

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 : Biotechnologie microbienne



Réf :.....

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

MASTER

Thème

**Etude du potentiel antioxydant d'extraits bruts de deux souches
d'actinobactéries *Streptomyces* sp. D1 et *Streptomyces* sp. D2**

Présenté par :
MESSALI ROZINA & SENAD KARIMA
Soutenu le : **22/06/2017**

Devant le jury composé de :

| | | |
|------------------------------------|-----|--------------|
| M ^r : KECHA MOULOUD | Pr | Président |
| M ^{me} : DJINNI IBTISSAM. | MCB | Encadreur |
| M ^{me} : BOUCHARBA NAWAL | MCA | Examinatrice |
| M ^{me} : TOUATI NAÏMA | MAA | Co-encadreur |

Année universitaire : 2016 / 2017

Remerciements

Nous tenons d'abord à remercier Dieu tout puissant qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

*Nos remerciements s'adressent à **Mr KECHA** d'avoir accepté de présider le jury et **Mme BOUCHARBA** pour avoir acceptée d'examiner Notre travail pendant notre soutenance.*

*Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et nos vifs remerciement à : Notre promotrice **Melle DJINNI Ibtissem**, qui a accepté de nous accueillir dans le laboratoire de mycologie. Nous lui témoignons, nos gratitudes et nos reconnaissances.*

*Nos remerciements s'adressent à **Melle Touati Naïma** enseignante à l'université d'A. Mira, qui nous a prodigué de précieux conseils pour ses orientations.*

Nous remercions l'ensemble du personnel du laboratoire pour nous avoir permis d'effectuer les différents tests et analyses et pour avoir mis à notre disposition le matériel et les moyens nécessaires à la réalisation de notre travail.

Nous tenons à exprimer nos sentiments de reconnaissance à toutes les personnes qui ont participé à ce travail, qui nous ont appris beaucoup de choses et qui nous ont aidé, conseillé et soutenu à tout moment afin de réaliser ce travail dans les meilleurs conditions.

Dédicaces

Je dédie ce travail :

A Mes très chers parents, dont les conseils et sacrifices m'ont permis de réussir dans mes études, qu'ils trouvent ici, l'expression de mon profond respect

A mes chères sœurs : Rima et Lila

A mes chers petit frères : Kader, Idir, Oussama

A toute ma Famille

A tous mes ami(e)s

Rozina

Dédicaces

Je dédie ce travail :

*A Mes très chers parents, dont les conseils et
sacrifices m'ont permis de réussir dans mes études,
qu'ils trouvent ici, l'expression de mon profond
respect*

A mes chers frères : Rachid et Nouredine

A mes chères sœurs : Hayat et Moufida

A toute ma Famille

A tous mes ami(e)s

KARIMA

| | |
|---|----|
| Liste des figures | |
| Liste des tableaux | |
| Liste des abréviations | |
| Introduction | 1 |
| Chapitre I : Revue bibliographique | |
| I. Les actinobactéries : écologie et importance | 3 |
| 1. Ecologie des actinobactéries..... | 3 |
| 1.1 Distribution dans la nature..... | 3 |
| 1.2 Cycle de développement exemple de streptomyces | 3 |
| 2. Importance des actinobactéries | 4 |
| 2.1 Importance en biotechnologie..... | 4 |
| 2.2 Importance en agronomie | 5 |
| 2.3 Importance en médecine | 6 |
| II. Le Métabolisme secondaire des actinobactéries | 7 |
| III. Le potentiel antioxydant | 7 |
| 1. Les radicaux libres..... | 7 |
| 2. Origine des radicaux libre..... | 8 |
| 3. Cibles des radicaux libres..... | 9 |
| 4. Le stress oxydatif..... | 10 |
| 5. Les antioxydants..... | 10 |
| 6. Les molécules antioxydants chez les actinobactéries..... | 12 |

Chapitre II. Matériels et méthodes

I. Matériels

| | |
|--|----|
| 1.1. Matériel analytique..... | 13 |
| 1.2. Matériel biologique..... | 13 |
| 1.2.1. Microorganismes utilisés : Actinomycètes..... | 13 |
| 1.2.2. Germes cibles utilisés..... | 13 |

II. Méthodes.....

| | |
|---|----|
| 2.1. Repiquage des souches..... | 13 |
| 2.2. Etude morphologique des souches d'actinomycètes..... | 13 |
| 2.2.1. Caractères macromorphologiques..... | 13 |
| 2.2.2. Caractères micromorphologiques..... | 14 |
| 2.3 Culture des souches et production des molécules actives..... | 14 |
| 2.4. Extraction des molécules actives..... | 14 |
| 3. Mise en évidence de l'activité antagoniste des extraits bruts des isolats..... | 15 |
| 4. Evaluation de l'activité antioxydante..... | 15 |
| 4.1. Dosages des polyphénols..... | 15 |
| 4.2. Dosage des flavonoïdes..... | 16 |
| 4.3. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl- 1-picrylhydrazyl)..... | 16 |
| 4.4. Inhibition du radical ABTS..... | 18 |
| 4.5. Etudes du pouvoir réducteur..... | 19 |

Chapitre III. Résultat et discussion

| | |
|---|----|
| I. Etude des caractères morphologiques des souches d'actinobactéries..... | 20 |
| 1. Caractères macromorphologiques..... | 20 |
| 2. Caractères micromorphologiques..... | 22 |
| II. Production et extraction des molécules actives par fermentation solide..... | 22 |
| III. Etude de l'activité antagoniste des extraits bruts..... | 23 |
| IV. Dosage des composés phénoliques..... | 24 |
| 1. Dosage polyphénols totaux..... | 24 |
| 2. Dosage des flavonoïdes..... | 26 |
| V. Activité antioxydante..... | 27 |
| 1. Activité scavenginig du radical DPPH..... | 27 |
| 2. Piégeage du radical ABTS*..... | 29 |

| | |
|--|----|
| 3.Les IC ₅₀ sur les radicaux libres DPPH et ABTS..... | 31 |
| 4.Evaluation du pouvoir réducteur | 33 |
| Conclusion | 36 |
| Références | |
| Annexes | |
| Résumé | |
| Abstract | |

| N° du tableau | Titre | Page |
|----------------------|---|-------------|
| I | Quelques molécules ATB obtenus à partir d'actinobactéries d'origine tellurique et marine utilisé en médecine. | 6 |
| II | les molécules antioxydantes produites par différentes souches d'actinobactéries. | 12 |
| III | Caractéristiques macromorphologiques des souches D1 et D2 après 21 jours d'incubation sur les différents milieux de culture à 28°C. | 20 |
| IV | Concentrations des extraits bruts des 2 isolats étudiés obtenus après macération. | 23 |
| V | Les valeurs moyennes des concentrations inhibitrice IC ₅₀ (mg/ml) des extraits testés et des antioxydants de références. | 31 |

Liste des Abréviation

ABTS : L'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)

AE: Acétate d'éthyle

BHA: Hydroxyanisole butylé

BHT: Hydroxytoluène butylé

IC50: Concentration inhibitrice à 50%.

DMSO: Diméthyle sulfoxide

DPPH: 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

E.A.G: Equivalent Acide Galique

E.S: Extrait sec

EOA : Espèces Oxygénées Actives

HAT: H-atomtransfer

HPLC: high performane liquidde chromatography

I%: Pourcentage d'inhibition

ISP: International *Streptomyces* Project

MA: Mycélium aérien

MS: Mycélium de substrat

DRO : dérivés réactifs de l'oxygène

SCA: Starch Casein Agar

SM : Spectrométrie de masse

SOD: superoxyde dismutase

SH : Sulfhydriles

Liste des figures

| | | |
|------------------|---|----|
| Figure 1 | Cycle de développement du genre <i>streptomyces</i> | 4 |
| Figure 2 | Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie..... | 9 |
| Figure 3 | Structure de l'enchaînement benzo- γ -pyrone..... | 11 |
| Figure 4 | Réaction du Chlorure d'Aluminium avec les flavonoïdes..... | 16 |
| Figure 5 | Forme réduite du radical DPPH..... | 17 |
| Figure 6 | Oxydation de l'ABTS par le persulfate de potassium et génération de ABTS+•..... | 18 |
| Figure 7 | Macromorphologie des souches D1 et D2 sur les milieux SCA (50%) et Gausse après jours d'incubation à 28°C..... | 21 |
| Figure 8 | Observation au microscope optique des mycéliums aériens des souches A) D1 et B) D2, cultivées pendant 14 jours à 28°C sur les milieux SCA (50%) et Gausse au grossissement (x10)..... | 22 |
| Figure 9 | Activité antagoniste des extraits bruts des isolats D1 et D2 à l'égard de 5 germes cibles..... | 23 |
| Figure 10 | Teneur moyenne en polyphénols des deux extraits des souches de <i>Streptomyces</i> D1 et D2..... | 24 |
| Figure 11 | Teneur moyenne en flavonoïdes des deux extraits des souches de <i>Streptomyces</i> D1 et D2..... | 26 |
| Figure 12 | Pourcentage du pouvoir inhibiteur en fonction de la concentration de chaque extrait et standard..... | 27 |
| Figure 13 | Variation de l'inhibition du radical DPPH en fonction des concentrations de l'extrait D1..... | 28 |
| Figure 14 | Variation de l'inhibition du radical DPPH en fonction des concentrations de l'extrait D2..... | 29 |
| Figure 15 | Variation de l'inhibition de l'ABTS* en fonction des concentrations de l'extrait D1..... | 30 |
| Figure 16 | Variation de l'inhibition de l'ABTS* en fonction des concentrations de l'extrait D2..... | 30 |
| Figure 17 | Variation de l'absorbance en fonction de la concentration de l'extrait D1..... | 33 |
| Figure 18 | Variation de l'absorbance en fonction de la concentration de l'extrait D2..... | 33 |
| Figure 19 | IC ₅₀ du pouvoir réducteur les deux extraits et des standards..... | 34 |

Introduction

Les avancées de la médecine ont permis de mieux comprendre la physiologie du corps humain et les réactions chimiques permettant son bon fonctionnement. Dès lors, bon nombre de pathologies ont vu leurs mécanismes identifiés. L'oxydation, si elle est nécessaire à la vie, peut aussi avoir un effet délétère : le stress oxydant peut causer de sévères dommages cellulaires. Ainsi, l'intérêt de trouver des antioxydants naturels, sans aucun effet indésirable a considérablement augmenté (Rechner *et al.*, 2002).

Au début des années 1980, la communauté scientifique a commencé à se concentrer sur l'exploration des antioxydants microbiens. Dès lors, les chercheurs ont découvert et caractérisé une variété de composés antioxydants à partir de microorganismes dans l'espoir d'être développés en nouveaux agents thérapeutiques (Hall, 2001).

Dans ce domaine de la découverte de médicaments d'origine microbienne, les souches d'actinobactéries ont été largement explorées en raison de leur capacité à produire divers métabolites secondaires bioactifs qui représentent 45% de tous les métabolites microbiens bioactifs découverts (Sharma et Shah, 2014). Dans ce contexte, le genre *Streptomyces* qui a été proposé pour la première fois par Waksman et Henrici en 1943, ce genre bactérien qui a lui seul produit de plus de 75% des antibiotiques naturels (Kinkel *et al.*, 2014; Ser *et al.*, 2015a). En effet le genre *Streptomyces* a apporté une contribution significative à l'humanité en raison de sa capacité à produire une large gamme de composés bioactifs ayant diverses activités biologiques (Bérdy, 2005; Jauri *et al.*, 2016). À l'heure actuelle, plus de 7 000 composés bioactifs avec diverses applications cliniques ont été découverts et isolés à partir de ce genre, y compris des molécules antioxydantes, anticancéreuse, antifongiques et immunosuppresseurs (Bérdy, 2012 ; Karam et Wali, 2015).

Par ailleurs, l'utilisation des antioxydants synthétiques est un sujet très étudié de fait de leur impact négatif sur la santé humaine (Branen, 1975 ; Barlor, 1990). Afin de trouver des solutions à ce problème, les recherches actuelles s'intéressent aux antioxydants naturels issus de souches actinobactéries (Lee, 2014).

C'est dans un contexte de valorisation de la diversité des souches d'actinobactéries d'origine Algérienne qu'en mettant en évidence leur profil antibactérien et antioxydant que s'inscrit la présente étude.

Nous nous sommes intéressés à l'extraction de molécules actives de deux souches d'actinobactéries d'origine différents en mettant en évidence leur profil antibactérien et antioxydant.

La première partie de ce manuscrit est consacrée à une synthèse bibliographique sur les actinobactéries ainsi qu'un aperçu général sur leur métabolisme secondaire et les antioxydants.

La seconde partie du document traite les principes généraux des matériels et méthodes utilisés à savoir :

- L'étude des caractères macromorphologiques et micromorphologique des souches d'actinobactéries
- La production et l'extraction des substances actives.
- La mise en évidence de l'activité antimicrobienne des deux extrais bruts
- La mise en évidence de l'activité antioxydante par trois tests DPPH, ABTS* et pouvoir réducteur.

Et enfin, la troisième partie du manuscrit présentera les résultats et discussion des principales parties de cette étude.

Partie Bibliographique

I. Les actinobactéries : Ecologie et importance

1. Ecologie des actinobactéries

1.1. Distribution dans la nature

Les actinobactéries, appartiennent à l'ordre *Actinomycetales*, sont des Eubactéries à Gram positifs et filamenteux avec une teneur élevée en G + C supérieur à 55% .Ce sont des microorganisme hétérotrophes avec toutefois des espèces capables de croissance chimioautotrophe (Ensign *et al.*, 1993).

Les actinobactéries sont largement répandus dans la nature. En effet leur nombre dépend de nombreux facteurs, parmi lesquels la nature et l'abondance de la matière organique, la profondeur, le pH, l'aération et l'humidité en sont les plus importants (Theilleux, 1993). Elles ont été isolées à partir d'habitats variés tels que les sédiments marins (Balagurunthan *et al.*, 2010), l'eau de mer (Subramani et Aalbersberg, 2013), les rhizosphères des plantes médicinales (Khamna *et al.*, 2010) et de l'écorce des arbres (Pullen *et al.*, 2002; Kitouni *et al.*, 2005).

