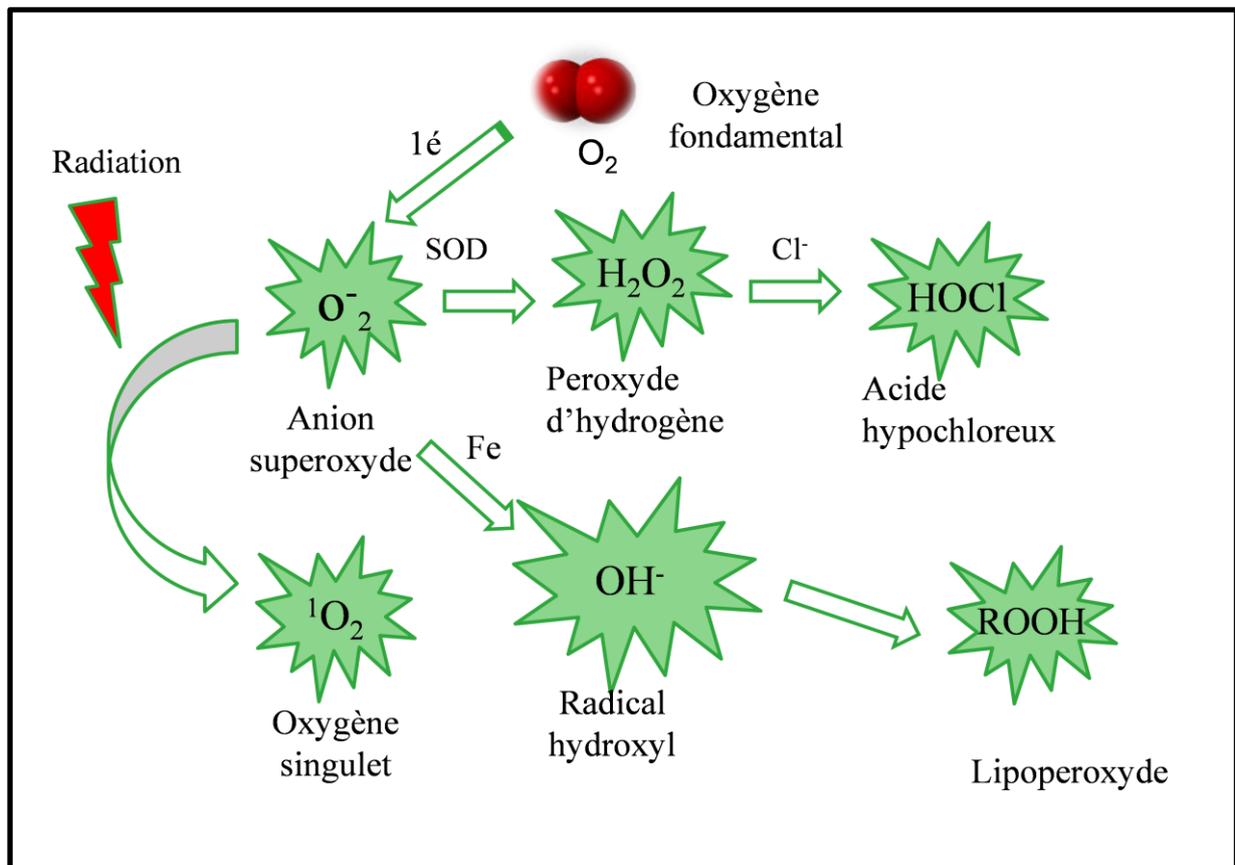


Figure 8: Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants (Milbury et Richer, 2008).

Récemment, plusieurs recherches avancées s'intéressent à l'activité antioxydante des molécules bioactives des actinomycètes et qui ont montré que ses biomolécules d'actinomycètes possèdent des activités antioxydants de différentes origines (Subathra Devi et al., 2012 et Phani Bhushan et al., 2016).

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Mycologie de l'université A/MIRA-Bejaia, sous la direction de M^{me} BOUDRIES, pendant la période allant du 01/03/2017 au 16/05/2017.

I. Matériel biologique

I.1. Les souches d'Actinomycètes productrices

Quatre souches d'actinomycètes sont étudiées dans ce travail, notées *NA44*, *ND101*, *B01* et *SC20* isolées du sol de la région de Bejaia en juillet 2013 et identifiées par M^{me} BOUDRIES, ont fait l'objet d'une étude de leur potentiel de production d'antibiotiques et d'antioxydants.

I.2. Germes cibles utilisées

Dans cette étude 5 germes cibles sont testés pour la mise en évidence des activités antimicrobiennes à savoir. 2 bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus* résistant à la méthiciline (SARM) ATCC 43300 et *Listeria innocua* CLIP 774915), 2 bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli* ATCC 25922 et *Vibrio cholerae* ATCC 14035) et une levure (*Candida albicans* ATCC 10231). Les bactéries cibles sont gracieusement offertes par l'Institut Pasteur d'Algérie.

II. Méthodes

II.1. Repiquage des souches

Les souches d'actinomycètes conservées sur le milieu SCA (Starch- Caséine-Agar) à 4°C sont repiqués sur le même milieu correspondant à leur milieu d'isolement et incubées à une température de 28°C pendant 5 jours pour revivifier et de vérifier leur pureté.

II.2. Production des biomolécules par fermentation solide

Les souches étudiées sont ensemencées en stries serrés sur des boites de Pétries contenant le milieu Mincer modifié favorisant la production des antibiotiques puis incubées à 28°C pendant 7 jours.

II.3. Extraction des molécules actives

Les composés actifs produits par chaque isolat sont extraits par macération des cultures d'actinomycètes dans l'acétate d'éthyle (v/v) après 7 jours d'incubation à 28°C. Le contenu boites des cultures d'actinomycètes sur milieu Mincer modifié est découpé et est

soumis à une extraction solide-liquide dans un volume équivalent en acétate d'éthyle. Le mélange est laissé macérer pendant une nuit à température ambiante à l'abri de la lumière et sous agitation.

A l'aide d'un papier filtre le macérat est filtré puis le solvant est évaporé à sec à l'aide d'un Rotavapor (**Buchi Rotavapor R-114**) à 40°C et l'extrait sec est récupéré dans du méthanol afin d'avoir des extraits a concentration d'environ 30 mg/ml.



Figure 9: Photographie du Rotavapor.

II.4. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des extraits bruts

L'activité antimicrobienne des extraits bruts des quatre souches d'actinomycètes est évaluée par la méthode des puits. Sur le milieu Muller Hinton (Bactéries) ou Sabouraud (levure) préalablementensemencé par écouvillonnage avec le germe cible à raison de 10^7 UFC/m, des puits de 6 mm de diamètre sont formés à l'aide d'un emporte-pièce et un volume de 100 μ l de chaque extrait méthanolique est testé. Le même volume de méthanol 95% est utilisé comme témoin négatif. Les boîtes sont mises à 4°C pendant 2h afin de permettre la diffusion des substances bioactives éventuellement produites avant d'être incubées à 37°C pendant 18 à 24h et la lecture des résultats s'effectue en mesurant le diamètre des zones d'inhibitions formées autour des puits à l'aide d'un pied à coulisse.

Le teste est illustré dans la figure 6.

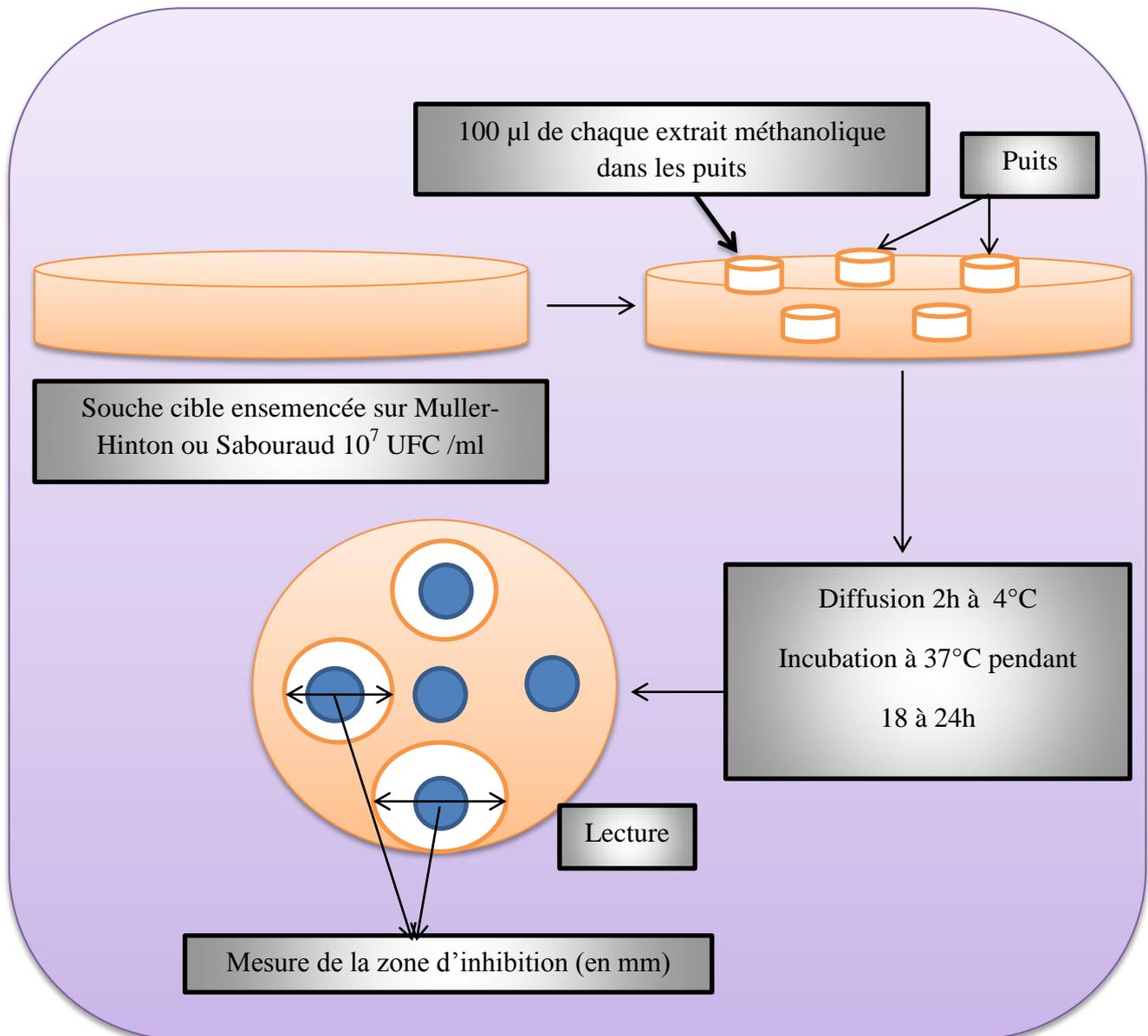


Figure 10: Test de mise en évidence d'activité antimicrobienne par la méthode des puits.

II.5. Etude de l'activité antioxydante

II.5.1. Dosage des polyphénols totaux

➤ Principe

La méthode utilisée pour le dosage des polyphénols totaux est celle au Folin-Ciocalteu. Il sera réduit, lors de l'oxydation des phénols et la coloration produite présente un maximum d'absorption à 765 nm, dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en composés phénoliques (Felsenstein, 1985).

➤ Mode opératoire

Le dosage des composés phénoliques totaux est effectué par la méthode décrite par (Junaid *et al.*, 2013) légèrement modifiée avec le réactif de Folin-Ciocalteu :

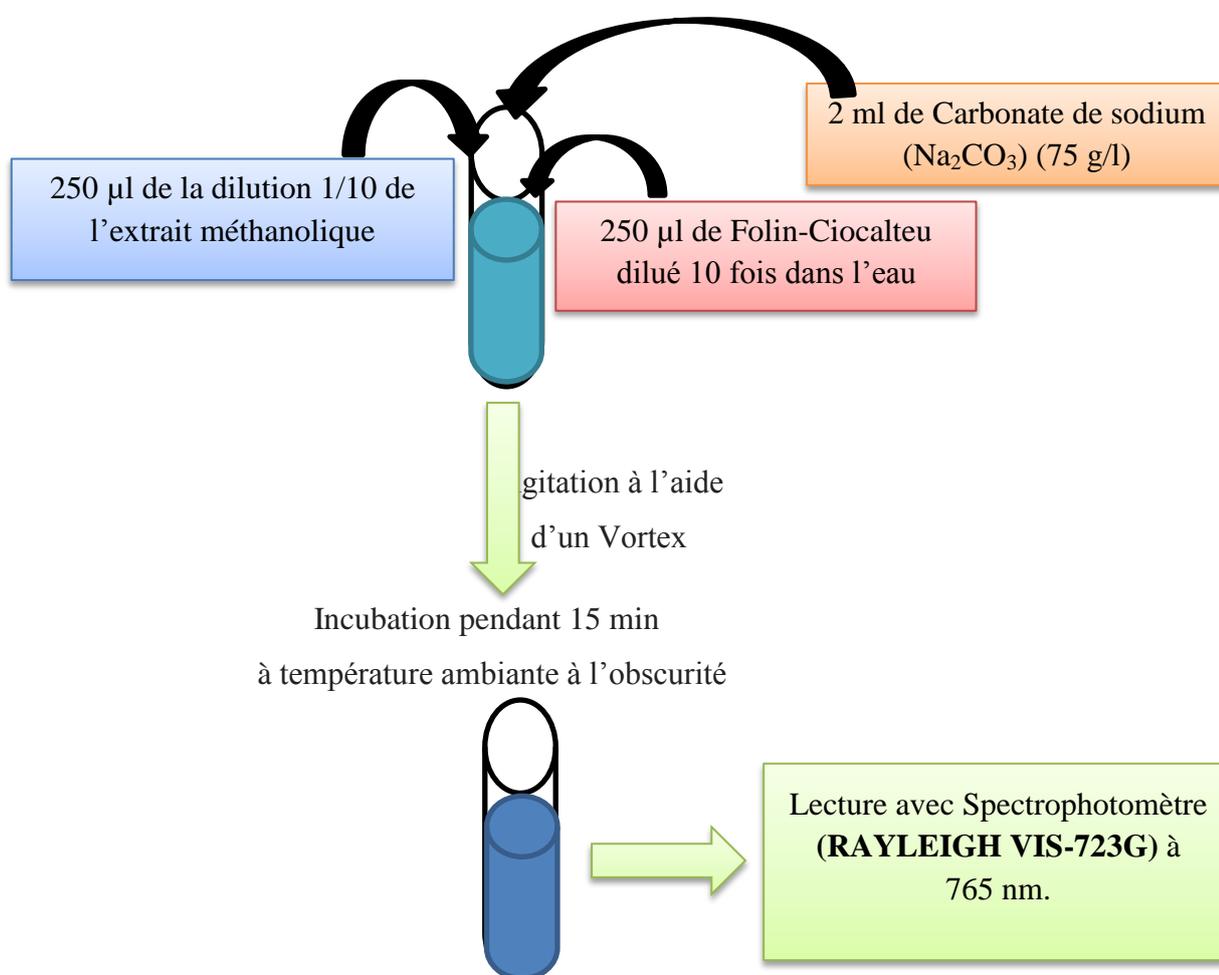


Figure 11: Schéma du mode opératoire du dosage des polyphénols totaux (Junaid *et al.*, 2013).

Un témoin est préparé en substituant l'extrait par le solvant d'extraction. La quantification des composés phénoliques est effectuée en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée en utilisant l'acide gallique comme standard. A partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage. La teneur des extraits bruts en polyphénols totaux est exprimée en équivalent milligramme d'acide gallique par gramme d'extrait sec.

II.5.2. Dosage des flavonoïdes

➤ Principe

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle libre, en position 5, susceptible de donner, en présence de chlorure d'aluminium, un complexe jaunâtre par chélation des ions Al^{+3} . La coloration jaune produite est proportionnelle à la concentration en flavonoïdes présents dans l'extrait (**Ribéreau-Gayon, 1968**).

➤ Mode opératoire

Pour quantifier les flavonoïdes dans les extraits, la méthode au trichlorure d'aluminium (**Bahorun et al., 1996**) légèrement modifié est utilisée.

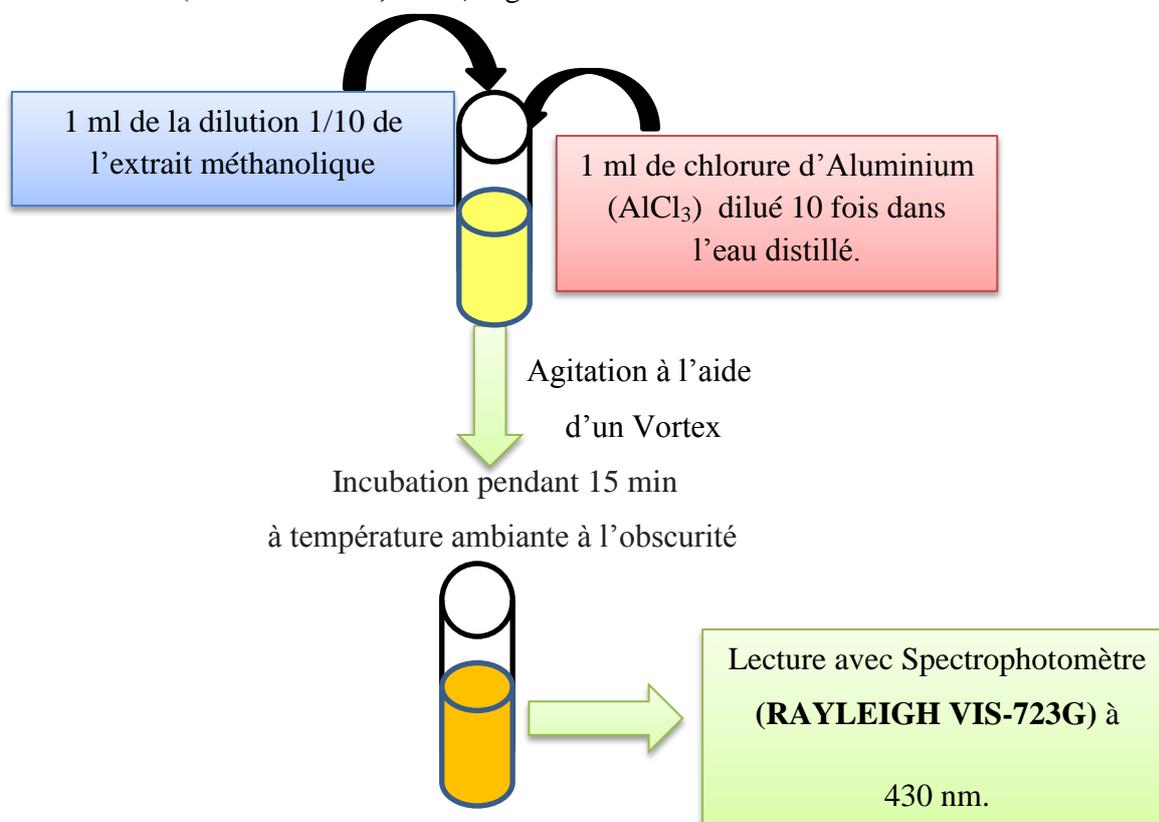


Figure 12: Schéma du mode opératoire du dosage des flavonoïdes (**Bahorun et al., 1996**).

ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration (Bougandoura, 2013).

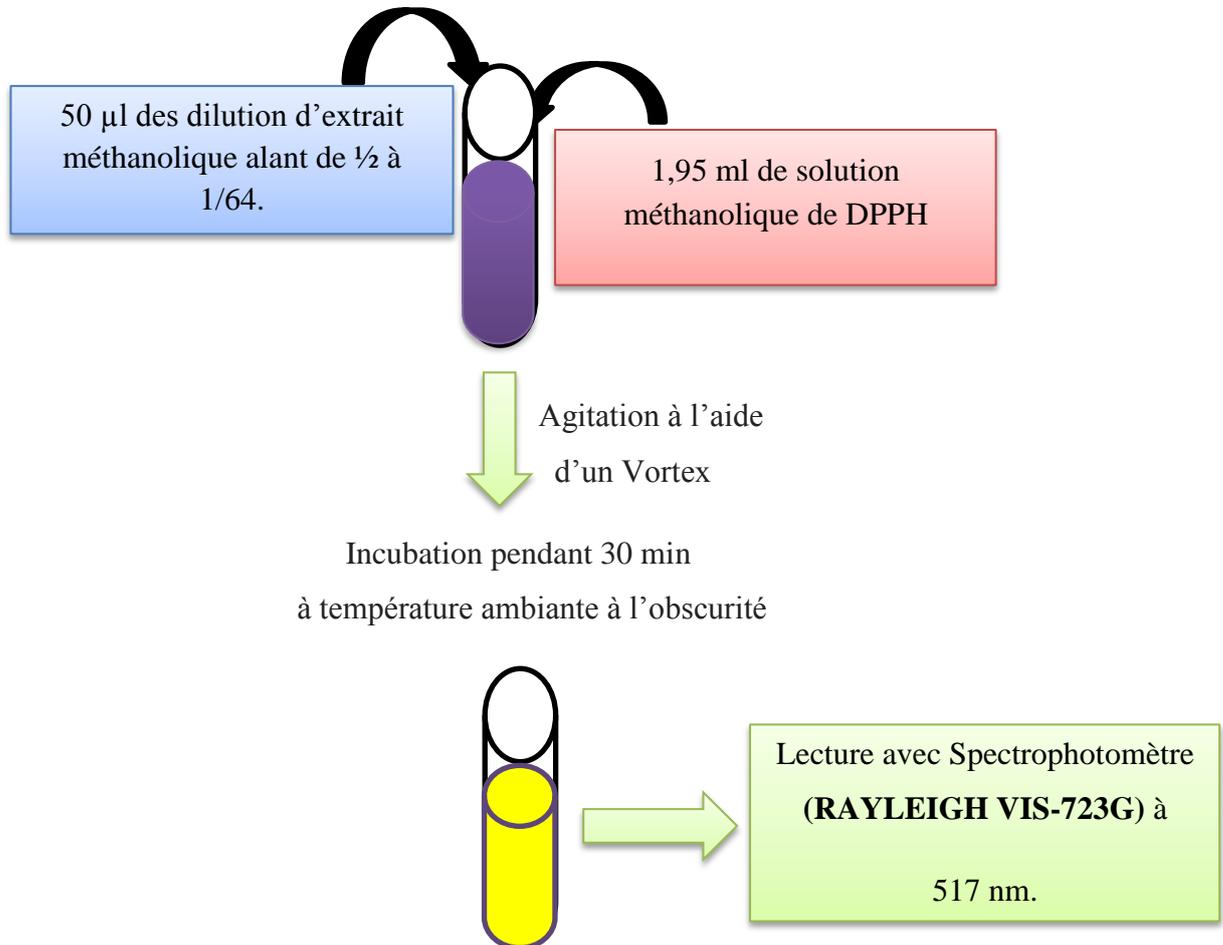


Figure 14: Schéma du mode opératoire du piégeage du radical DPPH (Athamena *et al.*, 2010).

Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH est calculé en utilisant l'équation suivante :

$$\% \text{ d'inhibition du DPPH} = [(A_t - A_e) / A_t] * 100$$

Où : **A_t**: Absorbance du témoin

A_e: Absorbance de l'échantillon

➤ **Calcul des IC₅₀**

L'IC₅₀ est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % du radical DPPH, les IC₅₀ sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes

tracés, (pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testés et les standards).

II.5.3.2. Piégeage du radical libre ABTS

➤ Principe

La méthode du radical ABTS est l'un des tests les plus utilisés pour la détermination de la concentration des radicaux libres. Elle est basée sur la capacité des composés à piéger le radical-cation $ABTS^{\bullet+}$, (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)). Le radical est formé par oxydation de l'ABTS bleu avec différents composés. Le composé à tester est ajouté au radical préformé, l'absorbance résiduelle du radical $ABTS^{\bullet+}$ est mesurée à 734 nm après 1, 4 ou 6 minute(s) d'incubation.

Le radical $ABTS^{\bullet+}$ est formé par arrachement d'un électron (e^-) à un atome d'azote de l'ABTS. En présence d'un antioxydant donneur de H^\bullet , le radical d'azote concerné piège un H^\bullet , conduisant à l' $ABTSH^+$, ce qui entraîne la décoloration de la solution (Zhishen J. *et al.*, 1999).

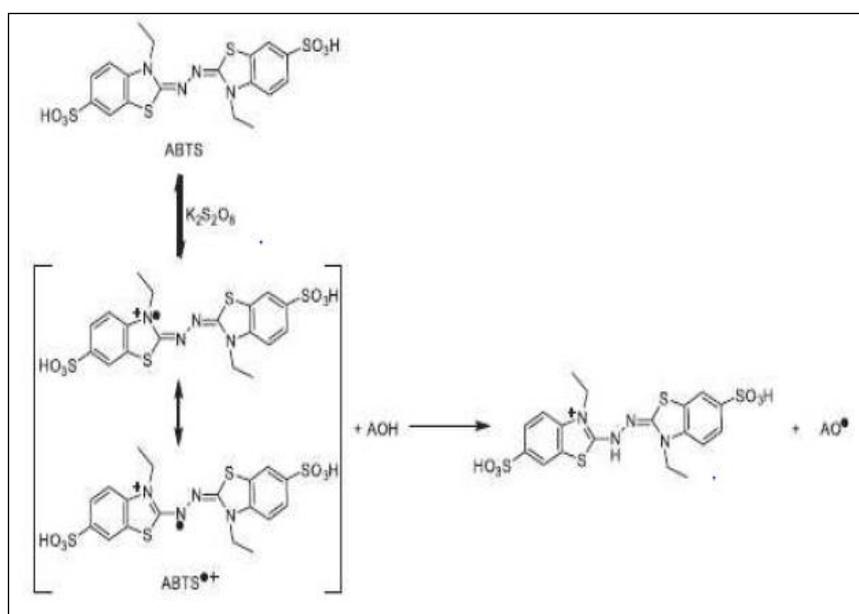


Figure 15: Génération du radical-cation $ABTS^{\bullet+}$ avec le persulfate de potassium et sa réaction avec un antioxydant (AOH) (de Oliveira *et al.*, 2014).

➤ **Mode opératoire**

Le radical cation ABTS est généré en mélangeant à volume égal une solution à 3 mM de persulfate de potassium $K_2S_2O_8$ et une solution stock d'ABTS à 8 mM, le tout est conservé à l'abri de la lumière et à la température ambiante durant 16 h avant utilisation (Awika et al., 2004). La solution obtenue aura une absorbance de 0.7 à 734 nm.

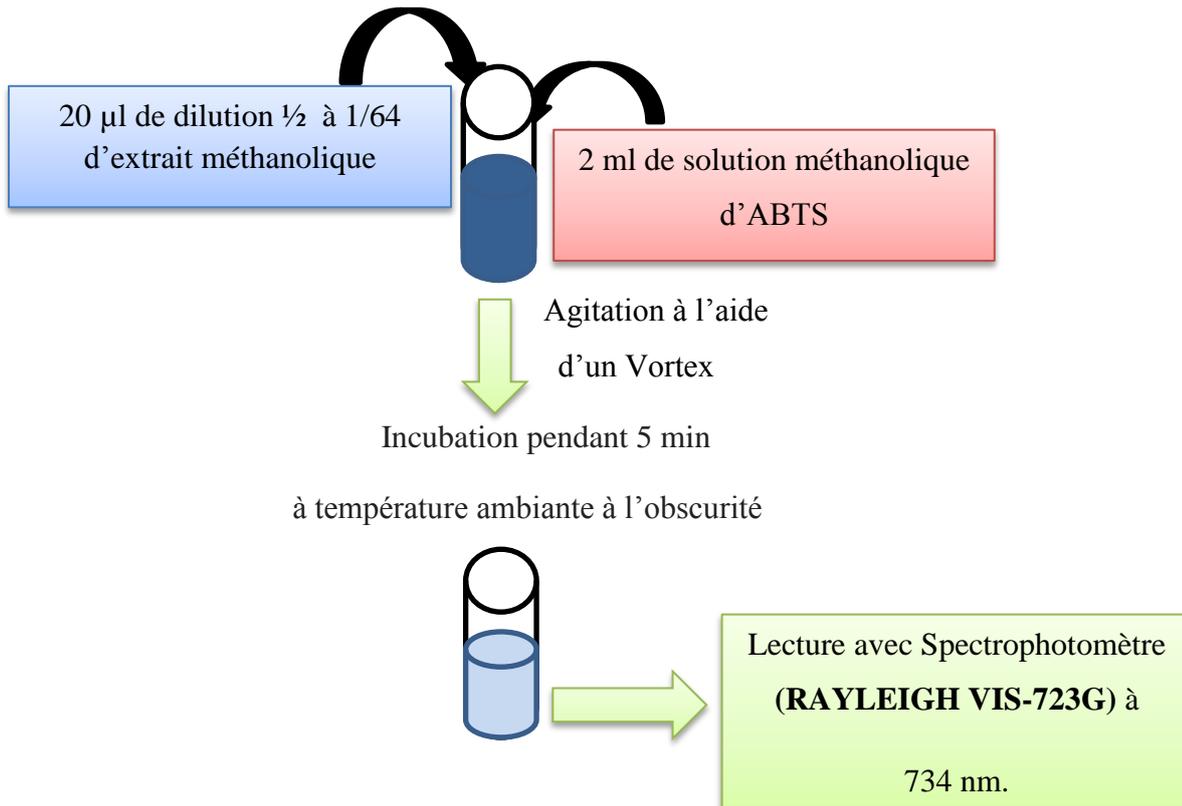


Figure 12: Schéma du mode opératoire du piégeage du radical ABTS (Awika et al., 2004).