Par ailleurs, certaines espèces ont été isolées à partir de milieux extrêmes tel que des sols pollués contenant des métaux lourds (Desjardin, 2002), des hydrocarbures ou du pétrole (Baniasadi *et al.*, 2009), d'autres se comportent comme des parasites intracellulaires des spongiaires (Grandhimathi *et al.*, 2007). Les actinobactéries constituent une proportion importante de la microflore tellurique (10^7 - 10^8 UFC/ml) (Hoorman et Islam, 2010) dont la plupart sont saprophytes (kekuda *et al.*, 2013), mais quelques-uns peuvent être pathogènes ou symbiotes des plantes et des animaux (Suzuki *et al.*, 1994).

1.2. Cycle de développement du genre *Streptomyces*

Les actinobactéries ont un cycle de développement complexe (Figure 1). Il débute par la germination d'une spore qui donne naissance à un mycélium primaire ou du substrat (MS) formé d'hyphes qui se ramifient. Le développement du mycélium du substrat vers la partie superficielle donne le mycélium "secondaire" ou aérien (MA). Les extrémités des hyphes aériens se différencient pour former des spores, qui sont des agents de dissémination (Kim *et al.*, 2004 ; Smaoui, 2010).

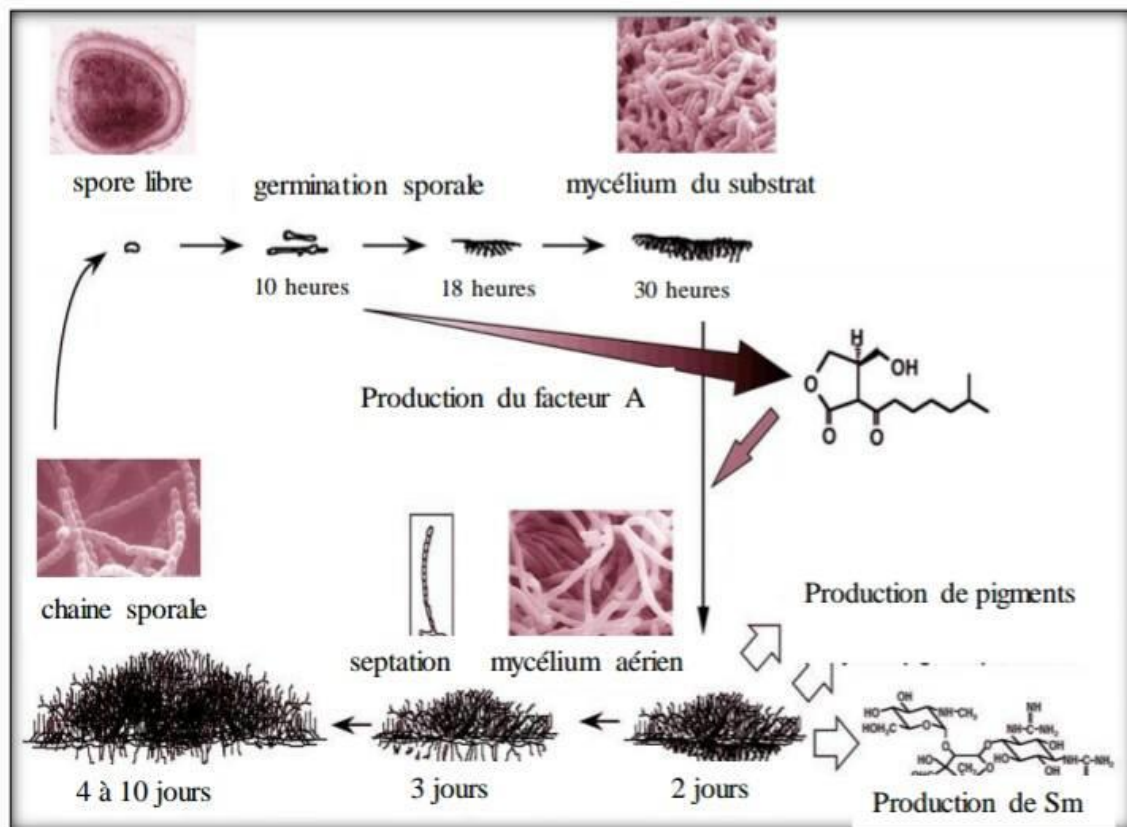


Figure 1: Cycle de développement du genre *Streptomyces* (Horinouchi, 2002).

2. Importance des actinobactéries

Les actinobactéries sont largement connues pour leur polyvalence métabolique (Neelu, 2013). En effet, la grande majorité est dotées d'activité biologiques suite à leur capacité à produire un large éventail de molécules bioactives, telles que les antibiotiques, les antifongiques, les antitumoraux, les composés immunosuppresseurs etc, importants sur le plan commercial. Par ailleurs, selon Hashimoto (2005), certaines espèces sont utilisées dans des procédés industriels de bioconversion pour la fabrication de produits chimiques de base et de produits agrochimiques.

2.1. Importance en biotechnologie

Les actinobactéries produisent une gamme étendue de composés bioactifs comprenant diverses enzymes ayant des applications biotechnologiques multiples (Saini, 2015). Ces bactéries filamenteuses et leurs enzymes ont un ensemble d'applications industrielles et environnementales, telles que la décontamination des sols (Yong-chao *et al.*, 2014), la lutte biologique contre les organismes phytopathogènes (Minotto, 2014) et la décomposition de la matière organique et des déchets domestiques (Hirsch et Valdés, 2010; Camacho *et*

al.,2014). Une autre fonction des actinobactéries en haute mer est également intéressante comme la dégradation de l'huile et la production de biosurfactant (Wang *et al.*, 2014).

2.2. Importance en agronomie

Les actinobactéries sont des éléments clés de l'environnement du sol et contribuent de façon importante à la durabilité des systèmes agricoles. En effet les membres de nombreux genres ont un potentiel d'utilisation dans la bioconversion des déchets agricoles et urbains en produits chimiques de valeur (Neelu, 2013). Elles sont également une source importante d'enzymes hydrolysant la lignocelluloses (Saini, 2015). En effet, les enzymes lignocellulolytiques, sont largement exploitées dans diverses industries à base de lignocelluloses, (Prakash, 2013) tel que les Cellulases (Eida, 2012), et les β -glucosidases (Ball *et al.*,1988) . De plus selon Boroujeni *et al.*, (2012) le genre *Streptomyces* s'avère être le producteur d'hémicellulases le plus abondant parmi les actinobactéries.

Par ailleurs ces microorganismes sont une composante importante de la rhizosphère de nombreuses plantes où elles améliorent leurs croissances et protègent leurs racines contre l'attaque des phytopathogènes (Kekuda *et al.*, 2013). De plus, elles jouent un rôle important dans la minéralisation de la matière organique, la fixation de l'azote et l'amélioration des paramètres physiques du sol (Das *et al.*, 2006).

2.3. Importance en médecine

Les actinobactéries sont extrêmement importantes pour la santé humaine (Yu Deng, 2017) car elles constituent l'une des sources majeurs de synthèse de nouveaux antibiotiques, qui peuvent être efficaces pour combattre la multirésistance bactérienne de certaines espèces (Lam, 2006; Fenical et Jensen, 2006).

Un grand nombre d'antibiotiques présents sur le marché est obtenue à partir des actinobactéries. (Neelu, 2013). En effet, le genre *Streptomyces* à lui seul est à l'origine d'environ 75% des molécules antibiotiques utilisées en médecine et 60% des antifongiques utilisés en agriculture (Sujatha *et al.*, 2005).

Les classes importantes d'antibiotiques produites par les actinobactéries (TableauI) comprennent: les β lactamines, les aminoglycosides, les lipopeptides, les glycopeptides, les asamycines, les anthracyclines, les nucléosides, les peptides, les polyènes, les polyéthers, les tétracyclines et les macrolides (Adegboye, 2013).

Tableau1 : Quelques molécules antibiotiques ATB obtenues à partir d'actinobactéries d'origine tellurique et marine utilisé en médecine.

| Molécules | Source | Activité | Références |
|--|--|-----------------------------------|---|
| Amphotericin B | <i>Streptomyces nodosus</i> | Antifongique | (Caffrey <i>et al.</i> ,2001) |
| Oxytetracycline | <i>Streptomyces rimosus</i> | Antibactérien | (Petkovic <i>et al.</i> , 2006) |
| lactamide macrocyclique (Aureoverticillactam) | <i>Streptomyces aureoverticillaris</i> | Anticancéreux | (Mitchell <i>et al.</i> ,2004) |
| PolycétideActinofuranones A et B | <i>Streptomyces</i> sp. | Cytotoxique | (Cho <i>et al.</i> , 2006) |
| Thiamycine | <i>Streptomyces michiganensis</i> | Antiprotozoaire | (Cassinelli <i>et al.</i> ,2003) |
| Pentalenolactone I | <i>Streptomyces filipinensis</i> | Antibactérien | (Kuzuyama et Seto,2003; Uyeda <i>et al.</i> , 2001) |
| Benthocyanine | <i>Streptomyces prunicolor</i> | Radical scavenger | (Kuzuyama et Seto,2003; Takahiro,1990) |
| Benzastatin | <i>Streptomyces nitrosporeus</i> | Antivirale | (Kuzuyama et Seto,2003;Lee <i>et al.</i> , 2007) |
| Carquinostatin B | <i>Streptomyces exfoliatus</i> | Protection des cellules nerveuses | (Kuzuyama et Seto,2003; Shinya <i>et al.</i> , 1997) |

II. Le métabolisme secondaire chez les actinobactéries

Les métabolites secondaires microbiens sont des produits de faible masse moléculaire du métabolisme secondaire, généralement produits pendant la phase de croissance tardive (idiophase) d'un microorganisme. Ils ne sont pas essentiels à la croissance des cultures productrices mais servent à diverses fonctions de survie (Demain et Fang, 2000). Bien qu'ils ne soient pas essentiels à la croissance microbienne, les métabolites secondaires sont très importants pour la santé, la nutrition et l'économie de nos sociétés (Berdy, 2005).

Par ailleurs, la composition des milieux de culture affectent également le type de métabolites secondaires produits par les microorganismes.(Lertcanawanichakul *et al.*,2015). En fait, les travaux de Gesheva et al., (2005) ont démontré que la nature des sources de carbone, d'azote, de phosphore, de potassium, de magnésium et de trace éléments minéraux (essentiellement Mn^{2+} , Cu^{2+} et Fe^{2+}), affectent fortement la production de molécules antibiotiques par les espèces du genre *streptomyces*.

III. Le potentiel antioxydant

Au milieu des années 1950, Gerschman a démontré que l'oxygène, molécule pourtant indispensable à la vie, présente également une toxicité pour l'organisme (Gerschman *et al.*, 2001). En effet elle est susceptible d'entraîner des effets dommageables dans l'organisme via la formation de radicaux libres et d'espèces oxygénées réactives (EOA) (Haleng *et al.*, 2007). Ces radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable ; mais la production peut devenir excessive ou résulter de phénomènes toxiques exogènes et l'organisme va devoir se protéger par différents systèmes antioxydants (Favier, 2003).

1. Les radicaux libres

Un radical libre est une molécule chimique hyper active et instable qui possède un ou plusieurs électrons non appariés dans une orbitale externe. Afin de se stabiliser, il réagit avec d'autres atomes ou molécules et se comporte, selon les cas, comme un oxydant ou un réducteur, afin d'apparier son électron libre. Il aura donc tendance soit à donner son électron, soit à créer une liaison pour combler son orbitale. (Cheeseman, 1993).

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et appelés radicaux primaires. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés

biochimiques de la cellule. Ces radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ et le radical hydroxyle OH^{\bullet} , ou de l'azote tel le monoxyde d'azote NO^{\bullet} (Yoshikawa, 2000).

D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde (ONOOH), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène (Favier, 2003).

Les radicaux libres entraînent un stress oxydatif contribuant à plus d'une centaine de troubles chez l'homme, tels que l'arthrose, l'arthrite, la gastrite, le cancer, le diabète (Wadkar, 2010). Des antioxydants naturels tels que la vitamine E (α -tocophérol), la vitamine C et les polyphénols/flavonoïdes sont connus pour être utilisés pour traiter et prévenir ces maladies (Cláudia and Alvaro, 2004).

2. Origine des radicaux libres

Durant le processus de respiration, l'oxygène est réduit, de façon progressive et contrôlé, en eau par apport de 4 électrons. En revanche, sa réduction incomplète conduit à la formation d'espèces qui ont encore un caractère oxydant et qui sont très réactives: H_2O_2 (peroxyde d'hydrogène ou eau oxygénée), OH^{\bullet} (radical hydroxyle) et dans une moindre mesure, $O_2^{\bullet-}$ (radical anion superoxyde). Ces espèces, appelées dérivés réactifs de l'oxygène (DRO), pourront oxyder des macromolécules telles que l'ADN, les lipides et les protéines (Vaughan, 1997).

Leurs apparitions sont reliées entre elles par des réactions enzymatiques ou chimiques (Figure 2). L'activité superoxyde dismutase (SOD) produit du H_2O_2 à partir du $O_2^{\bullet-}$ et le H_2O_2 conduit à la formation de OH^{\bullet} en présence de Fe^{2+} (réaction de Fenton). Par ailleurs, certaines réactions chimiques ou photochimiques (en particulier avec les UVA) conduisent à l'excitation de la molécule de dioxygène. Cet état, noté [1O_2], est appelé oxygène singulet (spin nul) (Favier, 2003).

Le métabolisme normal de la cellule produit sans cesse des dérivés réactifs de l'oxygène (Cerruti, 1985). En effet, les systèmes utilisant un transfert d'électrons sont parfois le lieu de fuites électroniques. Par conséquent, la chaîne respiratoire, les oxydases (xanthine, NADPH...) et les réductases sont responsables d'une production permanente d'espèces oxydantes (Kather, 1995).