Le pourcentage d'inhibition du radical ABTS est calculé en utilisant l'équation suivante :

$$\% \text{ d' inhibition de l'ABTS} = [(A_t - A_e) / A_t] \cdot 100$$

Où : **A_t**: Absorbance du témoin

A_e: Absorbance de l'échantillon

➤ **Calcul des IC₅₀**

L'IC₅₀ est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % du radical d'ABTS, les IC₅₀ sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés, (pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées et les standards).

II.5.3.3. Pouvoir réducteur de l'ion ferrique

➤ **Principe**

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir anti-radicalaire. Cette technique permet de mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe³⁺) présent dans le complexe de ferrocyanure de potassium en fer ferreux (Fe²⁺) qui peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu vert dans le milieu réactionnel à 700 nm (**Chung *et al.*, 2002**).

Le pouvoir réducteur du fer (Fe³⁺) dans les extraits est déterminé selon la méthode décrite par **Oyaizu, 1986**.

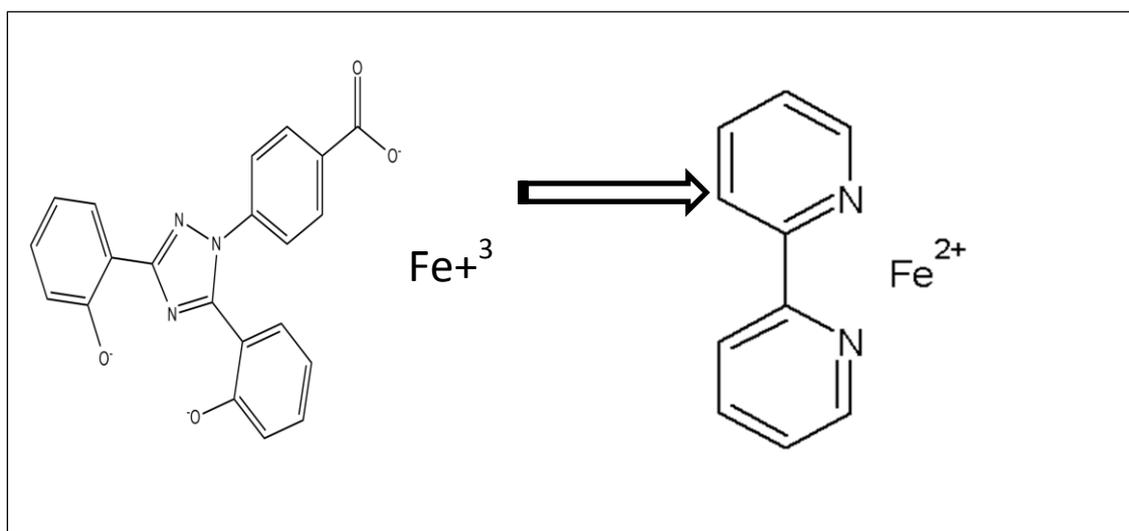


Figure 16 : Schéma de la réaction de teste du pouvoir réducteur du Fe³⁺ en Fe²⁺.

➤ **Mode opératoire**

Le pouvoir réducteur du fer (Fe³⁺) dans les extraits est déterminé selon la méthode décrite par **Oyaizu, 1986**. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un

antioxydant standard; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration (Bougandoura, 2013).

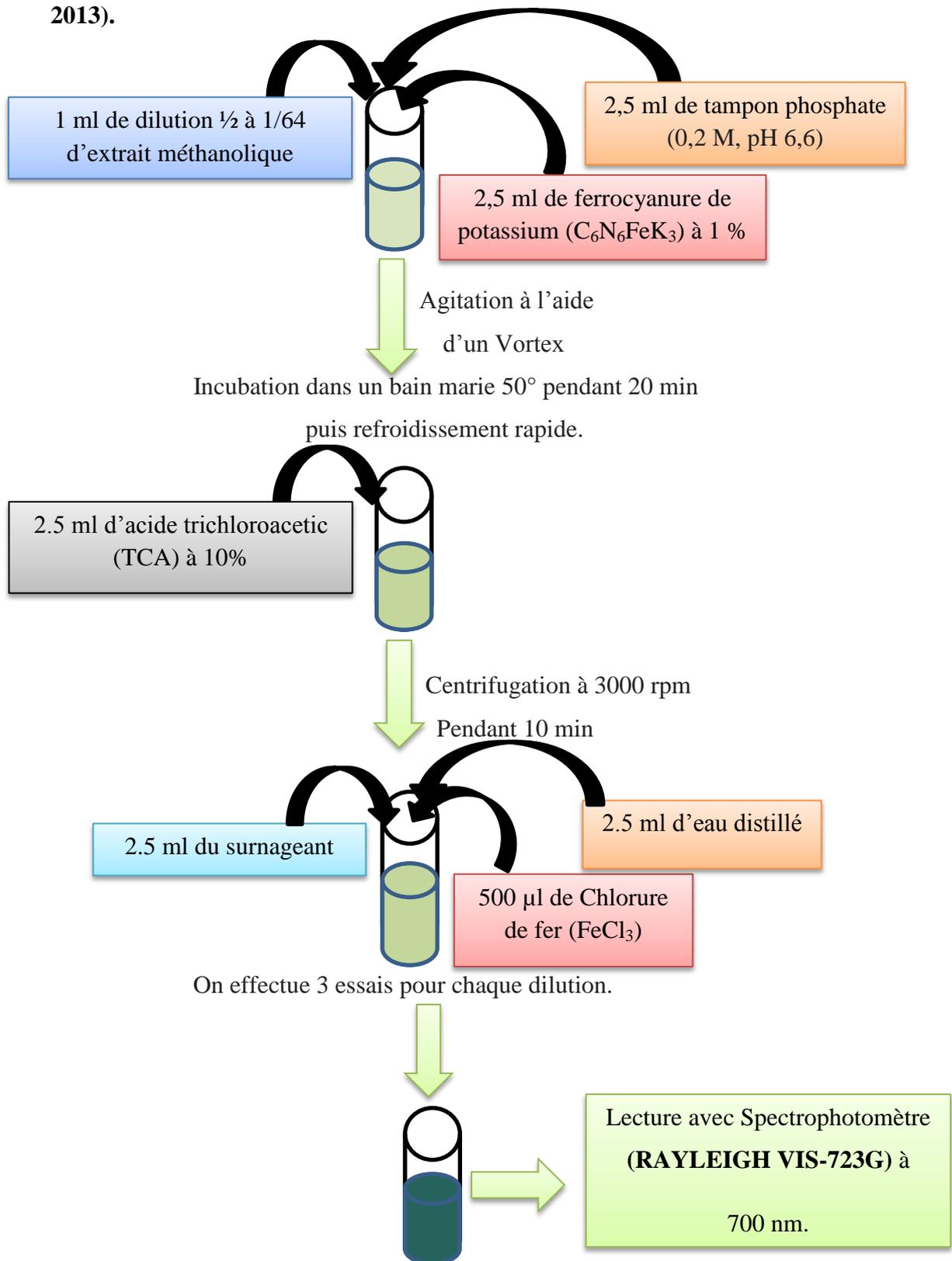


Figure 17: Schéma du mode opératoire du pouvoir réducteur, Oyaizu (1986).

➤ **Calcul des IC₅₀**

L'IC₅₀ est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % du fer ferrique (Fe³⁺) qui sera transformé en fer ferreux (Fe²⁺), les IC₅₀ sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés.

La lecture a été faite à l'aide d'un spectrophotomètre.

Dans cette partie les résultats obtenus la pour la mise en évidence de l'activité antimicrobienne et antioxydante des extraits bruts issus de quatre souches d'actinomycètes seront présentés et discutés.

I. Production et extraction des molécules actives par fermentation solide

L'extraction solide-liquide dans l'acétate d'éthyle des molécules actives produites pas nos isolats nous a permis d'obtenir 4 extrait bruts avec des concentrations variables comme précisé dans le tableau suivant :

Tableau 1 : Concentrations des extraits bruts des 4 isolats étudiés obtenus après macération.

Extrait	Concentration (mg/ml)
<i>SC20</i>	36,9
<i>B01</i>	31,33
<i>NA44</i>	30,5
<i>ND101</i>	38

II. Etude de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne est mise en évidence par la technique des puits réalisé sur milieu Muller-Hinton (bactéries) ou sabouraud (levure) vis-à-vis des cultures jeunes de cellules des germes cibles et es résultats obtenus sont illustrés dans la figure suivante :

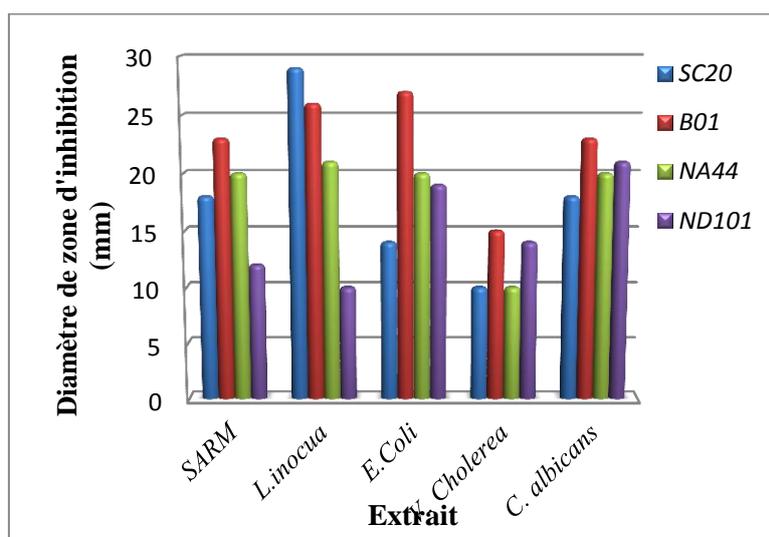


Figure 18: Histogramme représentant l'activité antimicrobienne des extraits bruts des souches *SC20*, *B01*, *NA44* et *ND101* à l'égard de 5 germes cibles.

Les résultats montrent que tous les extraits testés présentent une activité antibactérienne et antifongique vis-à-vis des cinq germes testés dont le diamètre des zones d'inhibition est variable d'un extrait à un autre et selon la cible.

La plus importante activité anti-Gram négatif est enregistrée avec l'extrait **B02** avec des diamètres de zones d'inhibition correspondants à 27 mm vis-à-vis d'*E. Coli* et à 15 mm à l'égard de *V. cholerae* suivi par l'extrait de **ND101** avec des diamètres de zones de 19 mm et de 14 mm vis-à-vis des même germes cibles respectivement. L'activité anti-Gram positif est notée également avec l'extrait **B01** indiquant des diamètres de 26 mm et de 23 mm contre *L. innocua* et SARM respectivement suivi par l'extrait de **SC20** qui génère des zones d'inhibition de 29 mm et de 18 mm à l'égal des mêmes cibles respectivement. Compte à l'activité vis-à-vis de *C. albicans* une zone d'inhibition de 23 mm est notée avec l'extrait **B01** puis de 21 mm, 20 mm et de 18 mm en utilisant les extraits **ND101**, **NA44** et **SC20** respectivement. La figure 16 illustre les résultats du test des puits.

De ses résultats il ressort que nos souches d'actinomycètes sont dotées d'une activité à la fois antifongique qu'antibactérienne avec des activités variable selon la cible et *V. cholerae* s'est avéré le moins sensibles aux extraits testés.

Plusieurs études rapportent l'aptitude des actinomycètes à produire plusieurs antibiotiques ou des molécules à large spectre d'action dont celle effectuée par **Boughachiche et al., (2012)**, ayant isolé des souches rares d'actinomycètes dotées d'un large spectre d'activité antibactérienne. Sur le même thème **Junaid et al., (2013)**, a cherché l'activité antimicrobienne pour de la souche *Streptomyces* espèce *SRDP-TK-07* isolé du sol en Inde, les extraits

Une étude similaire est réalisée par **Subathra Devi et al., (2012)** sur des actinomycètes isolées du sol, ou l'activité antimicrobienne de ses derniers ou ils ont donné une activité à large spectre mais avec des diamètres de zones d'inhibition moins importants qui varies de : 11mm à 19 mm comparant avec nos diamètres, on constate que nos extraits ont une activité plus importante.

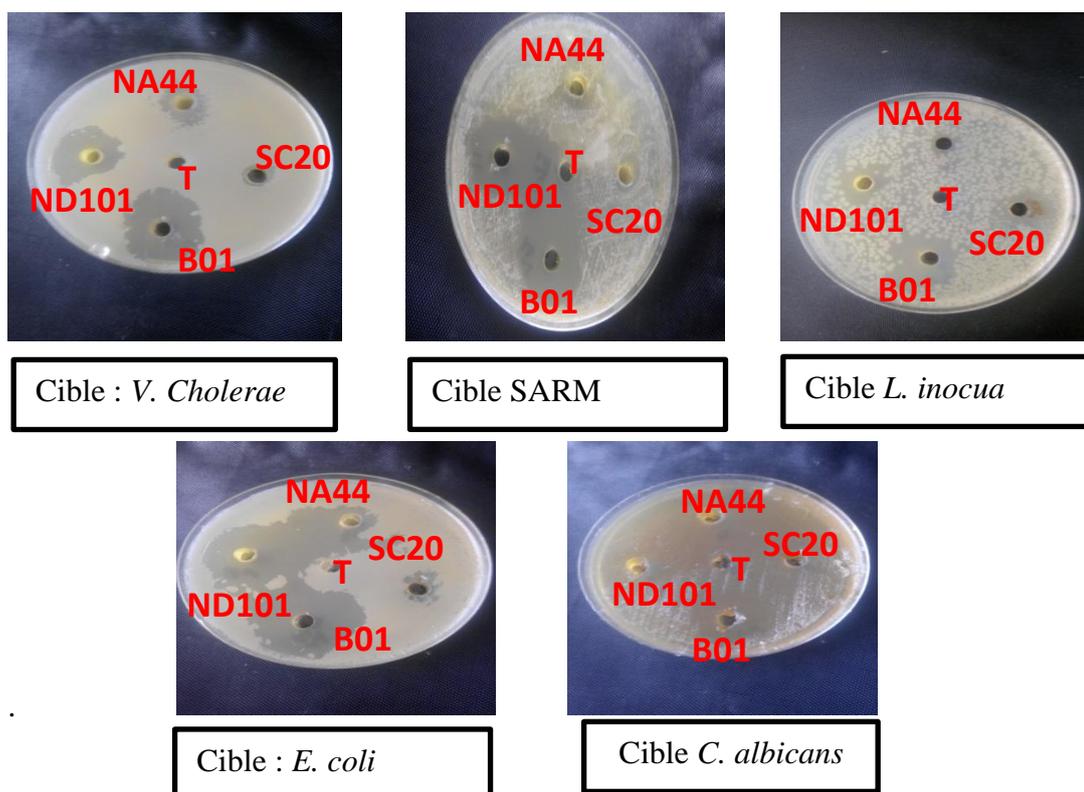


Figure 19 : Résultats du test des puits des souches d'actinomycètes sélectionnées.