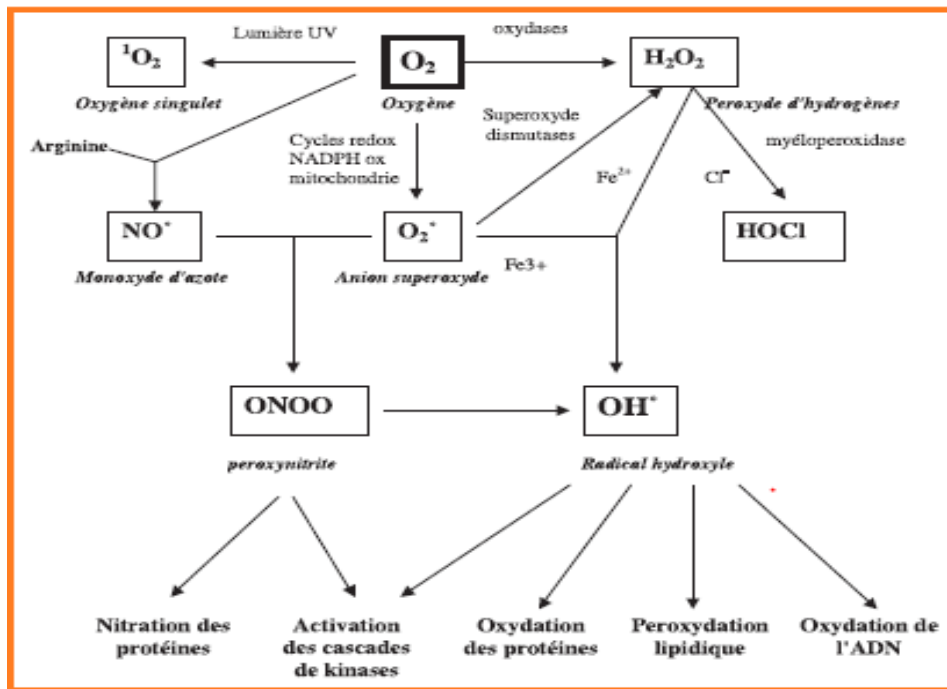


Figure 2 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie (Favier, 2003).

3. Cibles des radicaux libres

Lors d'un stress oxydant, les espèces oxygénées réactives (EOR) non « détoxiquées » par le système antioxydant attaquent et endommagent par oxydation les macromolécules contenues dans les cellules, directement à leur contact, notamment les lipides, les protéines et l'ADN (Koechlin, 2006).

3.1. La membrane

L'attaque des radicaux libres des doubles liaisons lipidiques membranaires induit des processus de peroxydations en cascade aboutissant à la désorganisation complète de la membrane altérant de ce fait ses fonctions d'échange, de barrière et d'information (Davies, 2000).

3.2. L'ADN

Les EOR, et plus spécifiquement le radical hydroxyle, peuvent provoquer des dommages des acides nucléiques. En provoquant des cassures, des mutations ou endommager le processus de réparation de l'ADN. De plus, les EOR peuvent induire des modifications au niveau de la transcription ou de la traduction de l'ADN et ainsi aboutir à la formation de protéines altérées. Ces modifications peuvent être à l'origine de phénomènes mutagènes ou d'un vieillissement accéléré (Valko *et al.*, 2006).

3.3. Les protéines

Les effets des EOR sur les protéines sont complexes, allant du clivage des chaînes latérales des différents acides aminés jusqu'au squelette protéique. Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryles (SH). C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui sont ainsi oxydées et inactivées. Les protéines peuvent alors soit subir des réticulations par formation de pont bi-tyrosine, soit subir des coupures et soit des modifications de certains acides aminés. En outre, les protéines oxydées peuvent aussi devenir très hydrophobes soit par suppression de groupements amines ionisables, soit par extériorisation de zones hydrophobes centrales, ce qui conduit à la formation d'amas anormaux dans ou autour des cellules. Ces amas associés aux lipides forment les dépôts de lipofuschines, caractéristiques des tissus des personnes âgées (Favier, 2003).

4. Le stress oxydatif

Le stress oxydant correspond à un déséquilibre entre la génération d'espèces oxygénées actives (EOA) et les défenses antioxydantes de l'organisme, en faveur des premières (Haleng *et al.*, 2007). Le stress oxydant est potentiellement impliqué dans le vieillissement ou le développement de pathologies associées telles que les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, cancer, diabète... etc. (Pincemail *et al.*, 2009).

5. Les antioxydants

Les antioxydants sont définis comme une substance qui retarde, empêche ou élimine les dommages oxydatifs d'une molécule cible (Halliwell, 2007) soit en stabilisant ou en désactivant les radicaux libres avant d'interagir avec les cellules. (Percival, 1998 ; Kulikowska *et al.*, 2004).

Deux catégories de système de défense ont été mises en évidence (Powers *et al.*, 2000), le système endogène et le système exogène.

5.1. Les antioxydants endogènes

Le système endogène est constitué d'enzymes ou d'agents réducteurs (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase) dont l'action est de neutraliser les EOR par leur transformation en molécules stables et non réactives.

5.2. Les antioxydants exogènes

L'organisme possède une seconde ligne de défense « les piègeurs de radicaux libres » qui sont des composés pour la plupart apportés par l'alimentation (non enzymatique) ce sont des antioxydants exogènes tel que la vitamine E (α tocophérol), la vitamine C (ascorbate) et les caroténoïdes (vitamine A et β -carotène, les flavonoïdes...). En effet leur rôle essentiel est

de neutraliser les effets toxiques des EOR, limitant ainsi toute atteinte de l'intégrité cellulaire (Christelle Koechlin, 2006).

5.2.1. Les polyphénols

Ce sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois). Les plus représentés sont les anthocyanes, les flavonoïdes et les tannins (Boizot et Charpentier, 2006). Leur étude a été croissante ces dernières décennies en raison de leurs bienfaits sur la santé, notamment grâce à leur pouvoir antioxydant mais aussi dans la prévention ou le traitement de nombreuses pathologies comme les cancers, les maladies cardiovasculaires ou dégénératives (Orgogozo *et al.*, 1997)

Le mécanisme de piégeage des radicaux libres par les polyphénols se fait par le transfert de l'atome d'hydrogène (H-atomtransfer ou HAT). Le radical libre est réduit par transfert de l'atome d'hydrogène de l'antioxydant (ArO-H) vers le radical (R•).



5.2.4. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des produits largement distribués dans le règne végétal et sont couramment consommés quotidiennement sous forme de fruits, légumes et boissons telles que le vin et le thé (Ghedira, 2005). Ils dérivent de l'enchaînement benzo- γ -pyrone et peuvent être classés selon la nature des différents substituants présents sur les cycles de la molécule et du degré de saturation du squelette benzo- γ -pyrone (Figure 3). Les flavonoïdes au sens strict sont des composés dont la substitution par un noyau benzénique se fait en position 2 (Di Carlo *et al.*, 1999).

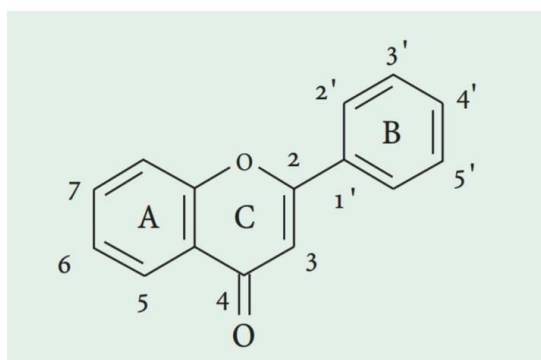


Figure 3 : Structure de l'enchaînement benzo- γ -pyrone (Di carlo *et al.*, 1999).

Les flavonoïdes inactivent et stabilisent les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle fortement réactif. Ils sont également capables de chélater les ions métalliques (largués à partir de leurs protéines de fixation ou de transport) qui peuvent renforcer ces effets délétères par la production des radicaux hydroxyles (OH·) (Nijveldt *et al.*, 2001; Rice-Evans *et al.*, 1996). En tant qu'antioxydants, les flavonoïdes sont capables d'inhiber la carcinogénèse. Ils inhibent en plus l'angiogénèse, la prolifération cellulaire et affectent le potentiel invasif et métastatique des cellules tumorales (Rice-Evans, 2001).

IV. Les molécules antioxydantes chez les actinobactéries

Les actinobactéries sont des producteurs prolifiques de divers composés y compris des molécules dotés d'une propriété antioxydante. Dans le tableau II ci-dessous, sont présentées quelques molécules à activité antioxydante isolées à partir de souche d'actinobactéries.

Tableau II : Quelques exemples de molécules antioxydantes produites par différentes souches d'actinobactéries.

| Molécules | Source | Références |
|--|-------------------------------|------------------------------------|
| La mélanine | <i>Streptomyces sp</i> | Preeti, 2013 |
| L'undécylprodigiosin | <i>Streptomyces sp</i> | Nada, 2012 |
| Diazepinomidine | <i>Micromonospora sp</i> | Abdelmohsen <i>et al.</i> , 2012 |
| Dermacozines A-G | <i>Dermacoccus abyssi sp.</i> | Abdel-Mageed <i>et al.</i> , 2010) |
| (Z)-1-((1-hydroxypenta-2,4-dien-1-yl)oxy)anthracene-9,10-dione | <i>Nocardioopsis alba</i> | Avilala <i>et al.</i> , 2014 |
| PC 766 B | <i>Nocardia brasiliensis</i> | (Kumaqai <i>et al.</i> , 1993) |
| Dihydroherbimycin | <i>Streptomyces sp</i> | (Chang et Kim, 2007) |

Matériel et Méthodes

I. Matériel

1. Matériel analytique

Le matériel utilisé dans cette étude est rapporté en annexe I

2. Matériel biologique

2.1. Les microorganismes étudiés : Actinobactéries

Les souches d'actinobactéries notées D1 et D2 étudiées dans ce travail appartiennent à la collection du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA) de l'Université A. Mira de Bejaia. Les deux souches ont été isolées par Dr Djinni en 2011 et ont pour origine une algue marine récoltée dans la région de Bejaïa et le sol de la région de Béchar, respectivement.

2.2. Germes cibles utilisés :

Les microorganismes cibles utilisés dans cette étude sont présentés ci-dessous:

Bactéries à Gram positif

Listeria innocua CLIP 74915.

Bactéries à Gram négatif

Salmonella Typhi ATCC 14028.

Vibrio cholerae ATCC 14035.

Actinetobacter baumani ROX.

Levure *Candida albicans* ATCC 1023.

II. Méthodes

1. Repiquage des souches

Les deux isolats d'actinobactéries étudiés D1 et D2 repiqués, à partir de cultures sur milieu solide conservées à 4°C, sur leurs milieux d'isolement respectifs, à savoir le milieu Amidon Caséine Agar (SCA) additionné de 50% d'eau de mer (Williams et Kuster, 1964) et le milieu Gausse (Ivantiskaya *et al.*, 1978), puis incubés à 28°C pendant 7 à 14j.

La composition de ces deux milieux de culture est donnée en Annexe I

2. Etude morphologique des souches d'actinobactéries

2.1. Caractères macromorphologiques

Cette étude vise à apprécier la croissance en déterminant la couleur des mycéliums aérien et du substrat ainsi que celle des pigments solubles produits mais également l'aspect général des colonies sur différents milieux de culture : ISP1, ISP2, ISP3, ISP4 et ISP6 dont la composition est donnée en annexe I.

2.2. Caractères micromorphologiques

Les isolats D1 et D2 cultivés pendant 14 jours sur, respectivement, les milieux SCA et Gausse sont observés à l'aide d'un microscope optique, en utilisant le grossissement (x10). Ces observations consistent à voir la sporulation caractéristique, l'agencement des spores (Williams *et al.*, 1989) ainsi que la fragmentation ou non du mycélium du substrat. L'analyse est réalisée directement sur boîtes de Pétri afin d'étudier les mycéliums en place sans en altérer les structures.

2.3. Culture des souches et obtention des extraits bruts

Dans le but d'obtenir les extraits bruts des deux souches D1 et D2 nécessaires à notre étude, une production sur milieu solide a été entreprise pour chacune d'entre elles. En effet, les deux isolats sont cultivés en stries serrées à la surface de leurs milieux correspondants : SCA 50% eau de mer et Gausse agar sur 20 boîtes de Pétri pour chaque isolat. Les boîtes sont par la suite incubées pendant 07 jours à 28°C.

2.4. Extraction des molécules actives

L'extraction des molécules actives produites par chaque isolat est réalisée par macération. En effet, les mycéliums et les géloses sont découpés en petits morceaux puis introduits dans un grand flacon additionné d'un volume de 500 ml d'acétate d'éthyle. Le mélange est ainsi laissé macérer pendant une nuit sous agitation permanente à température ambiante.

Les extraits bruts sont obtenus après filtration avec du papier Wattman N°1, puis évaporés à sec en utilisant un Rotavapor. Les extraits bruts ainsi obtenus sont récupérés dans un volume de méthanol (d'acétate d'éthyle, selon la solubilité des composés produits, dans l'un ou l'autre des solvants organiques) (Pimentel-Elardo *et al.*, 2010) les concentrations massiques des deux extraits bruts sont déterminées et les flacons sont par la suite conservés à l'abri de la lumière à 4°C pour une utilisation ultérieure.

3. Mise en évidence de l'activité antagoniste des extraits bruts

L'activité antagoniste des deux extraits bruts à l'encontre de germes pathogènes a été évaluée par la méthode des puits sur milieu Mueller Hinton préalablementensemencés par les germes ciblés cités plus haut à raison de 10^7 UFC/ml. Brièvement, cette technique consiste à former des puits de 6mm de diamètre à l'aide d'un emporte-pièce puis un volume de 100µL de chaque extrait ainsi que les deux solvants utilisés (méthanol et l'acétate d'éthyle) considérés comme témoin, est introduit dans les puits. Les boîtes sont mises à 4°C pendant 2 h afin de

permettre la diffusion des substances actives puis incubées à 37°C pendant 24 h. La lecture des résultats se fait en mesurant le diamètre des zones d'inhibition exprimées en millimètre autour des puits à l'aide d'un pied à coulisse.

4. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits bruts

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, *in vitro*, l'activité antioxydante par piégeage de différents radicaux, comme le radical ABTS+• (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique), ainsi que la méthode utilisant le radical libre DPPH• (diphenyl-picrylhydrazyle). Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise (Cristina *et al.*, 2009). Dans le présent travail nous avons essayé d'évaluer les capacités totales antioxydantes des extraits méthanolique et d'acétate d'éthyle en utilisant trois méthodes spectrophotométrique à savoir ; le pouvoir réducteur de fer, l'activité anti-radicalaire pour le radical ABTS+• (2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acide, ABTS) et l'activité anti-radicalaire pour le radical DPPH• (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH).

4.1. Dosage des polyphénols totaux par la méthode de Folin-ciocalteu

4.1.1. Principe de la méthode

Le réactif Folin-ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits (Boizot et Charpentier, 2006).

4.1.2. Mode opératoire

Le dosage des polyphénols totaux dans les deux extraits est réalisé par la méthode de Folin-ciocalteu (Junaid *et al.*, 2013).

Une prise d'essai de 250µL de la solution mère de notre extrait (1/10), à laquelle est ajouté 250µL du réactif de Folin-Ciocalteu fraîchement préparé (dix fois dilué) et 2000µL de carbonate de sodium à 7,5 % (Na₂CO₃). Le mélange est soumis à une agitation au vortex puis incubé à une température ambiante et à l'obscurité pendant 15 min. L'absorbance est lue au spectrophotomètre UV/Vis à une longueur d'onde (λ) de 765 nm après centrifugation.

Le blanc est préparé en parallèle, présenter par le solvant d'extraction en suivant le même protocole.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en utilisant un standard étalon : l'acide gallique à différentes concentrations et pratiquée dans les mêmes conditions opératoires que celles des échantillons, servira à la quantification des polyphénols, Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g)

4.2. Dosage des flavonoïdes

4.2.1. Principe de la méthode

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

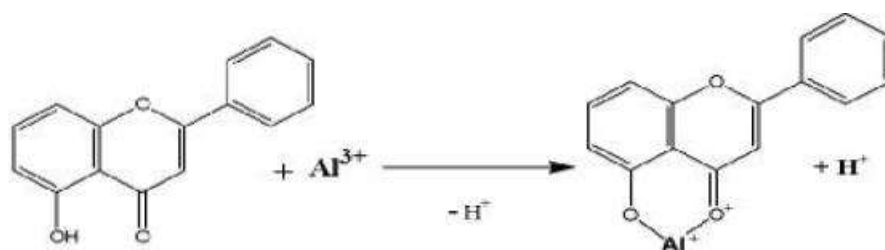


Figure 4 : Réaction du Chlorure d'aluminium avec les flavonoïdes (Ribereau-Gayon, 1968).

4.2.2. Mode opératoire

La quantification du contenu en flavonoïdes des deux extraits est estimée par la méthode du trichlorure d'aluminium selon Bahorun *et al.*, (1996). Un volume d'extrait (1mL de SM²=1/10 est additionné d'un même volume de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$ à 2 %). Le mélange est soumis à une agitation au vortex, puis incubé à une température ambiante à l'obscurité pendant 15 min et l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde (λ) de 430 nm.

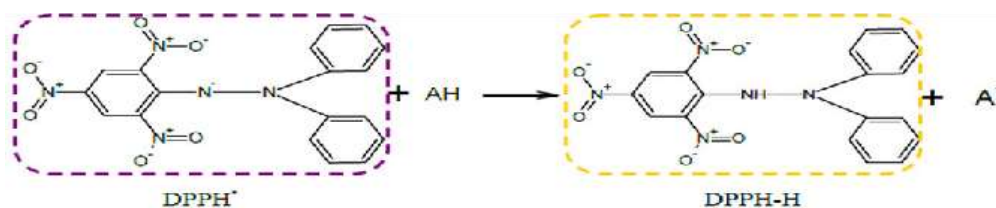
Une courbe d'étalonnage est réalisée en utilisant, un standard étalon, la catéchine, à différentes concentrations et pratiquée dans les mêmes conditions opératoires que celles des échantillons, servira à la quantification des flavonoïdes.

4.3. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl- 1-picrylhydrazyl)

4.3.1. Principe de la méthode

Le DPPH (2,2 diphényl-1-picrylhydrazyl) est généralement le substrat le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicale libre et la simplicité de l'analyse. La méthode de DPPH présente plusieurs avantages du fait qu'elle soit indépendante, simple et rapide. Le test consiste à mettre le radical DPPH (de

couleur violette) en présence des molécules dites « antioxydantes » afin de mesurer leur capacité à réduire ce radical (Figure 5). La forme réduite (de couleur jaune) n'absorbe plus, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance à cette longueur d'onde (Haddouchi *et al.*, 2016).



Ou AH est un composé antioxydant capable de céder un H^+ au radical DPPH.

Figure 5: Forme réduite du radical DPPH (Haddouchi, *et al.*, 2016)

4.3.2. Mode opératoire

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

À différentes concentrations, 50 μL de chaque extrait sont ajoutés à 1950 μL d'une solution méthanolique de DPPH. Le mélange est soumis à une agitation au vortex, Après incubation à l'obscurité pendant 30 minutes et à la température ambiante. La lecture des absorbances est effectuée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre

Le blanc est représenté par le solvant d'extraction, et 1950 μL de la solution méthanolique de DPPH

Le pouvoir anti-radicalaire vis-à-vis le DPPH* est exprimé en pourcentage d'inhibition du radical, selon la formule suivante :

$$\text{PI}\% = \left[\left(\frac{\text{Abs T} - \text{Abs Ech}}{\text{Abs T}} \right) \right] \times 100$$

où :

Abs témoin : Absorbance de témoin après 30 min

Abs échantillon : Absorbance d'extrait après 30 min

Une courbe d'étalonnage réalisée par un standard étalon (BHA, BHT, Trolox, AAS) à différentes concentrations et pratiquée dans les mêmes conditions opératoires que celles des échantillons servira à la quantification de l'activité antioxydante.

4.4. Inhibition du radical ABTS

4.4.1. Principe de la méthode

L'ABTS, L'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique), est un radical libre et stable très utilisé pour l'évaluation du pouvoir antioxydant des fluides biologiques, des mélanges complexes ou bien des composés purs. Ce radical est capable de réagir avec des antioxydants classiques de type phénols et thiols mais aussi avec tout composé donneur d'hydrogène ou d'électron (Rice-Evans et Miller, 1994 ; Rice-Evans *et al.*, 1995).

La concentration de ce radical peut être déterminée en mesurant l'absorbance à la longueur d'onde appropriée. L'addition d'un antioxydant à une solution de ce cation radicalaire entraîne la réduction de ce radical et une diminution de l'absorbance mesurable à 734 nm.

4.4.2. Mode opératoire

L'activité anti-radicalaire envers le radical ABTS est mesurée selon la méthode de Re *et al.*, (1998). L'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) est un cation radicalaire facilement formé par oxydation en présence de persulfate de potassium pour donner une solution colorée en vert-bleu (Figure 6)

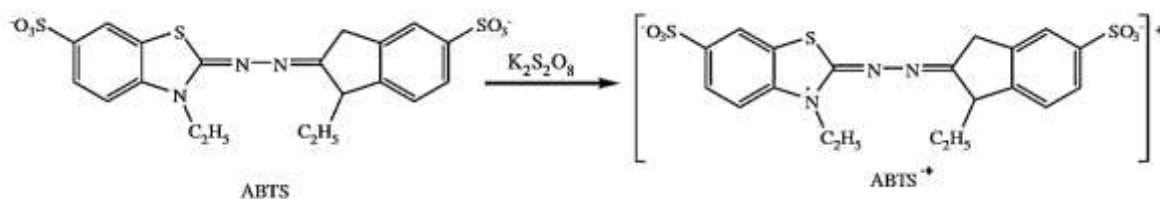


Figure 6 : Oxydation de l'ABTS par le persulfate de potassium et génération de ABTS+• (Gülçin, 2012).

Le cation radicalaire ABTS+• est généré en mélangeant un volume de la solution aqueuse d'ABTS (7mM) avec le même volume de persulfate de potassium à 2,45 mM (concentration finale dans le mélange), le tout est conservé à l'abri de la lumière et à 4 °C durant 16 h avant l'utilisation. La solution obtenue est diluée avec le méthanol pour obtenir une absorbance de $0,7 \pm 0,020$ à 734 nm.

L'activité de balayage du radical ABTS a été mesurée selon le protocole décrit par Re *et al.*, (1999). 20ul de chaque extrait et 2ml de la solution méthanolique à ABTS ($A=0.7$) sont introduit dans des tubes .Après agitation avec vortex, les tubes sont placés à l'obscurité à température ambiante pendant 5 minutes. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 734 nm. Les résultats peuvent être exprimés en tant qu'activité anti-radicalaire où l'inhibition des radicaux libres en pourcentages (I %) en utilisant la formule suivante :

$$PI\% = \left[\left(\frac{\text{Abs T} - \text{Abs Ech}}{\text{Abs T}} \right) \right] \times 10$$

où :

Abs témoin : Absorbance de témoin après 5 min

Abs échantillon : Absorbance d'extrait après 5 min

Une courbe d'étalonnage réalisée par un standard étalon (BHA, BHT, Trolox, AAS) à différentes concentrations et pratiquée dans les mêmes conditions opératoires que celles des échantillons et servira à la quantification de l'activité antioxydante.

4.5. Etude du pouvoir réducteur

4.5.1. Principe de la méthode

La présence d'un composé réducteur dans les échantillons entraîne la réduction du fer ferrique (Fe^{3+}) du complexe ferricyanure en fer ferreux (Fe^{2+}). Dans un milieu acidifié par l'acide trichloracétique, cette réaction se traduit par le virage de la couleur jaune du Ferricyanure de potassium vers la couleur bleu verte, dont l'intensité dépend du pouvoir réducteur (Li *et al.*, 2009).

4.5.2. Mode opératoire

Le pouvoir réducteur de nos deux extraits est estimé par la méthode décrite par Kaur *et al.*, (2006). Un volume de 500 μl de l'extrait à différentes dilution a été mélangé avec 1250 μl de tampon phosphate (pH 6.6, 0.2M), 1250 μl du ferricyanure de potassium (1%) et 1250 μl du Trichloracétique (10%). Le mélange a été incubé au bain-Marie à 50°C pendant 20 minutes. Après incubation, 1ml d'eau distillée est ajoutée à 1ml du mélange, ainsi que 200 μl de Chlorure ferrique (FeCl_3) (0.1%). Après 30 minutes à l'obscurité, les absorbances sont enregistrées à 700nm.

Le blanc est préparé en parallèle. Présenter par le solvant d'extraction en suivant le même protocole.

Résultats et Discussions

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Mycologie de l'université A. Mira de Bejaia durant la période allant du 01/02/2017 au 30/04/2017.

Dans ce qui suit, seront abordés les résultats et la discussion des principales parties de ce travail relatives à l'étude des caractères morphologiques des souches d'actinobactéries *Streptomyces* sp. D1 et *Streptomyces* sp. D2 ainsi que la mise en évidence de leurs activités antimicrobienne et antioxydante respectives.

1. Etude des caractères morphologiques des souches d'actinobactéries D1 et D2.

1.1. Caractères macromorphologiques

Les propriétés culturales des deux isolats ont été cultivées sur sept milieux de cultures. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 3 ci-dessous.

Tableau III: Caractéristiques macromorphologiques des souches D1 et D2 après 21 jours d'incubation sur les différents milieux de culture à 28°C.

| Caractère Souches | Croissance | Couleur du mycélium aérien (MA) | Couleur du mycélium du substrat | Production de pigments diffusibles | Aspect des colonies | |
|---------------------|------------|---------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|--|-------------------------------------|
| D1 (SCA 50%) | ++ | Marron à contour blanc | marron | + marron | Colonies de taille moyenne, plates | |
| D2 (Gausse) | ++ | Blanc avec une teinte violet | Rose violet | + violet | Petite colonies bombées, d'aspect duveteux | |
| ISP1 | D1 | ++ | Blanc crème | Jaune clair | - | Colonies rugueuses |
| | D2 | ++ | Gris clair | Marron clair | - | Colonies bombées, d'aspect duveteux |
| ISP2 | D1 | ++ | Blanc crème | Jaune clair | - | Colonies rugueuses |
| | D2 | | Gris violacé | Marron clair | - | Colonies bombées, d'aspect duveteux |
| ISP3 | D1 | ++ | Beige | Jaune clair | - | Colonies rugueuses |
| | D2 | ++ | Gris clair | Marron clair | - | Colonies bombées, d'aspect duveteux |
| ISP4 | D1 | ++ | Blanc crème | Jaune clair | - | Colonies lisses à aspect de craie |
| | D2 | ++ | Gris violacé | Marron clair | - | Colonies bombées, d'aspect duveteux |

| | | | | | | |
|------|----|----|--------------|--------------|----------|-------------------------------------|
| ISP5 | D1 | ++ | Vert-crème | Gris marron | - | Colonies d'aspect poudreux |
| | D2 | ++ | Gris-clair | Marron clair | - | Colonies bombées, d'aspect duveteux |
| ISP6 | D1 | + | Vert-crème | Gris marron | + marron | Colonies rugueuses |
| | D2 | ++ | Gris-violacé | Marron clair | + violet | Colonies bombées, d'aspect duveteux |

++ Très bonne croissance ; + croissance moyenne - Absence de production de pigments

Les deux souches D1 et D2 présentent une excellente croissance sur pratiquement tous les milieux utilisés. Les couleurs des mycéliums aériens et du substrat semblent variables en fonction du milieu de culture considéré. En effet, pour la souche D1, la couleur des mycéliums aériens varie du blanc crème au vert, tandis que les mycéliums du substrat semblent varier du jaune clair au marron clair. Par ailleurs, les colonies sont de taille moyenne, plates et d'aspect de craie (Figure 7A).