III. Etude de l'activité antioxydante

III.1. Dosage des polyphénols totaux

Le contenu phénolique a été considéré comme le principal antioxydant dans les espèces réactives. La teneur en composés phénoliques de chaque extrait des 4 souches d'actinomycètes (*SC20*, *B01*, *NA44* et *ND101*) est calculée à partir de la courbe d'étalonnage et exprimée en milligrammes équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec. Chaque valeur dans la figure 18, qui représente les résultats du dosage des polyphénols en se référant à l'acide gallique en calculant la moyenne des trois expériences réalisées \pm écart type. La courbe d'étalonnage de l'acide gallique est présentée dans l'annexe II.

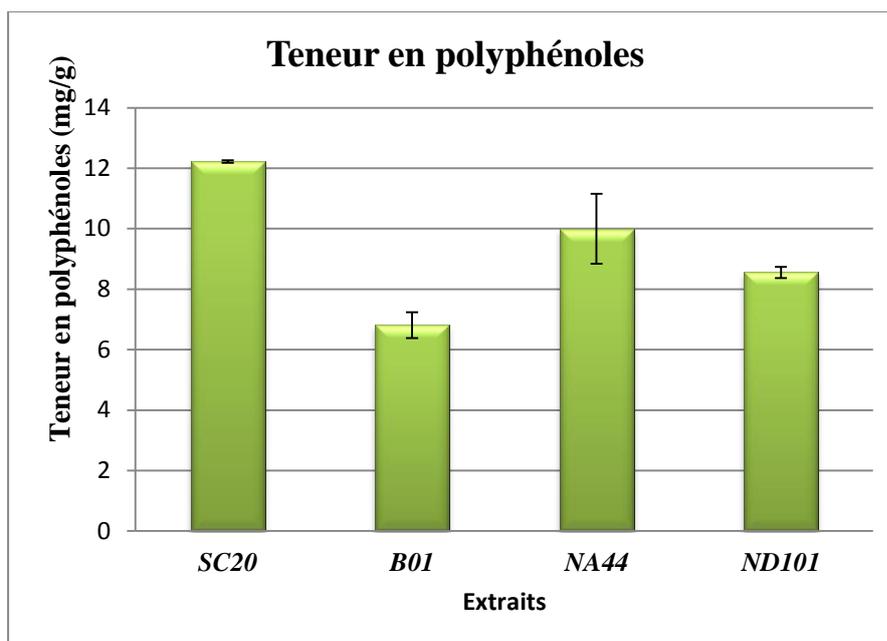


Figure 20: Histogramme de la teneur en polyphénols des extraits bruts des souches d'actinomycètes étudiées.

Les résultats montrent que l'extrait brut de la souche **SC20** est le plus riche en polyphénol parmi les 4 testés avec une teneur de $12,22 \pm 0,04$ mg/g d'extrait puis celui de **NA44**, de **ND101** et enfin **B01** avec des teneurs moins importantes en polyphénols relatives à : $10 \pm 1,15$ mg/g, $8,55 \pm 0,18$ mg/g et $6,81 \pm 0,43$ mg/g d'extrait respectivement.

La teneur en polyphénols totaux été dosés dans des travaux similaires chez des souches d'actinomycètes et dans des extraits à l'acétate d'éthyle et les résultats obtenus indiquent que nos extraits sont plus riches en polyphénols comparant aux teneurs obtenus par **Prashith et al., (2013)** et qui étés de 0,0875 mg/g dans l'extrait d'une *Streptomyces* (SRDP-HO3) et par **Mathon et al., (2015)** ayant une notés 0,24 mg/g d'extrait d'une souche d'actinomycète (KB1).

III.2. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes pour chaque extrait des 4 souches d'actinomycètes (**SC20**, **B01**, **NA44** et **ND101**) est calculée à partir de la courbe d'étalonnage et exprimée en milligrammes équivalent de la quercétine par gramme d'extrait sec. Chaque valeur dans la figure 19 est obtenue en calculant la moyenne de trois expériences \pm écart type. La courbe d'étalonnage de la quercétine est présentée dans l'annexe II.

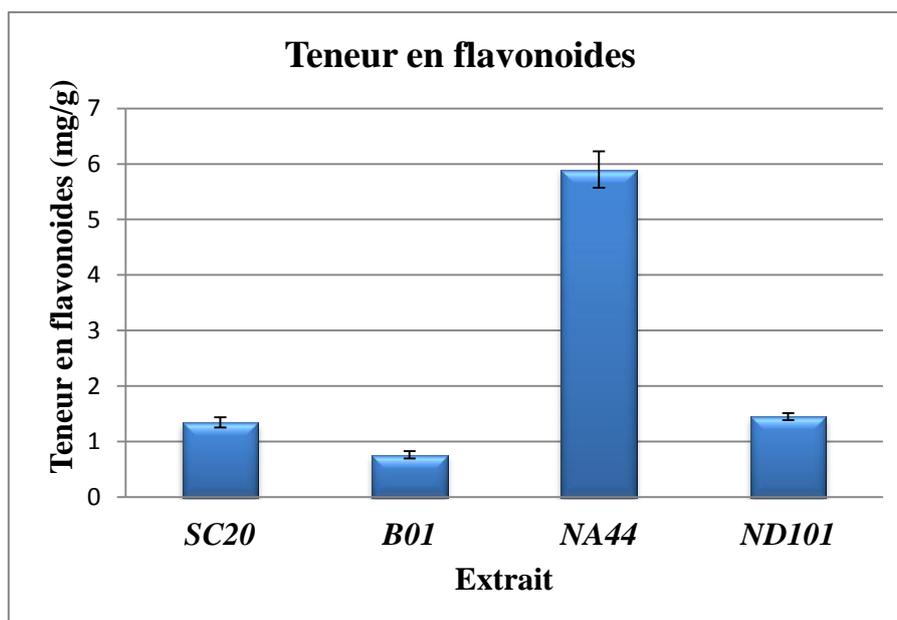


Figure 21: Histogramme de la teneur en polyphénols des extraits bruts des souches d'acétomycètes étudiées. L'histogramme illustre que l'extrait de la souche *NA44* est plus riche en flavonoïdes avec une teneur de $5,9 \pm 0,33$ mg/g d'extrait, suivi par celui de la *ND101*, *SC20* et *B01* avec des teneurs moins importantes à savoir: $1,45 \pm 0,062$ mg/g, $1,34 \pm 0,09$ mg/g et $0,76 \pm 0,06$ mg/g d'extrait respectivement.

III.3. Piégeage du radical libre DPPH

Ce test est l'une des méthodes les plus fréquentes et relativement rapides utilisées pour tester l'activité radicalaire des substances biologiquement actives (Molyneux *et al.*, 2007). Ce radical présente une absorbance caractéristique dans un intervalle compris entre 512 et 517 nm et il est de couleur violette mais se décolore rapidement et devient jaune quand il est réduit. La capacité des antioxydants présents dans le milieu est proportionnelle à l'intensité de la couleur.

Chaque valeur dans la figure 20 est obtenue en calculant la moyenne des pourcentages d'inhibition (PI%) de trois expériences et se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique présentée dans l'annexe II.

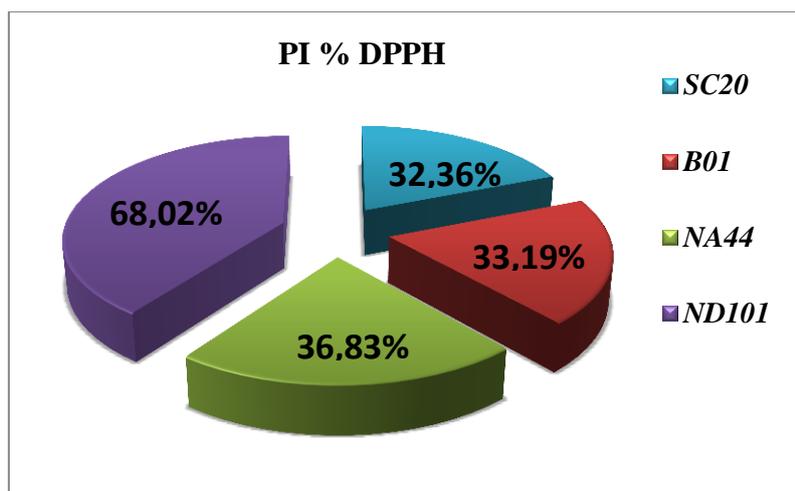


Figure 22: Présentation des pourcentages d'inhibition du DPPH de 4 extraits bruts de souches d'actinomycètes étudiées.

D'après ces résultats obtenus l'extrait brut de l'isolat ND101 présente le pourcentage d'inhibition le plus élevé avec 68,02 % suivi les extraits des souches *NA44*, *B01* et *SC20* avec des pourcentages d'inhibition de 36,83%, 33,19% et 32,36 % respectivement.

Chaque valeur dans la figure suivante a été obtenue en calculant la moyenne de trois expériences \pm l'écart type par le calcul des IC_{50} pour chaque extrait.

La comparaison des pourcentages d'inhibition n'est pas vraiment crédible dans l'évaluation de l'activité du piégeage du DPPH des quatre extraits bruts vu la concentration variable de ces derniers. Cette comparaison doit se faire se basant sur les valeurs des IC_{50} des extraits. Celle-ci est définie comme étant la concentration nécessaire pour réduire 50% du radical libre DPPH. Chaque valeur dans la figure 21 est obtenue en calculant la moyenne de trois expériences \pm écart type par le calcul des IC_{50} pour chaque extrait.

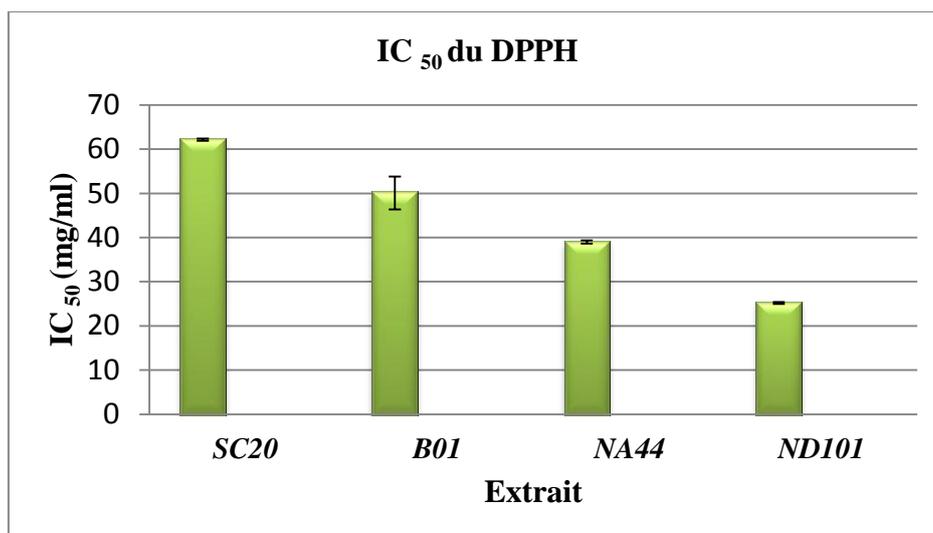


Figure 24: Histogramme des IC₅₀ de l'activité du piégeage du radical libre DPPH par les extraits brutes des isolats étudiés.

Comparant les résultats des pourcentages d'inhibition du radical DPPH et les valeurs des IC₅₀ obtenus pour les extraits de nos quatre isolats d'actinomycètes, nous remarquons que l'extrait de la souche *ND101* présentant la plus faible valeur d'IC₅₀ correspondante à 25,16 ± 0,21 mg/ml présente le pourcentage d'inhibition du DPPH le plus élevé avec 68,02 %. Cet extrait est suivi par l'extrait *NA44*, *B01* et *SC20* avec des valeurs des IC₅₀ relatives à 38,95 ± 0,36 mg/ml, 50,08 ± 3,71 et 62,16 ± 0,25 mg/ml et correspondantes à des pourcentages d'inhibition du DPPH de 36,83 %, 33,19% et 32,36% respectivement.

D'après les résultats des teneurs en polyphénols totaux et les pourcentages d'inhibition ainsi que les valeurs des IC₅₀ obtenus pour nos extraits, il s'avère que l'extrait le plus riche en polyphénols (*SC20* avec 12,22 ± 0,04 mg équivalent d'acide galique/g d'extrait) présente le plus faible pourcentage d'inhibition du radical DPPH (32,36%) et la valeur de IC₅₀ la plus élevée (62,16 ± 0,25 mg/ml). Cependant l'extrait ayant la meilleure activité antioxydante (le pourcentage d'inhibition le plus élevé et la plus faible valeur de IC₅₀) ne renferme que 8,55 ± 0,18 mg équivalent d'acide galique/g d'extrait). Nous remarquons donc que l'activité du piégeage du DPPH n'est pas proportionnelle à la teneur en polyphénols. Cependant une corrélation entre la teneur en polyphénols totaux et l'activité antioxydante des extraits est indispensable pour pouvoir en tirer des conclusions claires.

Récemment certaines études s'intéressent à évaluer l'activité antioxydante des souches d'actinomycètes telle que les travaux de **Rao et al., (2013)** ayant rapporté une bonne

activité antioxydante d'une souche d'actinomycète marine pour le piégeage du radical libre DPPH avec un IC_{50} de 0,041 mg/ml plus faible que les valeurs obtenues pour nos souches et un pourcentage d'inhibition du radical DPPH de $68,91\% \pm 21,00$. pour la souche *Streptomyces coelicoflavus* BC01(isolée du sol) en accord avec le résultat obtenu avec l'isolat *ND101* (68,02%) .

D'après les résultats nous constatons que la concentration de l'extrait n'influence pas l'activité antioxydante . En effet, l'extrait brut *NA44* ayant la concentration la plus faible (30,5mg/ml) comparant aux extraits de la *B01* et *SC20* (31,33mg/ml et 36,9 mg /ml) présente le pourcentage d'inhibition le plus élevé.

III.4. Piégeage du radical libre ABTS

Le dosage ABTS est aussi une des méthodes utilisées pour tester l'activité radicalaire des substances bioactives (Elmastas et al., 2007). Ce radical présente une absorbance caractéristique à 430 nm et une couleur de couleur bleu nuit et qui devient incolore après sa réduction. La capacité des antioxydants présents dans le milieu est proportionnelle à l'intensité de la couleur.

Les valeurs dans la figure 22 ont obtenues en calculant la moyenne des pourcentages d'inhibition (PI%) de trois expériences et exprimées en pourcentage d'inhibition (PI%) en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide Ascorbique présentée dans l'annexe II.

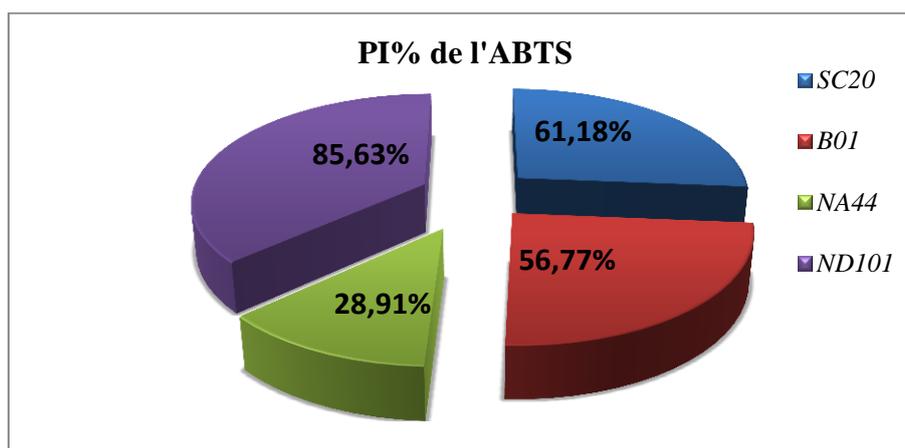


Figure 25: Présentation circulaire des pourcentages d'inhibition d'ABTS des extraits bruts de souches d'actinomycètes étudiées.

D'après ces résultats la souche *ND101* présente le pourcentage d'inhibition le plus élevé avec 85,63 % suivi des souches *SC20* et *B01* avec des pourcentages de 61,18% et

56,77% puis l'extrait de l'isolat **NA44** avec le plus faible pourcentage d'inhibition à savoir 28,91%.

De la même manière pour les pourcentages d'inhibition du radical ABTS, il est indispensable de comparer les valeurs de IC_{50} pour bien évaluer l'activité antioxydante de nos isolats et les résultats des IC_{50} sont illustrés dans la figure suivante :

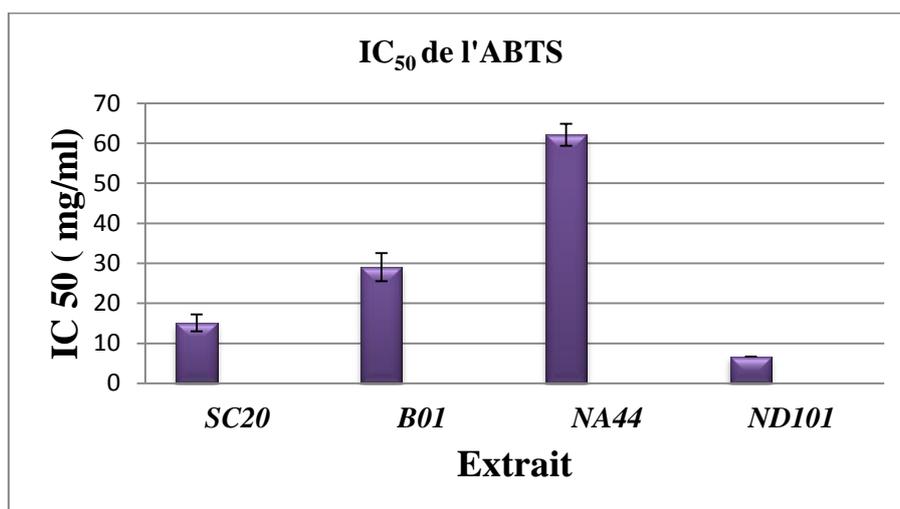


Figure 26: Histogramme présentant les IC_{50} de l'activité du piégeage du radical libre ABTS par les extraits brutes des isolats étudiés.

Ces résultats indiquent une très bonne activité contre l'ABTS des trois extraits bruts de **ND101**, **SC20** et **B01** relative à $6,68 \pm 0,007$ mg/ml, $15,09 \pm 3,58$ mg/ml et $29,035 \pm 3,48$ mg/ml respectivement contrairement à l'extrait brut de l'isolat **NA44** avec un IC_{50} de $62,1 \pm 2,78$ mg/ml.

Nous remarquons selon les résultats obtenus pour les pourcentages d'inhibition pour l'ABTS que de même pour le radical DPPH la meilleure activité antioxydante obtenue (avec l'extrait **ND101** avec un pourcentage d'inhibition de l'ABTS de 85,63 % et une IC_{50} de $6,68 \pm 0,007$ mg/ml) ne correspond pas à l'extrait le plus riche en Polyphénols totaux (**SC20** avec $12,22 \pm 0,04$ mg équivalent d'acide gallique/g d'extrait) mais ceci peut être dû à la concentration de l'extrait où l'extrait **ND101** est plus concentré avec 38 mg/ml suivis par **NA44** et **B01** avec des concentrations de 36,9 mg/ml et 31,5 mg/ml respectivement face à des concentrations d' IC_{50} de $6,68 \pm 0,007$ mg/ml, $15,09 \pm 2,12$ mg/ml et $29,035 \pm 3,48$ mg/ml respectivement et enfin l'extrait brut de la souche **NA44** avec la concentration la plus basse à raison de 30,5 mg/ml face à la valeur la plus élevée d' IC_{50} qui est de $62,1 \pm 2,78$ mg/ml.

Plusieurs études ont été effectuées sur ce thème sur la recherche d'antioxydant chez les actinomycètes par le piégeage de l'ABTS on trouve **Lee et al., (2014)**, pour l'espèce *Streptomyces Sp. MJM 10778*, où il a constaté que les pourcentages d'inhibition augmentent en fonction de la concentration de l'extrait ou ils ont eu un pourcentage d'inhibition qui est de $82,6 \pm 0,3$ pour une concentration de 1g/ml d'extrait. Et le IC_{50} était de 0,134 g/ml ce qui signifie que l'espèce *Streptomyces Sp. MJM 10778* a une très bonne activité antioxydante vis-à-vis le radical libre ABTS.

III.5. Evaluation du pouvoir réducteur

Cette méthode est basée sur l'aptitude des extraits à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}). Le mécanisme est connu comme étant un indicateur de l'activité donatrice d'électrons, caractéristique de l'action des antioxydants.

Les résultats du pouvoir réducteurs sont illustrés dans la figure suivante et qui sont présentés par des absorbances en fonction des concentrations pour chaque extrait :

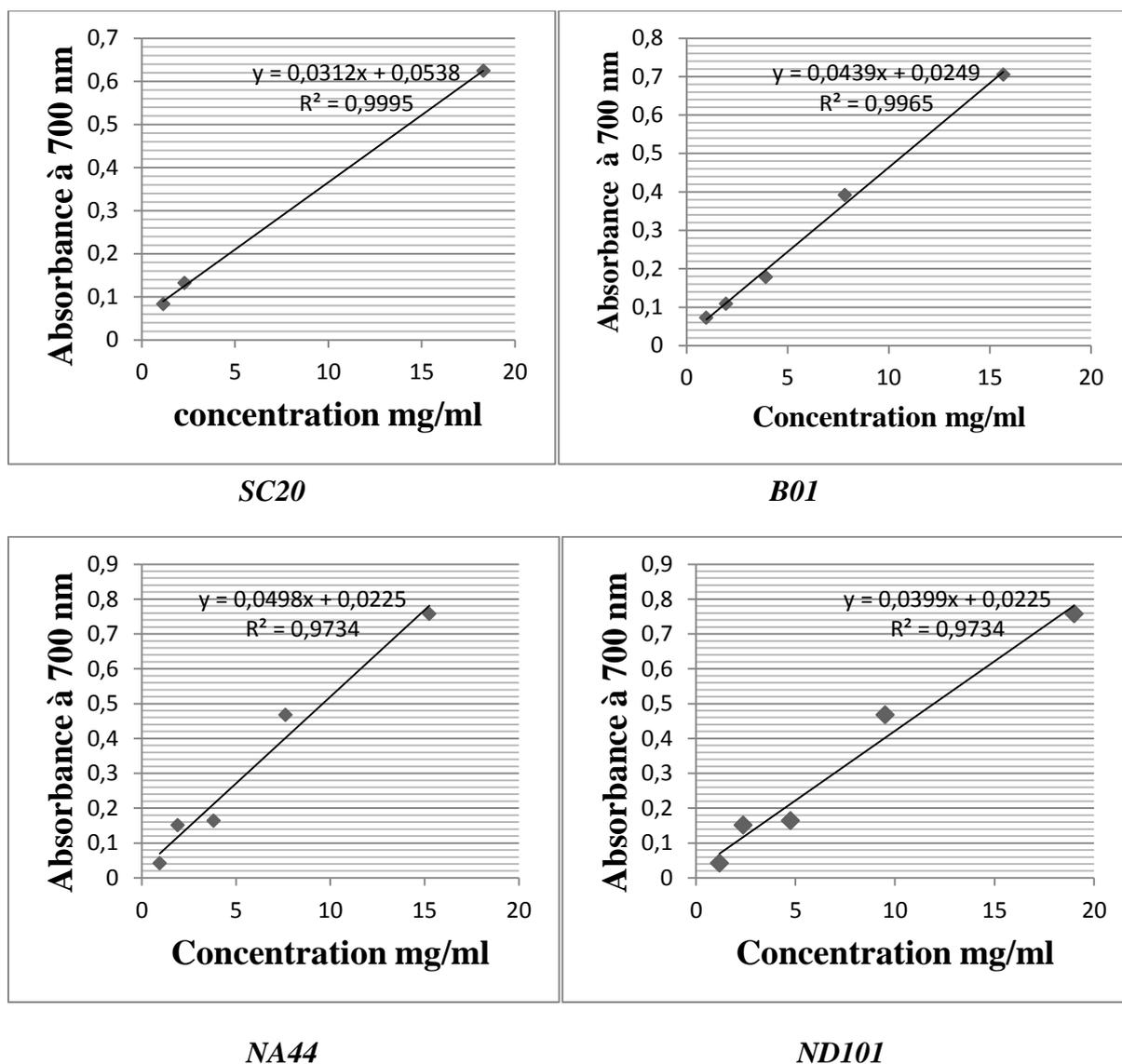


Figure 27: Activité réductrice des extraits bruts des isolats d'actinomycètes étudiés.

La figure 24 illustre les résultats du pouvoir réducteur obtenus des quatre extraits bruts (*SC44*, *B01*, *NA44* et *ND102*) possédant des densités optiques maximales de 0,624 nm, 0,7 nm et 0,76 nm respectivement à des concentrations différentes qui varient de 36,9 mg/ml, 31,33 mg/ml, 30,5 mg/ml et 38 mg/ml respectivement.

Pour une comparaison crédible et comme pour les pourcentages d'inhibition des radicaux DPPH et ABTS, le calcul des IC₅₀ (étant la concentration nécessaire pour réduire 50% du ferricyanure de potassium) des extraits est primordial. Les IC₅₀ sont déterminés à une densité optique égale à 0,5 nm et les résultats sont présentés dans la figure 25 suivante :

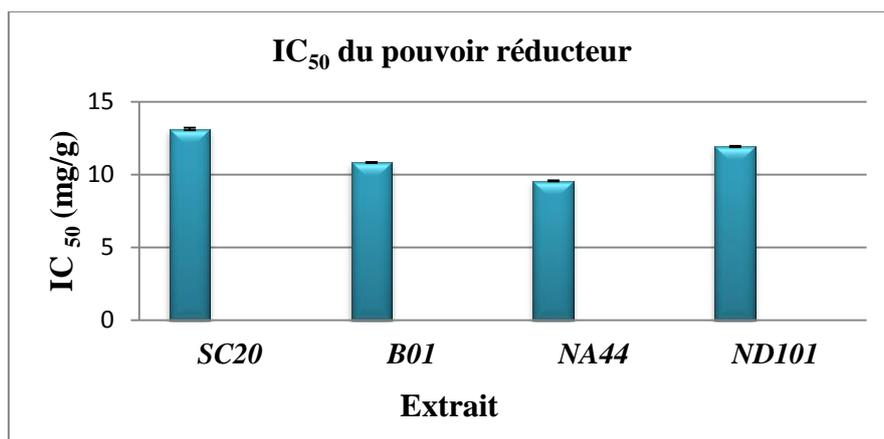


Figure 27: Histogramme IC₅₀ du pouvoir réducteur des ions ferriques des extraits bruts étudiés.

Les résultats obtenus indiquent un pouvoir réducteur des ions ferriques par les quatre extraits bruts des isolats *NA44*, *B01*, *ND101* et *SC20* avec des IC₅₀ de $9,56 \pm 0,028$ mg/ml, $10,82 \pm 0,02$ mg/ml, $11,92 \pm 0,049$ mg/ml et $13,12 \pm 0,09$ mg/ml respectivement.

Le pouvoir réducteur de Fe³⁺ en Fe²⁺ noté pour l'extrait de la souche *NA44* (étant le pouvoir réducteur le plus élevé parmi les quatre extraits) avec une absorbance de 0,74 à 700 nm et un IC₅₀ de $9,56 \pm 0,028$ mg/ml concorde avec celui obtenu par **Avilala et al., (2014)** ayant rapporté des absorbances allant de 0,68 à 1,56 pour le même test sur des extraits d'une souche actinomycétale et dont l'activité antioxydante était due à la teneur en polyphénols dans les extraits.