La souche D2 présente un mycélium aérien de couleur blanc violacé avec un mycélium de substrat de couleur jaune foncé sur le milieu Gausse. Toutefois, des différences ont été observées sur les milieux ISP. En effet, les mycéliums aériens arborent des teintes allant du gris clair au gris violacé. Les mycéliums du substrat ont présenté une couleur marron clair sur la totalité des milieux ISP, alors que les colonies sont d'aspect cotonneux et bombées (Figure 7B) sur tous les milieux étudiés.

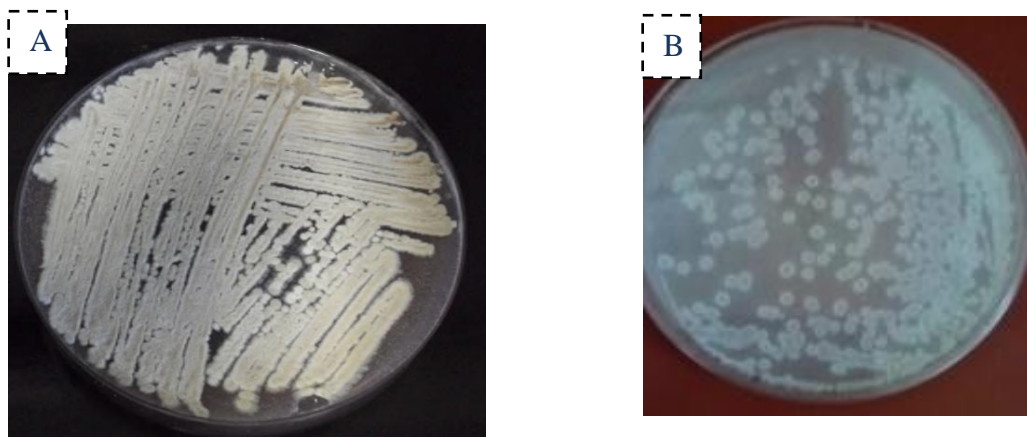


Figure 7 : Macromorphologie des souches D1 et D2 sur les milieux SCA (50%) et Gausse après 14 jours d'incubation à 28°C.

1.2 Etude des caractères micromorphologique

Les boîtes de Pétri contenant les milieux de culture SCA (50%) et Gausse ayant servi pour l'étude macromorphologique des deux isolats ont également fait objet d'une étude micromorphologique. Les colonies sont directement observées sur boîtes de Pétri sous microscope optique à l'objectif x10 après 14 jours d'incubation à 28°C. La figure 8 suivante illustre la micromorphologies des deux souches observées au microscope optique.

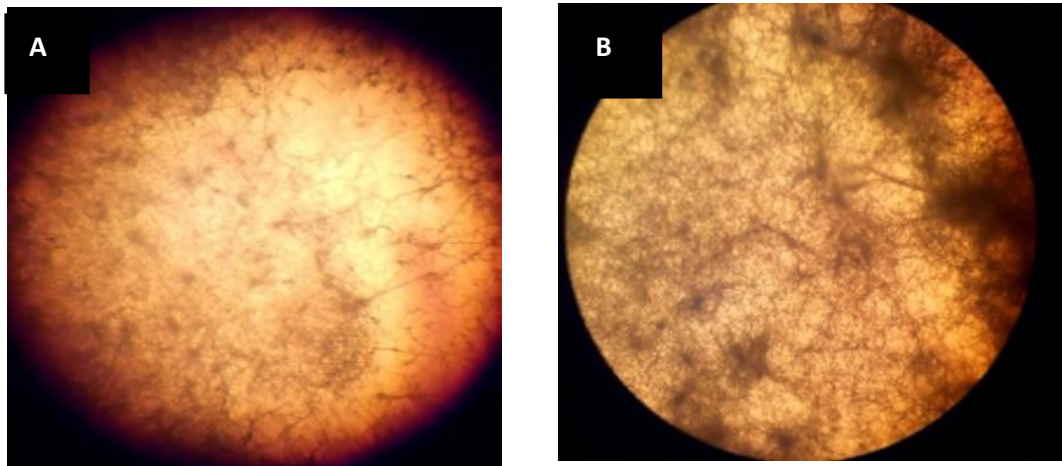


Figure 8: Observation au microscope optique des mycéliums aériens des souches. A) D1 et B) D2, cultivées pendant 14 jours à 28°C sur les milieux SCA (50%) et Gausse.

Les filaments des mycéliums aériens de la souche D1 sont ramifiés, droits non septés présentant des chaînes de spores immobiles. D'autre part les filaments de la souche D2 sont non cloisonnés et fins avec une longue chaîne de spores qui se fragmentent en spores sphériques. Toutes autres les sporophores, les sporanges, les spores mobiles, les synnemata et les sclérotés sont absents chez tous les isolats.

II. Production et extraction des molécules actives par fermentation solide

L'extraction des molécules actives produites par les 2 isolats a permis l'obtention de 2 extraits bruts, comme précisé dans le tableau 4, reconstitués dans le méthanol ou l'acétate d'éthyle en fonction de la solubilité des composés produits.

Tableau IV: Concentrations des extraits bruts des 2 isolats étudiés obtenus après macération

| Extrait | Solvant de reconstitution | Couleur | Concentration (mg/ml) |
|---------|---------------------------|---------|-----------------------|
| D1 | méthanol | Marron | 13,14 |
| D2 | Acétate d'éthyle | Rose | 9,1 |

III. Etude de l'activité antagoniste des extraits bruts

Dans le but d'étudier la capacité des extraits bruts à inhiber la croissance de germes cibles, un test d'antagonisme basé sur la méthode des puits a été réalisé. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure.

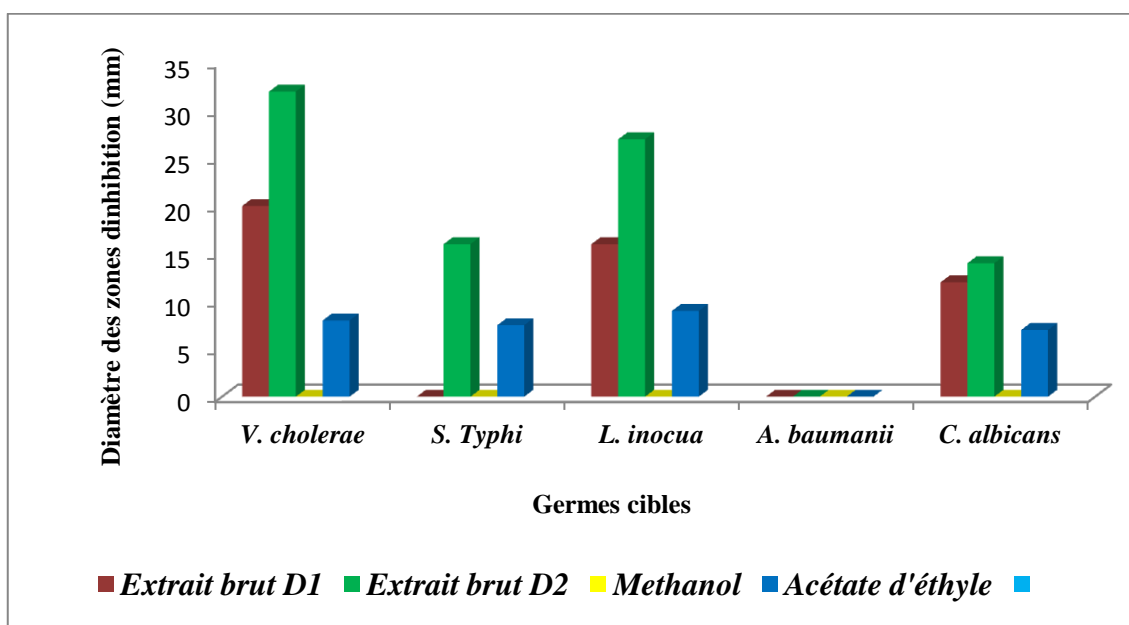


Figure 9 : Activité antagoniste des extraits bruts des isolats D1 et D2 à l'égard de 5 germes cibles.

Les résultats montrent clairement que les activités antagonistes des 2 extraits bruts repris dans du méthanol ou de l'acétate d'éthyle des souches d'actinobactéries diffère d'un germe cible à un autre et d'un extrait à un autre. De plus, les deux extraits bruts ont présenté un effet antagoniste aussi bien à l'encontre de bactéries à Gram positif que Gram négatif, mais également à l'égard de la levure pathogène *C. albicans*.

En effet, les 2 extraits bruts présentent un bon antagonisme vis-à-vis des 5 souches microbiennes testées. Toutefois l'extrait brut de l'isolat D1 n'a manifesté aucune activité à l'encontre de *Salmonella Typhi* et *A. baumannii*. Par ailleurs, une activité plus importante a été enregistrée à l'égard de *Vibrio cholerae* où le diamètre de la zone d'inhibition a atteint 20mm. D'autre part, l'extrait brut de l'isolat D2 a présenté des zones d'inhibition assez importantes. En effet, *V. cholerae* et *L. innocua* ont présenté une sensibilité enregistrant des diamètres de 32 et 27 mm respectivement. *Candida albicans* se révèle être plus résistante affichant un diamètre d'inhibition de 14 mm. Cependant, aucun effet antagoniste n'a été observé vis-à-vis de *A. baumannii*.

D'après les résultats obtenus, les diamètres des zones d'inhibitions diffèrent d'une bactérie à une autre et d'un extrait à un autre. Ce qui peut être expliqué par la variation de la composition chimique des molécules produites par ces deux isolats étudiés (Boudjouref, 2011).

IV. Dosage des composés phénoliques

4.1. Polyphénols Totaux

Le dosage des polyphénols totaux présents dans les deux extraits testés a été réalisé selon la méthode au Folin-Ciocalteu (Junaid *et al.*, 2013). Les composés phénoliques réduisent le réactif de Folin-Ciocalteu en donnant une coloration bleu proportionnelle au taux de composés phénoliques présents dans le milieu réactionnel. Une courbe d'étalonnage a été établie en utilisant l'acide gallique comme standard (Annexe III).

Les résultats de ce dosage sont illustrés dans la figure suivante

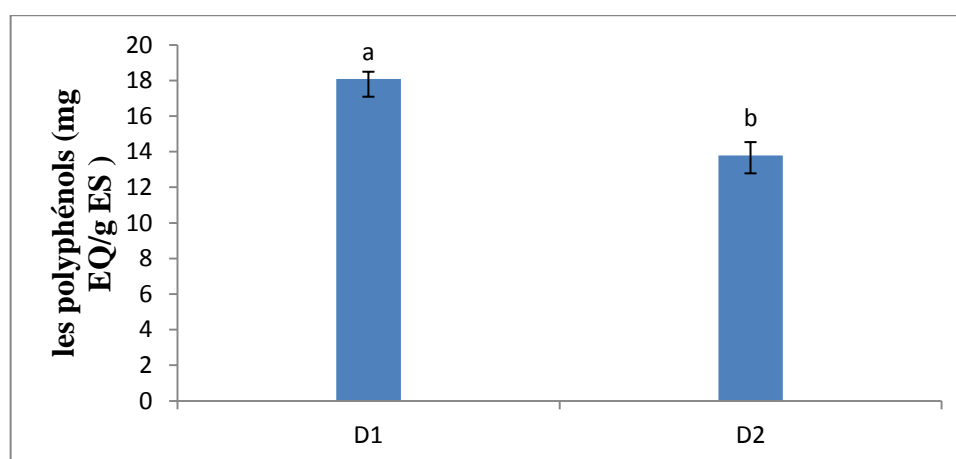


Figure 10 : Teneur en polyphénols des deux extraits bruts des souches de *Streptomyces* D1 et D2.

Les valeurs qui présentent les différentes lettres présentent une différence significative ($p < 0.05$).

Les barres verticales représentent les écarts-types.

La figure 10 montre que la teneur en polyphénols de la souche D2 qui est de $13,78 \pm 0,75$ mg EAG/g est relativement faible par rapport à la teneur en composés phénoliques de la souche D1 qui est de $18,03 \pm 0,40$ mg EAG /g. De plus, le test de Student a révélé l'existence d'une différence significative entre les teneurs en polyphénols des deux souches à $P < 0.05$. Cela pourrait être dû aux différents biotopes à partir desquels les deux souches sont originaires : origine marine pour D1 et tellurique pour D2. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Avilala *et al.* (2013) qui ont montré des teneurs en phénols totaux proches des valeurs de la souche D2, variant entre 13.62 ± 1.12 et 14.37 ± 1.47 mg EAG /g.

De plus les teneurs obtenues en polyphénols totaux des deux extraits dans l'acétate d'éthyle sont comparables à celle apportés par Lertcanawanichakul *et al.* (2014) sur les composés phénoliques de trois extraits de *Streptomyces*. En effet, leur étude a montré des teneurs en phénols totaux variables selon le type de solvant utilisé pour l'extraction. Ces teneurs sont de l'ordre de 0.24 ± 0.02 mg EAG /g d'ES pour la souche extraite avec l'acétate d'éthyle, 0.00 ± 0.00 mg/g d'ES pour les deux souches extraites avec le méthanol et l'hexane. Ces résultats ont prouvé que l'acétate d'éthyle est le meilleur solvant d'extraction des composés phénoliques pour les souches de *Streptomyces*.

Dans une autre étude menée par le même auteur en 2015, sur une souche de *Streptomyces lydicus*, de faibles teneurs en polyphénols ont été rapportées et estimées à 0.18 ± 0.01 mg EAG /g d'ES qui sont largement inférieures à celles obtenus avec nos extraits bruts.

Ces résultats prouvent et démontrent la richesse et la diversité des métabolites secondaires produits par nos deux souches D1 et D2.