Pour lier l'activité antimicrobienne et celle antioxydante de nos isolats une corrélation entre ces dernières est indisponible. Néanmoins, certains constats peuvent être soulevés. Les extraits des deux isolats *SC20* et *B01* sont dotés d'une meilleure activité antimicrobienne vis-à-vis des cinq germes cibles utilisés comparant à ceux des souches *NA44* et *ND101*. Cependant, ce dernier présente la meilleure activité antioxydante avec des pourcentages d'inhibition des radicaux DPPH et ABTS de 68,02%, 85,63 % respectivement avec des valeurs de IC₅₀ relatives à $25,16 \pm 0,21$ mg/ml, $6,68 \pm 0,007$ mg/ml et un pouvoir réducteur des ions Fe³⁺ en Fe²⁺ correspondant à une absorbance de 0,74 à 700 nm et une valeur de IC₅₀ de $11,92 \pm 0,049$ mg/ml, contrairement aux extraits bruts des deux isolats *SC20* et *B01* (montrant la meilleure activité antimicrobienne) une activité vis-à-vis l'ABTS avec des pourcentages d'inhibition de : 61,18% et 56,77 % et des IC₅₀ de : $15,09 \pm 2,12$ mg/ml et $29,035 \pm 3,48$ mg/ml respectivement est notées et un pouvoir réducteur de Fe³⁺ avec des

absorbances de 0,624 et 0,695 ainsi que des IC₅₀ de : $13,12 \pm 0,09$ mg/ml et $10,82 \pm 0,02$ mg/ml respectivement.

Dans le cadre de recherche de métabolites secondaires bioactifs des actinomycètes, le présent travail vise la production et l'extraction des molécules bioactives synthétisé par quatre souches d'actinomycètes ainsi que la mise en évidence de leurs activités antibactériennes et antioxydante.

Les biomolécules produites sur milieu Mincer Eau de Mer (MEM) par les quatre isolats d'actinomycètes sont extrait par l'acétate d'éthyle (extraction solide-liquide) et après évaporation totale du solvant et reprise des extraits secs dans du méthanol, une étude de l'activité antimicrobienne de ces extraits bruts (des souches : **SC20**, **B01**, **NA44** et **NDI01**) par la méthode des puits a révélé une bonne activité antibactérienne vis-à-vis de 2 bactéries à Gram positif (**SARM ATCC 43300** et **L. innocua CLIP 774915**) et 2 bactéries à Gram négatif (**E. coli ATCC 25922** et **V. cholerae ATCC 14035**) ainsi qu'une activité antifongique à l'égard d'une levure (**C. albicans ATCC 10231**) avec des valeurs plus élevés du diamètre des zones d'inhibitions notées pour les extraits de **SC20** et **B01**.

L'étude de l'activité antioxydante des quatre extraits bruts par la méthode du piégeage des radicaux libres DPPH et ABTS et celle de la réduction du fer, après le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes ; a révélé une meilleurs activité antioxydante de l'extrait **NDI01** évaluée avec les trois paramètres étudiée, alors qu'une activité contre l'ABTS et la réduction du fer est obtenue avec les extraits des isolats **SC20** et **B01** alors que pour l'extrait de l'isolat **NA44** seule une activité de réduction du fer est enregistrée .

D'après les résultats notre activité antioxydante ne dépend pas de la teneur en polyphénols et l'activité antimicrobienne enregistrée avec les extraits ayant une faible activité antioxydante peut être expliquée par la présence d'antibiotiques autres que les antioxydants.

L'ensemble des résultats obtenus méritent d'être complétés par :

- des corrélations entre cette dernière et les IC₅₀ des tests du piégeage du DPPH et de l'ABTS et entre l'activité antimicrobienne et celle antioxydante sont indispensables afin de pouvoir tirer des conclusions précises ;
- l'utilisation d'autres germes cibles ;
- une purification et la caractérisation des molécules considérée actives par des techniques performante (HPLC, LC-MS,...etc).

- Une identification des antioxydants présents dans les extraits et des souches d'actinomycètes étudiées.

A

- ❖ **Acar, N. et Lecerf, J.M.** Peroxydation *in vivo* et *in vitro* des acides gras polyinsaturés. Médecine et nutrition. (2007) ; 42 (5): 260-265.
- ❖ **Anibou, M., Chait, A., Zyad, A., Taourirt, M., Ouhdouch, Y., et Benherref, A.** Actinomycetes from Moroccan habitats: isolation and screening for cytotoxic activities. World. J. Microbiol. Biotechnol. (2008); 24, 2019-2025.
- ❖ **Atawodi, S. E.** Antioxidant potential of African plants. African journal of Biotechnology. (2005); 2, 128-133.
- ❖ **Athamena, S., Chalghem, I., Kassah-Laour, A., Laroui S., Khebri, S.** Activite anti-oxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum L.* Lebanese Science Journal. (2010); Vol 11 (1):72p.
- ❖ **Atkin, M.A., Gasper, A., Ullegaddi, R.** Oxidative susceptibility of unfractioned serum or plasma : res-ponse to antioxidants in vitro and to antioxidants sup-plementation. Clin Chem. (2005); 51: 2138-2144.
- ❖ **Avilala, J., Arthala, P.K., Buddolla, V.** Production of Bioactive Copounds by Actinomycetes and Their Antioxydant Properties. (2014).
- ❖ **Awika, J.M., Rooney, L.W.** Sorghum phytochemicals and their potential impact on human health. Photochemistry. (2004); 65:1199-1221.

B

- ❖ **Badji, B. (2006).** Etude de la taxonomie et des antibiotiques antifongiques de trois souches d'actinomycètes d'origine saharienne appartenant aux genres *actinomadura* et *Nonomurea*. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.226p.
- ❖ **Barlow, S.M.** Toxicological aspects of antioxydants used as food addives. *In: Food antioxydants.* Hudson B.J.F. (ed), Elseveir, Amsterdam. (1990); 253-307.
- ❖ **Becker, B., Lechevalier, M.P., Gordon, R.E., et Lechevalier, H.A.** Chemical composition of cell-wall preparations from strain of various from genera of aerobic actinomycetes. *Appl.Micobiol*, (1965); 13, 236-242.
- ❖ **Berdy, J.** Bioactrive microbiol metabolites. Journal of antibiotics. (2005), 58: 1-26.

- ❖ **Baudin, B.** Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. maladie cardiovascular. (2006) ; 2 (1) : 43-52.
- ❖ **Bougandoura, N., Bendimerad, N.** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp. Nepeta (L.)* Briq. Nature & Technologie. (2013) ; 9: 15p.
- ❖ **Boughachiche, F., Reghioua, S., Seizer, H., Boulahrouf, A.** Activité antibactérienne d'espèces rares de *Streptomyces* contre des isolats cliniques multirésistants. Ann Biol Clin. (2012) ; 70 (2) : 169-74.
- ❖ **Bousseboua.** Element de microbiologie générale. Edition de l'Université Mentouri de Constantine. (2002), 17p.
- ❖ **Boyd, B., Ford, C., Koepke, M.C., Gary, K., Horn, E., McAnalley, S., et McAnalley, B.** Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose sur des personnes en bonne santé. Glycoscience et Nutrition. (2003), 4-7.
- ❖ **Breuilland, J., Lemoine, A., Michel, G., et Olle, J.** Etude des actinomycetes aérobies. Rencontres dans l'air de Toulouse. Rev. Inst. Pasteur, Lyon, Fr., (1974), 7: pp269-278.
- ❖ **Bruneton, J.** (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Lavoisier. EC & DOC. Paris. 1269p.
- ❖ **Bu'lock, J. D.** The biosynthesis of natural products. An introduction to secondary metabolism. Mc Graw-Hill, New-York. (1965).

C

- ❖ **Challis, G.L., and Hoopwood, D.A.** Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* epeices. The National Academy of Science of the USA, PNAS. (2003); 100 (2), 14555-14561.
- ❖ **Chung, Y.C., Chang, C.T., Chao, W.W., Lin, C.F. et Chou, S.T.** Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis IMR-NK1*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. (2002); 50, 2454-2458.
- ❖ **Coates, A. et Hu, Y.** Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections. British journal of pharmacology. (2007); 152, 1147-1154.

- ❖ **Congo, M. (2012).** Etude des propriétés antiradicalaire et antiproliferative d'extraits de feuilles et de rameaux de *Salvadora Persica L.* (Salvadoraceae).Thèse de pharmacie. Université d'Ouagadougou Burkina Faso : 42p.
- ❖ **Conn, V.M. (2005).** - Molecular Interactions of Endophytic Actinobacteria in Wheat and Arabidopsis. Thèse de Doctorat. Flinders University. pp 29.
- ❖ **Couch, J.N. and Bland C.E.** Family IV. *Actinoplanaceae*. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8 th Ed., Buchanan R.E. and Gibbon N.E. (Eds). Williams and Wilkins C. O. Baltimore. (1974); 706-723.
- ❖ **Cross, T.** Aquatic actinomycetes: a critical survey of the occurrence, growth and role of actinomycetes in aquatic habitats. J. Appl. Bacteriol. (1981) ; 50: pp397-423.

D

- ❖ **Dacosta, Y.** Les phytonutriments bioactifs: 669 références bibliographiques. Ed. Yves Dacosta, Paris, (2003) ; p. 317.
- ❖ **de Oliveira , S., de Souza, G. A., Eckert, C .R.** Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. Quimica Nova, (2014); Vol: 37, n° 3.
- ❖ **Demain, A. L.** Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. Appl Microbiol Biotechnol. (2000); Vol 52: 455-63.
- ❖ **Demain, A.L. and Arora. Lancini. G.** Bacterial Pharmaceutical Products in Prokaryotes. (2006); 1,812-833.
- ❖ **Devereux, R., He, S.H., Doyle, C.L., Orkland, S., Stahl, D.A., Le Gall, J., and Whitman, W.B.** Diversity and origin of *Desulfosphaerium* species: phylogenetic definition of a family. J. Bacteriol. (1990); 3609-3619.
- ❖ **Dommergues, Y., et Mangenot, F.** Ecologie microbienne du sol. Masson et Cie, Ed., Paris. (1970) ; 10.

E

- ❖ **Embley, T.M., Stackebrandt, E.** The molecular phylogenetics and systematics of the Actinomycetes. Annu Rev Microbiol. (1994); 48:257-89.

- ❖ **Ensing, J. C., Normand, P., Burden, J. P., et Yallop, C. A.** Physiology of some actinomycetes genera. Review microbiology. (1993); 144, 657-660.

F

- ❖ **Favier, A.** Stress oxydant et pathologies humaines. Ann. Pharm. Fr. (2006); 64: 390-396.
- ❖ **Felsenstein, J.** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution. (198); 39:783–791.
- ❖ **Frankel, E. N.** In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in foods lipids. Trends in Foods Sci. technol. (1993); 4, 220-225.

G

- ❖ **Ginolhac, A. (2006).** Metagenomique et bioinformatique : Etude des polyktides synthases bacteriennes. Thèse de doctorat. Université Claude Bernard-Lyon I. pp146.
- ❖ **Genné, D., Siegrist, H.H.** De l'antibiogramme à la prescription d'un antibiotique. Forum Med Suisse. (2003) ; 20 ; 464-468.
- ❖ **Goodfellow, M., et Williams, S.T.** Ecology of actinomycetes. Ann Rev Microbial. (1983); 37: 139-216.
- ❖ **Guéraud, F., Atalay, M., Bresgen, N., Cipak, A., Eckl, P. M., Huc, L., Jouanin, I., Siems, W. et Uchida, K.** Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. Free Radical Research. (2010) ; 44 (10): 1098–1124.
- ❖ **Guinebert, E., Durand, P., Prost, M., Grinand, R. et Bernigault, R.** Mesure de la résistance aux radicaux libres. Sixièmes Journées de la Recherche Avicole. (2005) ; 554-558.

H

- ❖ **Harvey, I. (1999).** sélection de tests discriminants pour l'identification rapide des actinomycètes thermophiles impliqués dans l'alvéolite allergique extrinsèque. These de Doctorat. Université Laval (Canada). pp127.

- ❖ **Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Harlier, HaPelle, J.P.** Le stress oxydant. *Med Liege.* (2007); 62 (10) : 628-638.
- ❖ **Hennebelle, T., Sahpaz, S., Bailleul, F.** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothér.* (2004); 1 : 3-6.
- ❖ **Horinouchi, S.** Antimicrobial hormone, A-factor, as a master switch for morphological differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Frontiers in Biosciences.* (2002); 7: 2045-2057.

J

- ❖ **Junaid, S., Rakesh, K.N., Dileep, N., Poornima, G., Kekuda, T.R.P., Mukunda, S.** Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Seed Extract of *Lagerstroemia speciosa* L. *Chemical Science Transactions.* (2013); 2(1), 75-80.

K

- ❖ **Kalakoutski, L.V. et Agree, N.S.** Comparative aspects of development and differentiation in Actinomycetes. *Bacterial. Rew.* (1976); 40: 469-525.
- ❖ **Khachaturians. G.G.** Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. *Candidan Madical Association.* (1998); 159, 1129-1136.
- ❖ **Khamna S., Yokota A., Peberdy J.F., Lumyong S.** Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces sp* isolated from some Thai medicinal plant rhizospheres soil. *Eur Asian Journal of BioSciences.* (2010); 4: 23-32.
- ❖ **Kohen, R. et Nyska, A.** Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicol. Path.* (2002); 30: 620-650.

L

- ❖ **Lacey, J.** Actinomycetes in soils, composts and fodders. *Soc. App Bacteriol., Symp. Ser.* (1973).

- ❖ **Lamari, L. (2006).** Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de doctorat. Université de Tizi Ouzou (Algérie).
- ❖ **Larpent, J.P. et Larpent- Gourgaud, M., (1985).** Manuel pratique de microbiologie. Herman. Paris.
- ❖ **Larpent, J.P. et Sanglier, J.J.** Biotechnologie des antibiotiques. Ed. Masson. Paris. (1989) ; 481.
- ❖ **Lechevalier, M-P. et Lechevalier. H-A. (1970).** Composition of wal-cell hydrolysates as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. The actinomycetales H.Prause, (Ed) G Fisher Verlage, Jana. (1970); 331-316.
- ❖ **Lechevalier, M.P., De bievre, C. et Lechevalier, H.A.** Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes : phospholipid composition. Biochem. Syst. Ecol. (1977); 5, 249-260.
- ❖ **Lechevalier, A.H. (1981).** Introduction to the order Actinomycetales, (volume 2). Springer-Verlag Edition Berlin : 1915-1922.
- ❖ **Lectersch, H., Izard, D., et Wattre, P., (1983).** Microbiologie générale. Paris : 39p.
- ❖ **Lee, D.R., Lee, S.K., Choi, B.K., Cheng, J., Lee, Y.S.** Antioxidant activity and free radical scavenging activities of *Streptomyces sp.* Strain MJM 10778. (2014); 962-967.

M

- ❖ **Maataoui, B.S., Hmyene, A., Hilali, S.** Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). Lebanese Science Journal. (2006); (1):3-8.
- ❖ **Madigan, M.T. et Martinko, J.M. (2007).** Biologie des microorganismes. Pearson Education France, 11e édition : 331-423, 686-718.
- ❖ **Mariat, F. et Sebald, M. (1990).** Actinomycètes In : Bactériologie Médicale. Le Minor L. et Véron M. (Eds), 2^{ème} édition, Flammarion. Paris. 935-949.
- ❖ **Milbury, P., Richer, A. (2008).** Understanding the Antioxidant Controversy. Ed. Praeger: 81p.
- ❖ **Mohankumar, Th., Krishnan, K.** Antimicrobial and antioxidant properties of marine actinomycetes *Streptomyces Sp* VITSTK7. (2012).

- ❖ **Molyneux, P., Songklanakarin, J.** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *SciencesTechnology*. (2004); Vol 26 (2) : 211-219.
- ❖ **Monthon, L., Kittisak, C., Kanchanat, P., Jutaporn, K.** Quantitation of Total Phenolic Contents of Bioactive Compounds Fractions *Streptomyces* species. (2015); Vol.7, No.2, pp 320-324.
- ❖ **Moulaoui, K., Caddeo, C., Manca, M.L., Castangia, I., Valenti, D., Escribano, E., Atmani, D., Fadda, A.M., Manconi, M.n.** Identification and nanoentrapment of polyphenolic phytocomplex from *Fraxinus angustifolia*: In vitro and in vivo wound healing potential. *European Journal of Medicinal Chemistry*. (2015); 89:179-188
- ❖ **Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Manuel Dominguez, J., Sineiro, J., dominguez, H., Nunez, M.J. et Carlos Parajo, J.** Natural antioxydants from residual sources. *Food Chemistry*. (2001); 72, 145-171.

N

- ❖ **Nakajima, K., Nakano, T., Tanaka, A.** The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis : The comparison of atherogenic effects on oxidized LDL and remnant lipoproteins in plasma. *Clin Chim Acta*. (2006); 367: 36-47.
- ❖ **Newman, D.J., Cragg, G.M. and Snader, K.M.** Natural Products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod*. (2003); Vol 66(7): 1022-1037.

O

- ❖ **Ottow, J.C.G. et Math, H.** Rose Bengal-malt extrait-agar, a simple medium for the simultaneous isolation and enumeration of fungi and actinomycetes from soil. *Appl Microbiol*. (1968); 16: 170-171.
- ❖ **Oyaizu, M.** Studies on products of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*. (1986); 44, 307-315.

P

- ❖ **Perry, J.J., Staley, J.T. et Lory, S. (2004).** Microbiologie. Edition Dunod
- ❖ **Pelli, K., Lyly, M. (2003).** Les antioxydants dans l'alimentation. VTT Biotechnology Finlande.
- ❖ **Phani Bhushan, G.V., Girija Sankar, G., Prabhakar, T., Kamala Kumari, P.V.** Antioxydant activity of actinomycetes isolates from marines samples. World Journal of pharmacy and Pharmaceutical Sciences. Research Article. (2016); Volume 5, Issue 6, 1037-1044.
- ❖ **Pincemail, J., Meurisse M., Limet, R., Defraigne, J.O.** L'évaluation du stress oxydatif d'un individu: une réalité pour le médecin. Vaisseaux, Coeur, Poumons. (1999) ; Vol 4(5) : 133- 8.
- ❖ **Pizzul. L. (2006).** Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Actinomycetes. Thèse de doctorat. Universités d'Uppsala (Suède).pp 39.
- ❖ **Prashith, K.T.R., Rakesh, K.N. Junaid, S., Dileep, N.** Antibacterial and antioxydant activities of *Streptomyces* species SRDP-H03 isolated from HOSUDI, KARNATAKA, INDIA. (2013); 3(4), 47-53.
- ❖ **Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K.** Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements . Agric. Food Chem. (2005); (53) : 4290-4302.

R

- ❖ **Raghava Rao, K.V., Ravaga Rao, T.** Molecular characterization and its antioxidant activity of a newly isolated *Streptomyces coelicoflavus* BC01 from mangrove soil. (2013). 121-126.
- ❖ **Rao, K.V.B., Loganathan K, Gaurav K.** Antioxidant activity of newly discovered lineage of marine actinobacteria. (2013); 325-332.
- ❖ **Rao, K. V, Rao T. R.** Molecular characterization and its antioxidant activity of newly isolated *Streptomyces coelicoflavus BC 01* from mangrove soil. Journal of Young Pharmacists. (2013); 121-126.

- ❖ **Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, M., Ribéreau-Gayon, P. et Sudraud, P.** (1972). Sciences et techniques du vin. Tome 1, analyse et contrôle des vins. Ed. Dunod, Paris, p. 671.

S

- ❖ **Sanglier, J.J., et Trujillo, M.** Substances bioactives produites par les actinomycètes et stratégie de sélection de souches. Bull Soc Fr Microbiol. (1997) ; 12: 13.
- ❖ **Sarma, A.D., Mallick, A.R., et Ghosh, A.K.** Free Radicals and Their Role in Different Clinical Conditions: An Overview. International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR). (2010); 1, 185-192.
- ❖ **Singleton, P.** (1994). Bactériologie. Masson. France : 480p
- ❖ **Sohal, R.,S., Mockett, R.J. et Orr, W.C.** Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. Free Radical Biol. Med.(2002); 33: 575-586.
- ❖ **Solanki, R., Khanna, M., et Lal, R.** Bioactive compounds from marine actinomycètes. Ind. J. Microbiol. (2008); 48, 410-431.
- ❖ **Subathra Devi, C., Kumari, A., Jain, N.** Novel bioactive compounds from mangrove derived Actinomycètes. Asian journal of Pharmaceutical and Clinical Research. (2012); Vol 5, Suppl 4.

T

- ❖ **Takahashi, Y. et Omura, S.** Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds. J. Gen. Appl. Microbiol. (2003) ; Vol :49, 141-154.
- ❖ **Theilleux, J.** les actinomycètes in Microbiologie industrielle : Les microorganismes d'intérêt industriel, Leveau. J.Y et Mouix. M. Lavoisier Tech et Doc, Apria. (1993) ; V 612p, pp 425.

V

- ❖ **Von Dohren, H., et Grafe, U.** General aspect of secondary metabolism. In: Rehm H.J., Reed G (Eds) *Biotechnology: products of secondary metabolism*. (1997); Vol.7, 2nd Eds. VCH/Wiley, Weinheim, pp. 2-55.

W

- ❖ **Walsh, C.** Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*. (2000); Vol: 406: 775-81.
- ❖ **Williams. S.T., Goodfellow. M; and Alderson. G.** Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams S.T., Sharpe M.E. and Holt J.G. (Eds.), Volume 4. Williams and Wilkins Co., Baltimore. (1989); pp. 2452-2492.
- ❖ **Williams, S.T., Locci, R., Beswick, A., Kurtboke, D.I., Kuznetsov, V.D., Le Monnier, F.J., Long, P.F., Maycroft, K.A., Palma, R.A., Quaroni, S., Todd, J.I. et West, M.** Detection and identification of novel actinomycetes. *Microbiology*. (1993); Vol:144, 653-656.

X

- ❖ **Xu, L.H., Li, Q.R. et Jiang, C.L.** Diversity of soil actinomycetes in Yunnan, China. *Appl Environ Microbiol*. (1996); 62: 244-248.

Y

- ❖ **Yamagushi, T.** Comparison of the cell-wall composition of morphologically distinct actinomycetes. *J. Bacteriol*. (1965); Vol: 38, 444-453.
- ❖ **Yilma S., Cannon-Sykora J., Samoylov A., Loe T., Liu N., Brinker C. J., Neely W. C. et Vodyanoy V.** Large-conductance cholesterol-amphotericinB channels in reconstituted lipid bilayers. *Biosensors Bioelectron*. (2008); Vol: 22, 1359-1367.

Z

- ❖ **Zaitlin, B., and Watson, S-B.** Actinomycetes in relation to taste and odor in drinking water: Myths tenets and truths. *Water Research.* (2006); Vol:40, 1741-1753.
- ❖ **Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W.** The determination of flavonoids contents on mulberry and their scavenging effects of superoxide radical. *Food Chem.* (1999) ; Vol :64, 555-559.
- ❖ **Zitouni. (2005).** Taxonomie et antibiotiques de *Saccharothrix* et des *Nocardiopsis* des sols sahariens et nouvelles molécules bioactives sécrétés par *Saccharothrix sp.* SA 103. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri (Tizi ouazou).

Annexes

Annexe I : Les différents milieux de culture utilisés.

➤ Milieu pour le repiquage :

***SCA (Starch Caséine Agar)** : Amidon 10g/l, Caséine 0.3g/l, KNO₃ 2g/l, K₂HPO₄ 2g/l, NaCl 2g/l, MgSO₄ 0.05 g/l, CaCO₃ 0.02 g/l, FeSO₄·7H₂O 0.01g/l, Agar 18g/l, eau distillée 1000 ml ; **pH : 7,2.**

➤ Milieu de production pour les actinomycètes :

***Mincer modifié (Williams et Kuster, 1964)**. Amidon 10g/l, Peptone 2g/l, extrait de levure 4g/l, eau de mer, eau distillée 1000 ml ; **pH : 7,2.**

➤ Milieu utilisé pour les germes cibles :

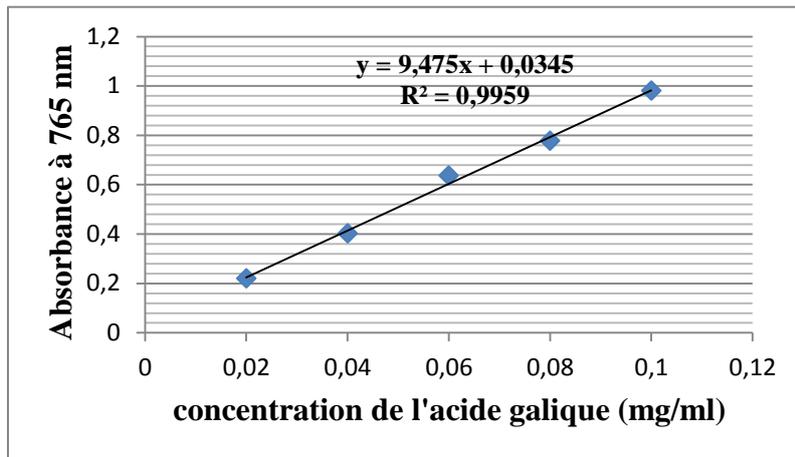
***Chapman** : Peptone 11 g/l, Extrait de viande 1 g/l, Chlorure de sodium 75 g/l, Mannitol 10 g/l, Rouge de phénol 0.025 g/l, Agar 15 g/l, eau distillé 1000 ml ; **pH : 7.4.**

***Gélose Nutritif (GN)** : Extrait de viande 1 g/l, Extrait de levure 2.5 g/l, Peptone 5 g/l, Chlorure de sodium 5 g/l, Agar 15 g/l, eau distillé 1000 ml ; **pH : 6,8.**

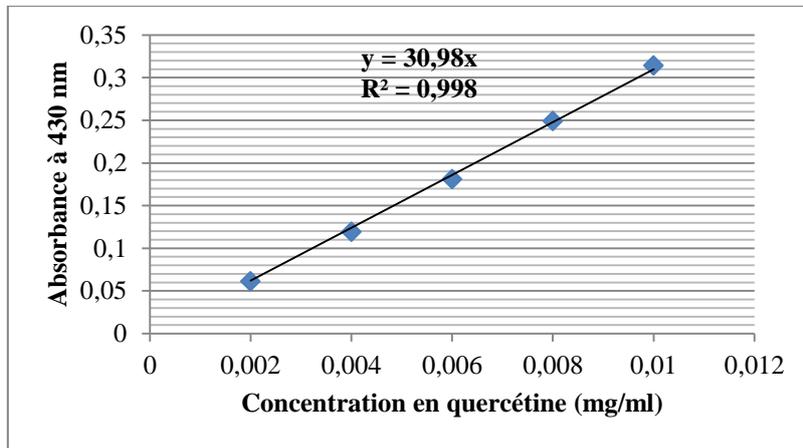
***Muller Hinton (MH)** : Infusion de viande de bœuf 300 ml, Peptone de caséine 17.5 g/l, Amidon de maïs 1.5 g/l, Agar 17g/l, Eau distillé 1000 ml ; **pH : 7,2.**

***Sabouraud (Sb)** : Peptone 10 g/l, Glucose massé 20 g/l, Agar 15 g/l, Vitamine et facteur de croissance 10 g/l, Eau distillé 1000 ml ; **pH : 5,6.**

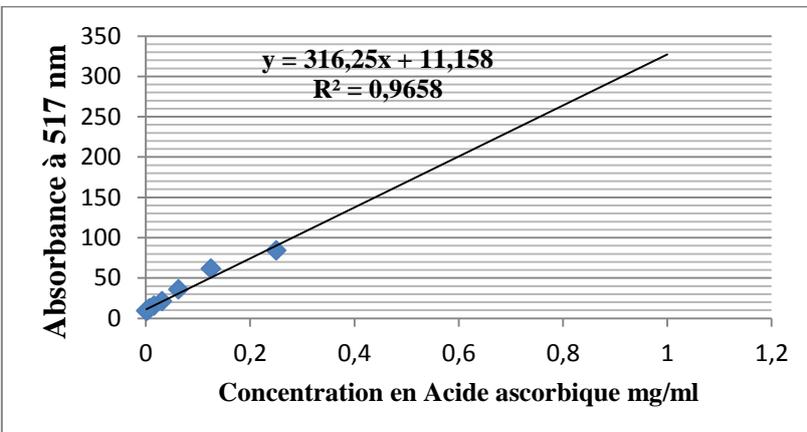
Annexe II : Courbes d'étalonnages :