4.2. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont été dosés par la méthode de Bahorun et al. (1996) au trichlorure d'aluminium en utilisant comme standard la quercétine (Annexe III). La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait sec (mg E.Q/g E.S d'extrait) et les résultats obtenus sont présentés dans la figure 11

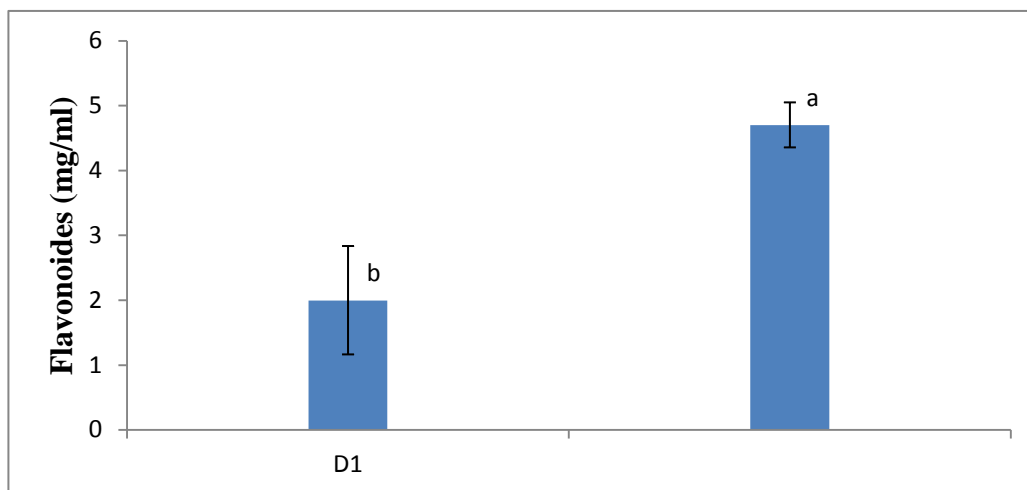


Figure 11 : Teneur moyenne en flavonoïdes des deux extraits des souches De *Streptomyces* D1 et D2.

- ❖ Les valeurs qui présentent les différentes lettres présentent une différence significative ($p < 0.05$).
- ❖ Les barres verticales représentent les écarts-types.

D'après les résultats illustrés en figure 11, il est clairement remarqué que l'extrait de la souche D2 est plus riche en flavonoïdes que l'extrait de la souche D1 avec des teneurs de 4.7 et 1.99 mg E.Q/g E, respectivement.

L'étude statistique montre l'existence d'une différence significative ($p < 0.05$) entre les teneurs en flavonoïdes des deux souches étudiées. Cette différence peut être due à l'origine des deux souches (D1 marine) et (D2 terrestre).

La récente étude menée par Tan et al., (2017), sur un extrait méthanolique reconstitué dans du diméthyle sulfoxyde DMSO d'une souche de *Streptomyces* sp. MUM212 isolée d'un sol de mangrove en Indonésie, a rapporté l'absence totale de ces composés dans l'extrait brut

étudié. par contre nos deux extraits présentent une teneur en flavonoïdes faible.

5. Etude de l'activité antioxydante

Suite aux recherches bibliographiques effectuées et en prenant en considération la complexité des processus d'oxydation, on a pu caractériser le potentiel antioxydant de nos deux échantillons en combinant les résultats obtenus sur trois tests différents et complémentaires. Ces derniers sont des tests chimiques et leur principe repose sur un changement de couleur qui a été suivi par une lecture de l'absorbance à des longueurs d'ondes spécifiques pour chaque radicale.

5.1. Activité scavenging du radical DPPH

La méthode du DPPH est indépendante de la polarité du substrat. Cette méthode est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène ou un électron. La forme non radicalaire DPPH-H est formée.

Les pourcentages d'inhibitions des deux extraits et les standards sont indiqués dans la figure 12.

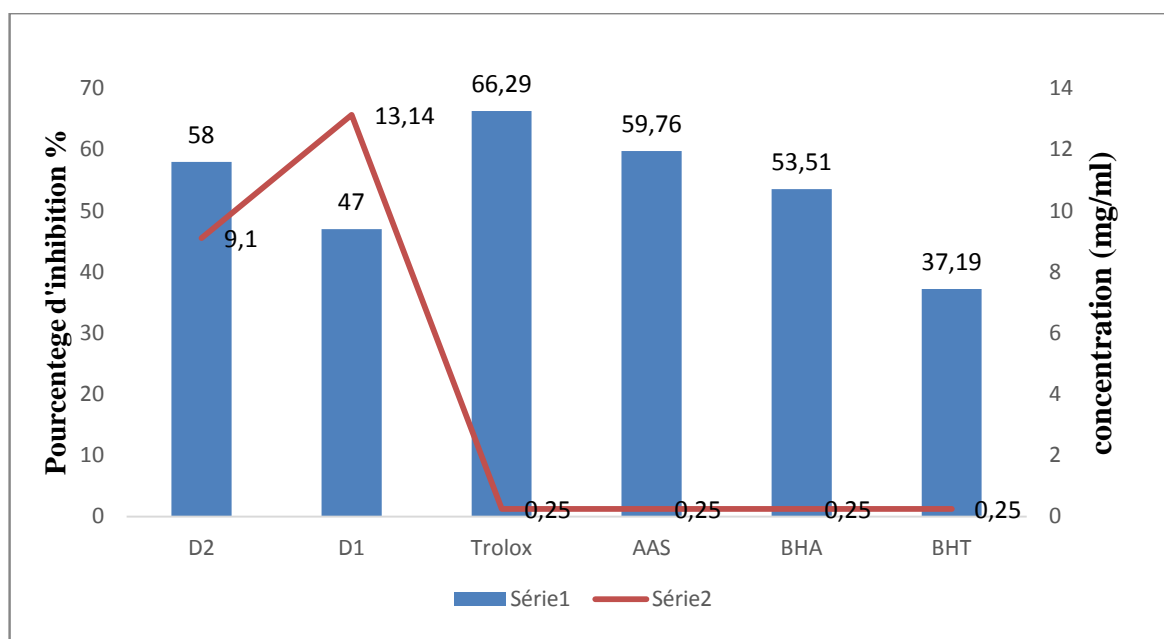


Figure 12: Pourcentage du pouvoir inhibiteur en fonction de la concentration de chaque extrait et standard.

Les résultats illustrés dans la figure 12 indiquent que malgré la faible concentration de l'extrait D2 par rapport à l'extrait D1, l'extrait D2 présente un plus grand effet inhibiteur que l'extrait D1. En effet, pour une concentration de 9,1mg/ml, l'extrait D2 donne un taux d'inhibition de 58% alors que pour l'extrait D1, le pourcentage d'inhibition enregistré est de 47,55% pour une concentration de 13,14 mg/ml.

A la même concentration pour les standards, le Trolox a montré un pourcentage d'inhibition de 66.29 suivi par l'acide ascorbique 59,76 % puis le BHA 53,51% et en dernier BHT 37,19%.

Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction des concentrations des deux extraits testés est illustré dans les figures 13 et 14 suivantes.

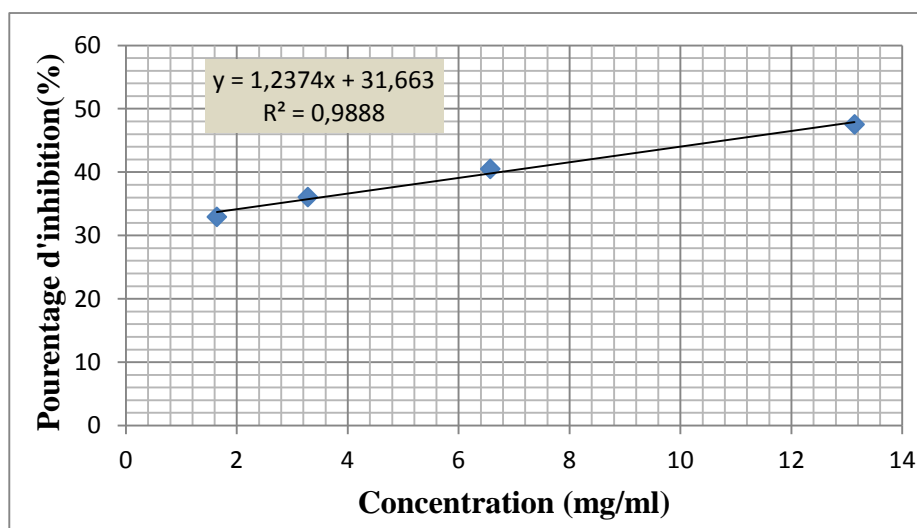


Figure 13 : Variation de l'inhibition du radical DPPH en fonction des concentrations de l'extrait D1.

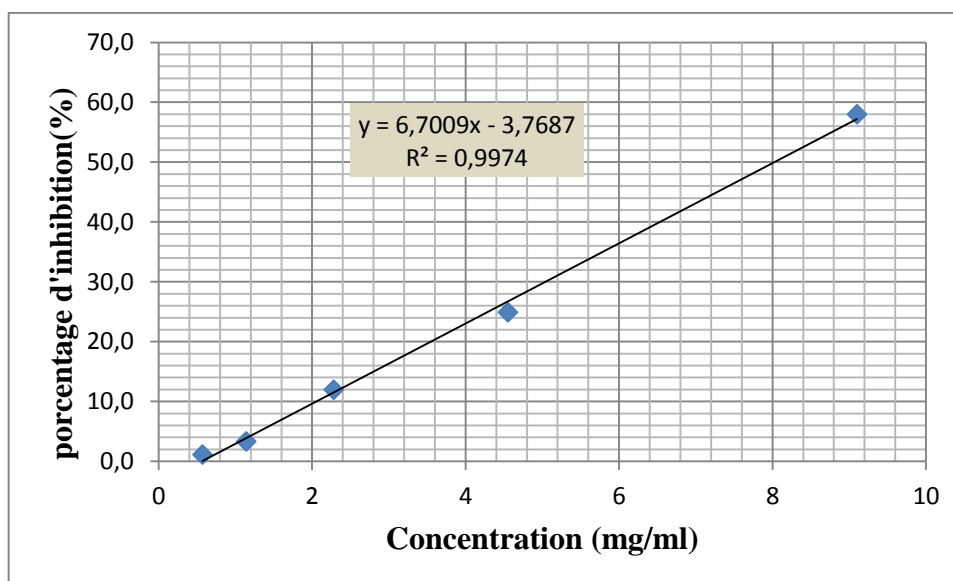


Figure 14 : Variation de l'inhibition du radical DPPH en fonction des concentrations de l'extrait D2.

D'après les résultats présentés dans les figures 13 et 14, il est clair que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration aussi bien pour les standards (l'acide ascorbique, BHA, Trolox, BHT) (Annexe IV) que pour les deux extraits bruts D1 et D2. Bien que l'activité antioxydante soit faible par rapport aux standards, il est évident que nos deux extraits soient en mesure de céder des hydrogènes. Cette aptitude leur confère la possibilité d'être utilisés comme réducteurs de radicaux libres agissant comme antioxydants primaires (Chung *et al.*, 2006)

5.2. Piégeage du radical ABTS

Afin de valider les résultats d'efficacité antioxydante des deux extraits d'actinobactéries obtenus précédemment par le test anti radicalaire du DPPH. Un deuxième test basé sur la capacité de piégeage du proton du radical cationique ABTS^{*+} a été réalisé.

L'activité antioxydante des deux extraits est déduite par leur capacité à inhiber le radical ABTS*, et elle était comparée à des antioxydants de référence BHA, BHT et Trolox (Annexe V).

Le pourcentage d'inhibition du radical en fonction des concentrations des deux extraits testés est illustré en (Figure 15 et 16).

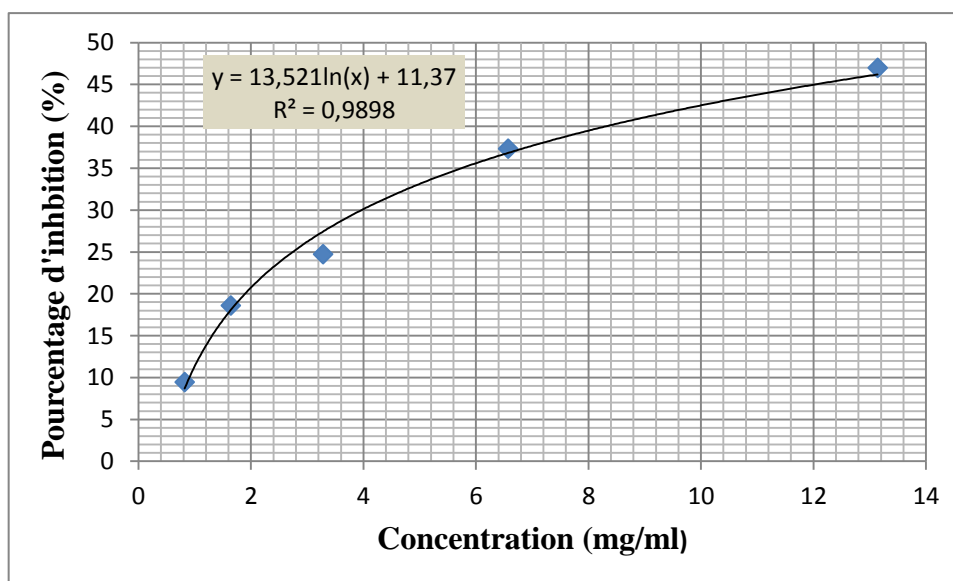


Figure 15 : Variation de l'inhibition de l'ABTS* en fonction des concentrations de l'extrait D1.

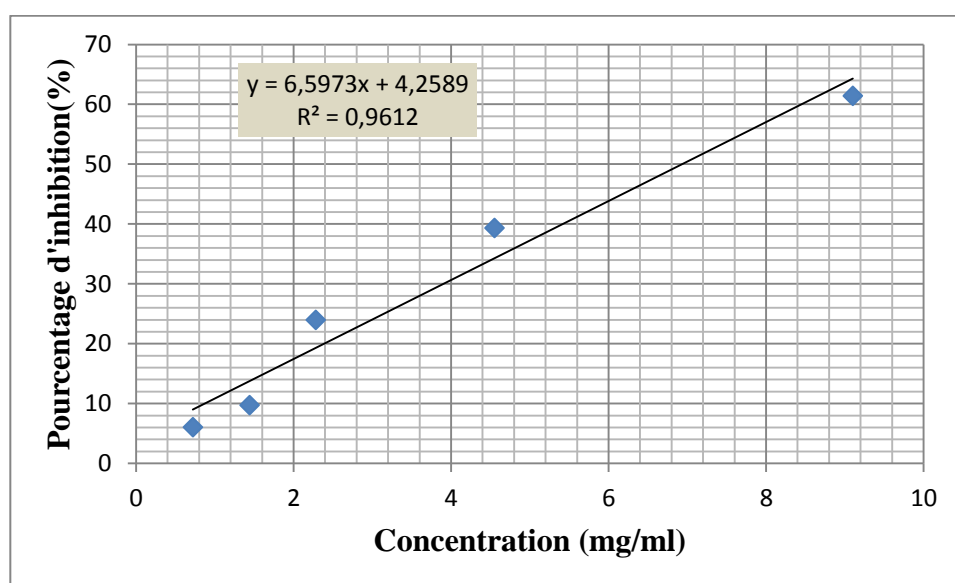


Figure 16 : Variation de l'inhibition de l'ABTS* en fonction des concentrations de l'extrait D2

Il en découle que l'activité anti-radicalaire de l'ABTS coïncide avec les concentrations de nos deux échantillons. On remarque que pour une concentration de 9,1mg/ml de l'extrait D2 donne un taux d'inhibition de 61,44% et pour la souche D1,est obtenue à une concentration de 13,14mg/ml un pourcentage d'inhibition de 47%, tout comme pour le DPPH, ainsi l'inhibition dépend de la qualité et non de la quantité de polyphénols.

5.3. Les IC_{50} sur les radicaux ABTS et DPPH

La capacité antioxydante des différents extraits a été déterminée à partir de l' IC_{50} . C'est la concentration nécessaire pour réduire 50 % du radical libre (DPPH, ABTS). Plus la valeur d' IC_{50} est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande (Hebi et Eddouks, 2016).

A partir des courbes (figure 13, 14, 15, 16), les IC_{50} sont déterminés pour les deux tests DPPH et ABTS, des deux extraits et les standards. Les valeurs des IC_{50} sont représentées dans le tableau 5.

Tableau 5: IC_{50} (en mg /ml) des extraits testés et des antioxydants de références pour les deux tests DPPH et ABTS.

| IC ₅₀ Extraits et standards | IC ₅₀ (mg/ml) DPPH | IC ₅₀ (mg/ml) ABTS* |
|--|----------------------------------|-----------------------------------|
| D1 | 14.97± 2.48c | 17.42±1.8c |
| D2 | 8± 0.10b | 6,14±0,16b |
| Acide ascorbique | 0.2±0.00a | 0.2±0.00 a |
| Trolox | 0.18±0.002a | 0,016±0,01a |
| BHA | 0.26±0.00a | 0,43±0,01a |
| BHT | 0.365±0.007a | 0.483±0.01a |

D'après les résultats présentés dans le tableau 5, que ce soit pour le radical DPPH ou ABTS* les IC50 obtenu pour les standards sont largement inférieurs à ceux des extraits des deux souches D1 et D2, et donc ont une activité antioxydante très élevée ($p < 0.05$), aussi, l'extrait de la souche D2 présente un IC50 de l'ordre de 14.97 ± 2.48 mg/ml largement inférieure à celui de l'extrait D1 ($08 \pm 0,0$ mg /ml). Les deux extraits ont présenté une différence significative ($p < 0.05$). Il est ainsi possible de classer les IC50 de nos extraits et des standards pour les deux tests DPPH et ABTS* comme suit :

IC₅₀ Trolox > IC₅₀ acide ascorbique > IC₅₀ BHA > IC₅₀ BHT > IC₅₀ D2 > IC₅₀ D1.

L'effet inhibiteur des deux extraits testées est moins important que l'effet inhibiteur puissant des trois standards, cela est dû essentiellement à la pureté de ces derniers. Des résultats similaires ont été rapporté par d'autres auteurs (Kekuda et al., 2010 ; Manasa et al., 2012 ; Priya et al., 2012 ; Thenmozhi et Kannabiran, 2012 ; Gautham *et al* 2013) .

La teneur en polyphénol de l'extrait D1 est supérieure à celle de l'extrait D2 mais ce dernier a montré une activité antioxydante plus importante, cela est probablement due à la qualité des polyphénols de l'extrait D2. En effet, l'effet antioxydant n'est pas seulement dose-dépendant mais également structure-dépendant (Rodriguez-Bernaldo *et al.*, 2010). Certains travaux ont montré une bonne corrélation entre les IC50 et la teneur en polyphénols et en flavonoïdes, à l'opposé d'autre études n'ont pas établie cette corrélation (Athamena *et al.*, 2010 ; Mariod *et al.*, 2010), ce qui explique nos résultats. Ce constat peut également être expliqué par la production d'autres molécules responsables de cette activité aux différents stades de croissance de la souche étudiée (Lertcanawanichakul *et al.*, 2014).

Par ailleurs, nous remarquons également que les valeurs obtenus par le radical ABTS sont très proches de celles enregistrées pour le radical DPPH. Ce qui signifie que nos deux extraits possèdent la même activité envers les radicaux libres. Ces résultats confirment la performance de nos extraits.

5.4. Evaluation du pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur peut être évalué par plusieurs tests à savoir la réduction de chlorure ferrique (Sousa *et al*, 2008; Sahreen *et al.*, 2010), qui est l'aptitude des antioxydants présents dans l'extrait à réduire le fer ferrique du complexe ferricyanure (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}) dans un milieu acidifié par le TCA. La forme réduite de ce complexe donne une couleur verte qui est proportionnelle au pouvoir réducteur de l'extrait (Odabasoglu *et al.*, 2004). Les résultats obtenus sont présentés dans les figures (17 et 18)

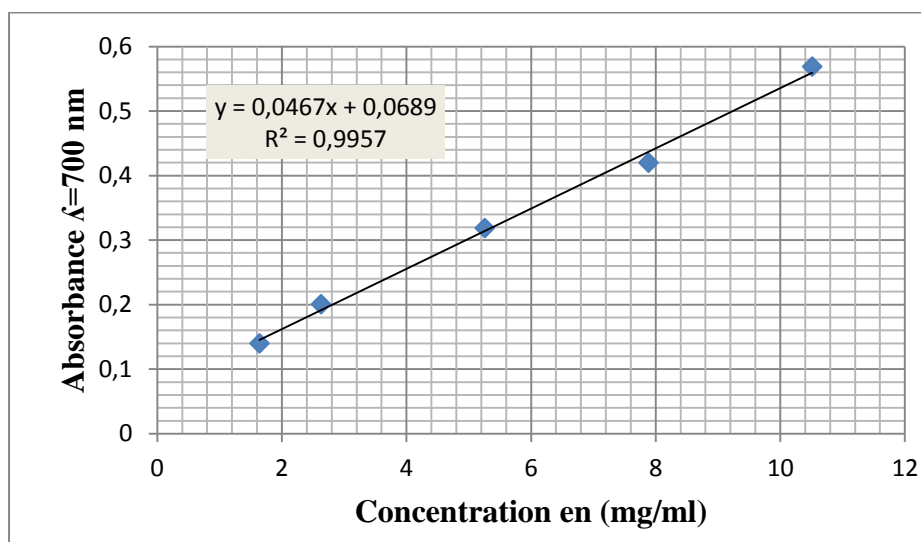


Figure 17 : variation de l'absorbance en fonction de la concentration de l'extrait D1.

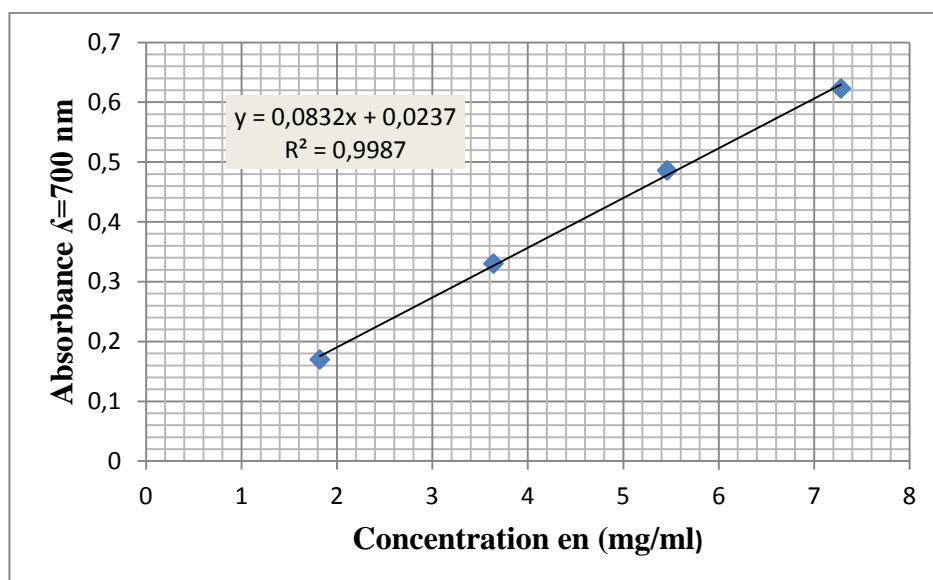


Figure 18 : Variation de l'absorbance en fonction de la concentration de l'extrait D2.

D'après les résultats de la présente étude, on remarque que plus la concentration de nos échantillons est élevée plus la capacité réductrice augmente (figure 9 et 10), on constate la même chose pour les standards (Annexe VI).

À partir des équations des régressions linéaires des courbes précédentes on a déduit l'IC50 qui est représenté dans la figure (19).

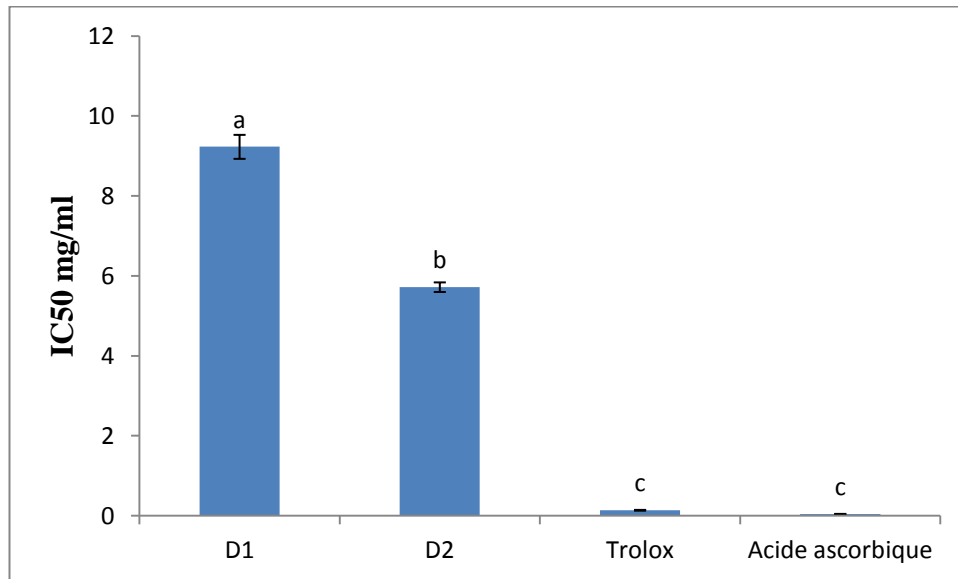


Figure 19 : IC50 du pouvoir réducteur des deux extraits et des standards (acide ascorbique, Trolox).

Les valeurs qui présentent les différentes lettres présentent une différence significative ($p < 0.05$).

Les barres verticales représentent les écarts-types.

Il en résulte par comparaison entre nos extraits et les standards acide ascorbique et Trolox que ces derniers présentent la meilleure activité réductrice avec un IC50 égale à $0.04 \pm 0,01$ mg/ml, $0.14 \pm 0,01$ mg/ml respectivement. En outre la comparaison entre les deux extraits a révélé que l'extrait D2 est le plus actif ($IC_{50} = 9.23 \pm 0,014$ mg/ml). Une différence significative ($P < 0.05$) est enregistrée pour les deux échantillons.

La transformation du Fe^{+3} à Fe^{+2} en présence de concentrations variables de nos deux extraits a été étudiée afin d'évaluer leur pouvoir réducteur. Dans ce dosage, la présence de réducteurs (antioxydants) dans l'extrait entraînerait la réduction de Fe^{+3} en Fe^{+2} en faisant un don d'électron. La quantité de Fe^{+2} peut être surveillée en mesurant la formation de la couleur verte à 700 nm. L'augmentation de l'absorbance en fonction de la concentration d'extrait indique une augmentation de la capacité réductrice (Chung *et al.*, 2006). La capacité de réduction d'un composé peut servir d'indicateur significatif de son potentiel d'activité antioxydante (Gunda *et al.*, 2013). Dans la présente étude, nous avons constaté que le pouvoir réducteur des deux extraits et des standards a augmenté avec l'augmentation de leurs concentrations. Bien que le pouvoir réducteur de l'extrait soit inférieur à celui de l'acide ascorbique, il est évident que l'extrait possède un potentiel réducteur pourrait servir de donneurs d'électrons, mettant fin aux réactions radicalaires en chaîne (Chung, 2006).

Des observations similaires ont été faites par des études antérieures de Kekuda *et al.*, (2010) ; Manasa *et al.*, (2012) ; Thenmozhi et Kannabiran., (2012) et Gautham *et al.*, (2013). Où les extraits ont affiché un potentiel de réduction plus faible.

Les actinobactéries peuvent produire différents types de composés avec des propriétés antioxydantes, antitumorales, anti-inflammatoires, antibactériennes. Les antioxydants jouent un rôle important dans l'inhibition et le balayage des radicaux libres, offrant ainsi une protection aux humains contre diverses infections et maladies dégénératives.