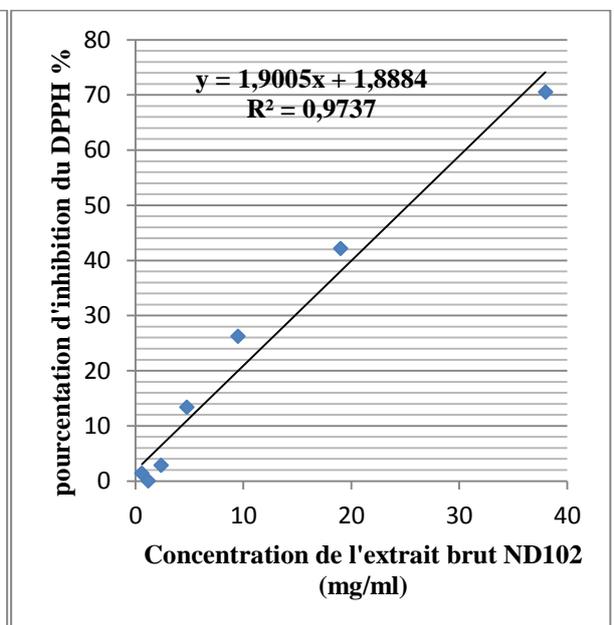
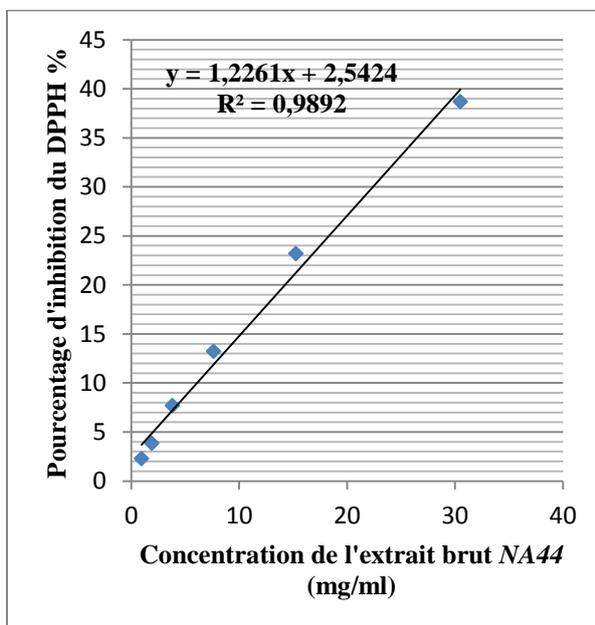
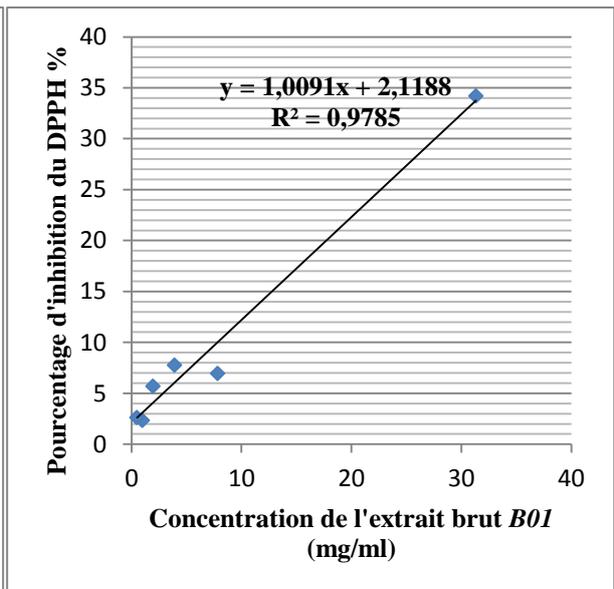
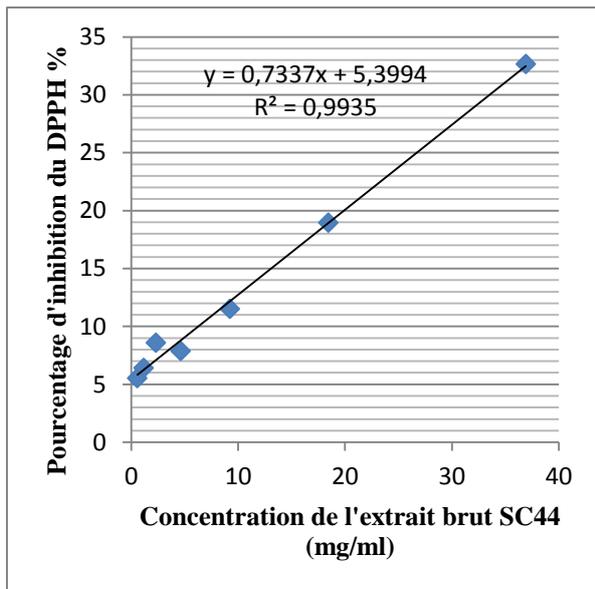
Courbe d'étalonnage des polyphénols.



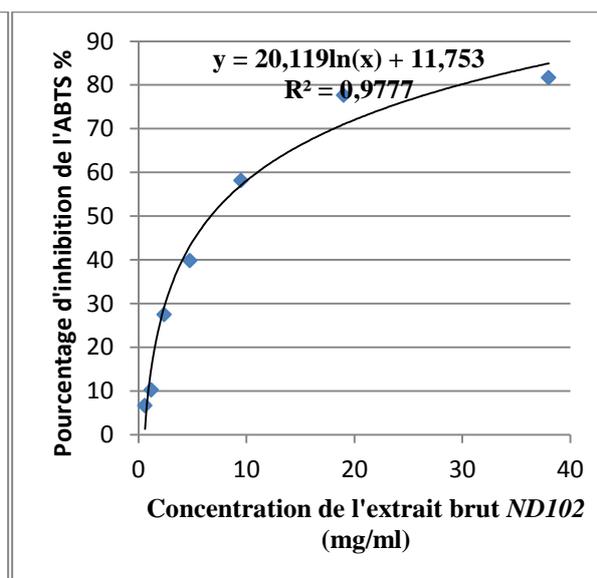
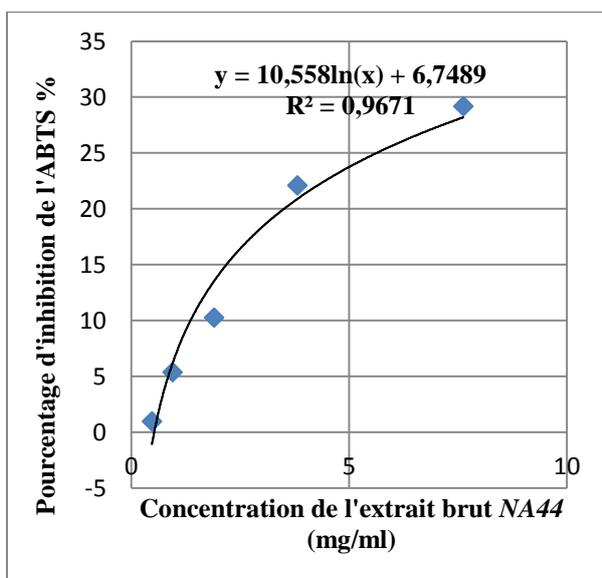
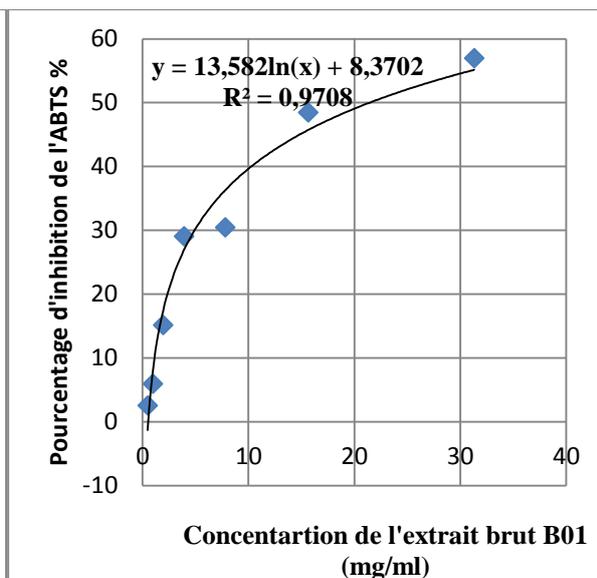
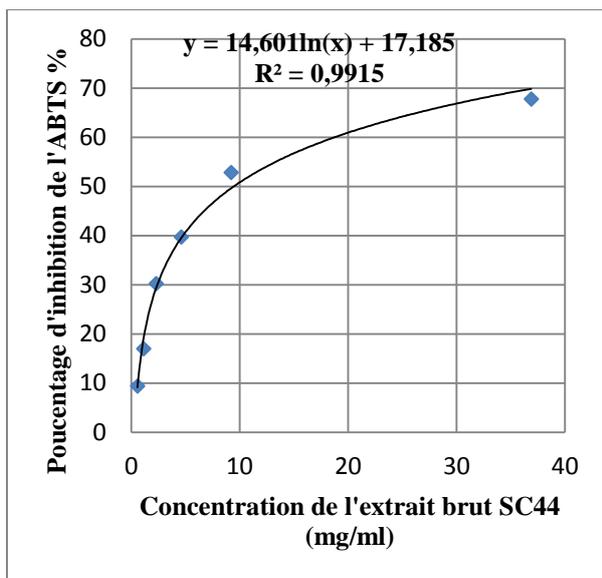
Courbe d'étalonnage des Flavonoïdes.



Courbe d'étalonnage de l'Acide Ascorbique.



Annexe III : courbes présentent les pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations des extraits bruts des souches *SC20*, *B01*, *NA44* et *ND101*.



Annexe IV : courbes présentent les pourcentages d'inhibition du radical libre ABTS en fonction des concentrations des extraits bruts des souches SC20, B01, NA44 et ND101.

Annexe V : Préparation des différentes solutions utilités.

- Préparation de l'eau physiologique
Afin de préparer de l'eau physiologique en mélange 4.5 mg de NaCl dans 500 ml d'eau distillé, en agite bien à l'aide d'une plaque agitatrice. Puis la solution sera autoclave pour qu'elle soit stérile.
- Préparation des dilutions des extraits
On a préparé les dilutions dans du méthanol, car les extraits sont récupérer avec du méthanol. Les dilutions préparer pour les extraits varies de $\frac{1}{2}$ jusqu'à $\frac{1}{64}$.
Et des fois on prépare $1/10^{\text{ème}}$ par l'ajout de 1 ml d'extrait à 9 ml de méthanol.
- Préparation de la solution de l'Acide gallique
1 mg d'acide gallique sont mis dans 1 ml d'eau distillée. Une dilution $1/10^{\text{ème}}$ de la solution d'acide gallique est préparé par l'ajout de 9 ml d'eau distillé a 1 ml d'acide gallique.
- Préparation de chlorure d'Aluminium (AlCl_3)
On prépare la solution de chlorure d'aluminium dans du méthanol, 2 g de chlorure d'aluminium seront mis dans 100 ml de méthanol.
- Préparation de la quercétine
La préparation de la solution de la quercétine est réalisée par mélanger 1 mg de quercétine avec 1 ml de méthanol.
- Préparation de carbonate de sodium (Na_2CO_3)
La solution de carbonate de sodium est préparée en mélangeant 75g avec 1 litre d'eau distillée.
- Préparation de la solution de l'Acide ascorbique
Afin de préparer la solution d'Acide ascorbique, 2 mg d'acide ascorbique seront mis dans 10 ml d'eau distillée, suivi d'une agitation.
- Préparation de la solution DPPH
Le DPPH se trouve sous forme de poudre, on le prépare on ajoutant du méthanol.
Une petite quantité de la poudre de DPPH sera suffisante. Après l'ajout du méthanol, on agite bien puis on mesure sans absorbance à la longueur d'onde 517 nm.
L'absorbance de la solution doit être 0.7 donc si on la trouve supérieur on continue à ajouter le méthanol et si on la trouve moins on ajoute de la poudre à fin d'obtenir une absorbance de 0,7.

- Préparation de la solution d'ABTS
L'ABTS se trouve sous forme liquide très concentré de couleur blanc, on lui ajoute de $K_2S_2O_4$ ou la couleur sera changer vers le bleu. Après l'ajout du $K_2S_2O_4$, on agite bien puis on mesure sans absorbance à la longueur d'onde 734 nm. L'absorbance de la solution doit être 0.7 donc si on la trouve supérieur on continue à ajouter du $K_2S_2O_4$ et si on la trouve moins on ajoute de l'ABTS à fin d'obtenir une absorbance de 0,7.

- Préparation de Ferrocyanure de potassium ($C_6N_6FeK_3$)
La solution est préparée en mélangeant 10 g de TCA avec 100 ml d'eau distillée, puis bien homogénéise.

- Préparation de l'acide trichloracétique (TCA) 10%
La solution est préparée en mélangeant 10 g de TCA avec 100 ml d'eau distillée, puis bien homogénéise.

- Préparation de la solution $FeCl_3$
La solution est préparée en mélangeant 0.1g de $FeCl_3$ avec 100 ml d'eau distillée, puis bien homogénéise.

Résumé

Ce travail porte sur l'étude de la production, extraction et la mise en évidence de l'activité antimicrobienne et antioxydante des extraits bruts de quatre souches d'actinomycètes « **SC20**, **B01**, **NA44** et **ND101** » isolées du sol de la région de Bejaia.

L'étude consiste d'une part à la production des métabolites actifs des souches sur milieu Mincer Eau de Mer solide (MEM), leur extraction avec l'acétate d'éthyle, et d'autre part à la mise en évidence de l'activité antimicrobienne et antioxydante des différents extraits bruts. Le test de l'activité antibactérienne contre quatre bactéries (*E. coli* ; *L. innocua*, SARM et *V. cholerae*) et une levure (*C. albicans*) a révélé une activité antimicrobienne de tous les extraits vis-à-vis des cinq germes cibles testés avec les plus importants diamètres des zones d'inhibitions notés pour l'extraits **SC20** et **B01**. Les résultats du test d'activité antioxydante ont indiqués que l'extrait bruts de l'isolat **ND101** est doté d'une activité antioxydante vis-à-vis le DPPH, l'ABTS et le pouvoir réducteur. Tandis que les extraits de **SC20** et **B01** ne présentent aucune activité du piégeage du radical DPPH. Cependant l'extrait brut de l'isolat **NA44** est doté d'un pouvoir réducteur des ions Fe^{+3} en Fe^{+2} .

Mots clé : Actinomycètes, antibiotiques, Extraction, Activité antimicrobienne, Activité antioxydante.

Abstract

The aimed of this study is the production, extraction and evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of the crude extracts of four strains of actinomycetes "**SC20**, **B01**, **NA44** and **ND101**" isolated from the soil of Bejaia.

The study consists, on the one hand, in the production of the active metabolites of the strains on Mincer Sea Water (MSW) solid medium, their extraction with ethyl acetate, and on the other hand in the Antimicrobial and antioxidant activities tests of the various crude extracts. The antibacterial activity against four bacteria (*E. coli*, *L. innocua*, MRSA and *V. cholerae*) and a yeast (*C. albicans*) revealed an activity of all the extracts with respect to the five germs Targets tested with the largest diameters of the zones of inhibitions noted for the extracts **SC20** and **B01**. The results of the antioxidant activity test indicated that the crude extract of the **ND101** isolate is endowed with an antioxidant activity with respect to DPPH, ABTS radicals and reducing power. While the **SC20** and **B01** extracts show no activity of the trapping of the DPPH radical. However, the crude extract of isolate **NA44** is provided with a reducing power of Fe^{+3} ions to Fe^{+2} .

Key words: Actinomycetes, Antibiotics, Extraction, Microbiol activity, antioxidant activity.

INTRODUCTION

PARTIE I

Revue

Bibliographiques

PARTIE II
Méthodologie

PARTIE III

Résultats et

Discussion

CONCLUSION

Références

Bibliographiques

ANNEXES

Travail

Expérimental