L'augmentation des radicaux libres ou une diminution de l'antioxydant peut entraîner un stress oxydatif, ce qui signifie l'identification d'agents antioxydants naturels. La recherche actuelle dirigée vers la mise en évidence des antioxydants naturels des plantes et des microorganismes.

Les objectifs visés par ce travail sont : l'étude de l'aspect morphologique des souches d'actinobactéries, d'origine marine et tellurique, l'extraction des molécules bioactives synthétisées, la mise en évidence de l'activité antimicrobienne ainsi que l'activité antioxydante à travers le dosage des polyphénols et flavonoïdes.

L'étude morphologique met en relief différents caractères macro et micromorphologiques intéressants des deux isolats. La production et l'extraction des molécules bioactives a permis d'obtenir des extraits bruts à différentes concentrations, c'est une étape cruciale qui nous a permis de réaliser les différents tests.

Au cours de cette étude nous avons réalisé également un test d'antagonisme vis-à-vis de cinq souches microbiennes (*L.inocua*, *S.Typhi*, *V.cholerae*, *A.baumani*, and *C.albicans*). Les résultats ont montré que les deux extraits bruts testés possèdent une action antagoniste assez importante sur la plupart des germes cibles espèces microbienne testées.

Quantitativement, l'évaluation en contenu des polyphénols totaux en adoptant la méthode de Folin-Ciocalteu révèle la présence des quantités moyennement importantes en polyphénols. les flavonoïdes ont été dosé par la méthode d' $AlCl_3$ qui nous permet de conclure que les deux extraits étudiés contiennent une faible quantité en flavonoïdes.

L'activité antioxydante des deux extraits bruts *Streptomyces sp D1* et *Streptomyces D2* a été déterminé par la méthode du piégeage des radicaux de DPPH, ABTS et par la méthode de la réduction du fer dont les résultats montrent que ces extraits possèdent une bonne activité, ainsi il nous ai possible de conclure que les souches étudiées produisent des molécules.

Les résultats obtenus à travers cette étude semblent prometteurs et nous incitent à poursuivre nos efforts de recherche dans cette thématique afin de sélectionner des espèces d'actinobactéries dotées d'activités biologiques intéressantes.

Toutefois, Il serait souhaitable de compléter et d'approfondir ce travail par :

- ✓ La purification et la caractérisation des extraits bruts dont le but d'identifier les molécules à l'origine de l'activité antioxydante.

*Références
Bibliographiques*

A

Adegboye. (2013). Babalola Actinomycetes: a yet inexhaustive source of bioactive secondary Metabolites M. F. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education A. Méndez-Vilas.

Anita Saini., Neeraj K., Aggarwal., Anuja Sharma., and Anita Yadav. (2015). Actinomycetes a Source of Lignocellulolytic Enzymes. Hindawi Publishing Corporation Enzyme Research, vol.15, no.1.

Avilala., janardhan., arthala., Praveen., kumar., buddolla., Viswanath., D.V.R., Saigopal., and Golla. (2013). inomynarasimh .Production of bioactive Compounds by actinomycetes and their antioxidant Properties, vol ID 217030, 8P.

B

Bahorun T., Gressier B., Troitin F., Brunete C., Dine T., Vasseur J., Gazin J. C., Pinkas M., Luycky M. et Gazin M. (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung*, vol 46, p 1086-1089.

Balagurunatha R., Radhakrishnon M., Somasundaram S.T. (2010). L-glutaminase Producing Actinomycetes from marine sediments-selective isolation, semi quantitative assay and characterization of potential strain. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, vol 4, p 698-705

Baniasadi F., Shahidi G.H., Karimi Nik A. (2009). In Vitro Petroleum Decomposition by Actinomycetes Isolated from Petroleum Contaminated Soils. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science*, vol 6, p 268-270.

Barlow .S.M. (1990). Toxicological aspects of antioxidants used as food additives. In: *Food antioxidants*, Hudson B.J.F. (ed.), Elsevier, Amsterdam. p 253-307.

Bérdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot*, vol 58, p 1–26.

Bérdy, J. (2012). Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *J. Antibiot*, vol 65, p 385–395.

Boizot N. et Charpentier J P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'Inra*, p 79-82.

Boudjouef. M. (2011). Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L. Thèse de magister. Université Ferhat Abbas, Sétif.

Boroujeni .M. E.,. Das .A., Prashanthi. K., Suryan. S., and Bhattacharya .S.(2012) Enzymatic screening and random amplified polymorphic DNA fingerprinting of soil *Streptomyces* isolated from Wayanad District in Kerala, India,Journal of Biological Sciences,vol 12, no.1, p. 43–50.

Branen AL et J Am Oil Chem Soc.(1975). Toxicology and biochemistry of butylatedhydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. Journal of the American Oil Chemists Society. p 52, 59-63.

c

Caffrey P., Lynch S., Flood E., Finnan S and Oliynyk M .(2001). Amphotericin biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: deductions from analysis of polyketide synthase and late genes.Chem Biol,vol 8, p 71–723.

Camacho AD., Martínez L., Valdés M., Ramírez-Saad H., Valenzuela R. (2014). Potencial d’algunos microorganismos en el compostaje de residuos sólidos. Terra Latinoamericana, vol 32,p 291–300.

Cassinelli G., Cotta E., D’Amico G., Della Bruna C., Grein A., Mazzoleni R., Ricciardi ML and Tintinelli R. (1970). Thiamycins, new anthelmintic and antiprotozoal antibiotics produced by Str185.

Chang HB., K im J. (2007).Antioxidant properties of dihydroherbimycin A from a newly isolated *Streptomyces* sp., Biotechnology Letters,vol 29,p 599-603.

Cerruti P. (1985). Prooxidant state and tumor promotion. Science; 22: 375-81.

Cheeseman KH, Slater TF.,(1993). An introduction to free radicals chemistry. Br Med Bull, vol 49, p481–93.

Cho JY., Kwon HC., Williams PG., Kauffman CA., Jensen PR and Fenical W.(2006). Actinofuranones A and B, polyketides from a marine derived bacterium related to the genus *Streptomyces* (Actinomycetales). J Nat Prod,vol 69, p 425–428.

Christelle Koechlin-Ramonatxo. (2006). Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases. Nutrition Clinique et métabolisme,vol 20,p 165–177

Chung Y., Chien C., Teng K., Chou S.(2006).Antioxidative and mutagenic properties of *Zanthoxylum ailanthoides* Sieb & zucc, Food Chemistry,vol 97, p 418-425.

Cláudia and Alvaro. (2004). Oxygen free radicals and exercise: mechanisms of synthesis and adaptation to the physical training.Rev Bras Med Esporte ,vol:10, N° 4

D

Davies KJ. (2000).Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*, vol 50,p 279–89.

Das S., Lyla P., Khan SA.(2006).Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives. *Curr Sci*, vol 90(10),p 1325–35.

Deng.Y et al. (2017). Recent Advances in Genetic Modification Systems for Actinobacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*,vol 101 (6),p 2217-2226.

Desjardin V.(2002). Réduction du chrome (VI) par la souche *Streptomyces thermocarboxydus* NH50 isolée à partir d'un sol pollué.Thèse de Doctorat en Sciences techniques du déchet. 247p

Demain AL., Fang A. (2000). The natural functions of secondary metabolites. In: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology: History of Modern Biotechnology I*,vol 69, p. 2–39, Fietcher A Ed. Berlin: Springer.

Demain A L., et Fang A. (2000).The Natural Functions of Secondary Metabolites. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol*,vol 69,p 1–39,

Di Carlo., Mascolo N., Izzo AA., et al. (1999).Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci* ,vol 65 (4),p 337-53.

E

Eida .M. F., Nagaoka .T., Wasaki.J., and Kouno .K. (2012). Isolation and characterization of cellulose-decomposing bacteria inhabiting sawdust and coffee residue composts,” *Microbes and Environments*, vol: 27, N.3, p. 226–233.

F

Favier A. (2003). Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108-115.

Fenical W., Jensen PR. (2006).Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete. bacteria. *Nat Chem Biol*,vol 2 p 666–73.

G

Gautham SA., Onkarappa R. (2013). In vitro antioxidant activity of metabolite from *Streptomyces fradiae* strain GOS1, *International Journal of Drug Development and Research*,vol5(1),p 235-244.

George M., Anjumol A., George G., Hatha AAM .(2012).Distribution and bioactive potential of soil actinomycetes from different ecological habitats, *African Journal of Microbiology Research*, vol 6 N10,p 2265-2271.

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

Grandhimathi R., Arunkumar M., Selvin J., Thangavelu T., Sivaramakrishnen S., Kiran G.S. et al. (2007). Potentiel antimicrobien d'actinomycètes marins associés aux éponges. *Journal of Medical Mycology*, vol 18p 16-22.

H

Haji M., Jarraya R., Lassoued I., Masmoudi O., Damak M., Nasri M. (2010). GC/MS and LC/MS analysis, and antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts from *Mirabilis jalapa* tubers. *Process Biochem.*, vol 45p 1486-93.

Haleng, J., Pincemail J., Defraigne J.O., Charlier C., Chapelle J.P. (2007). Le stress oxydant. *Rev Med Liege*, vol 62(10) ,p 628-638.

Hall, C., (2001). Sources of natural antioxidants: oilseeds, nuts, cereals, legumes, animal products and microbial sources, in *Antioxidants Food*, eds J. Pokorný, N. Yanishlieva, and M. Gordon (Cambridge: Woodhead Publishing Ltd.), p180–189.

Halliwell B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc T*, vol 35(5), p 1147-50.

Hirsch. A and Valdés. M. (2010). *Micromonospora*: An important microbe for biomedicine and potentially for biocontrol and biofuels. *Soil Biology and Biochemistry*, vol 42, p 536–542.

Hoorman J., et R., Islam. (2010). Understanding soil microbes and nutrient recycling. *FACT SHEET*. Agriculture and Natural Resources. The Ohio State University, p.1-5.

Horinouchi S. (2002). Antimicrobial hormone, A-factor, as a master switch for morphological differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Frontiers in Biosciences*, vol 7, p 2045-2057.

I

Ivantiskay L., Singal S., Bibikova M., Vet Vostrov S.N. (1978). Direct isolation of *Micromonospora* on selective media with gentamicin. *Antibiotiki*, vol 23, p 690-692.

J

Jauri, P. V., Altier, N., and Kinkel L. (2016). *Streptomyces* for sustainability, in *Microbial Models From Environmental to Industrial Sustainability*, ed. S. Castro-Sowinski (Singapore: Springer) p 251–276.

Jensen PR., Gontang E., Mafnas C., Mincer TC., Fenical W. (2005). Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. *Environ Microbiol*, vol 7, p1039-48.

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

K

Karam, S., and Wali, R. K. (2015). Current state of immunosuppression: past, present, and future. Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.vol 25,p113–134.

Kekuda PTR., Shobha KS., Onkarappa R. (2010).Studies on antioxidant and anthelmintic activity of two Streptomyces species isolated from Western Ghat soil of Agumbe, Karnataka, Journal of Pharmacy Research,vol 3(1),p 26-29.

Kekuda Prashith T.R, Rakesh K.N 1, Syed Junaid 1, Dileep N 1. (2013). Antibacterial and antioxidant activities of Streptomyces species Srdp-H03 Isolated from soil of hosudi, Karnataka, India. Journal of Drug Delivery & Therapeutics,p 47-53

Khamna S., Yokota A., Peberdy J.F., Lumyong S. (2010). Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp isolated from some Thai medicinal plant rhizospheres soil. EurAsian Journalof BioSciences,vol 4,p 23-32.

Kim S.B., Seong C.N., Jeon S.J., Bae K.S., et Goodfellow M., (2004). Taxonomic studyof neurotolerant acidophilic actinomycetes isolated from soil and description of *Streptomyces* yeochonensis sp.nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol,vol 54,p 211-214.

Kitouni M., Boudemagh A., Oulmi L., Reghioia S., Boughachiche F., Zerizer H et al. (2005).Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north-east of Algeria. Journal of Medical Mycology,vol15,p 45-51.

Krieger-Brauer H., Kather H. (1995) The stimulus sensitive H₂O₂-generating system present in human fat cell plasma membranes is multi-receptor linked and under antagonist control by hormones and cytokines. Biochem J,vol 307,p 543-8.

Kulikowska-Karpinska E., Moniuszko-Jakoniuk J. (2004).The Antioxidative Barrier in the Organism. Pol J Environ Stud,vol 3(1) p 5-13.

Kinkel, L. L., Schlatter, D. C., Xiao, K., and Baines, A. D. (2014). Sympatric inhibition and niche differentiation suggest alternative coevolutionary trajectories among *Streptomyces*. ISME J,vol 8,p 249–256.

Kuzuyama T and Seto H. (2003). Diversity of the biosynthesis of the isoprene units. Nat Prod Rep vol 20,p171–183.

L

Lam KS.(2006).Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. Curr Opin Microbiol,vol 92 ,p 45–51.

Lee DG., Yoo ID and Kim WG .(2007). Differential antiviral activity of benzastatin C and its dechlorinated derivative from *Streptomyces nitrosporeus*. Bio Pharm Bull ,vol 30p 795–797.

Lertcanawanichakul K.,Chawawisit K., Pondet J., Kwantep .(2014). Quantitation of Total Phenolic Contents of Bioactive Compounds Fractions *Streptomyces* species. International Journal of PharmTech Research, vol.7, No.2, p 320-324.

Lertcanawanichakul K ., Pondet J. Kwantep.(2015). In vitro antimicrobial and antioxidant activities of bioactive compounds (secondary metabolites) extracted from *Streptomyces lydicus* A2, vol. 5 (02), pp. 017-021.

M

Manasa M., Poornima G., Abhipsa V., Rekha C., Kekuda PTR., Onkarappa R., Mukunda S. (2012).Antimicrobial and antioxidant potential of *Streptomyces sp.* RAMPP-065 isolated from Kudremukh soil, Karnataka, India, Science, Technology and Arts Research Journal,vol1(3)p 39-44.

Minotto E.(2014).Caracterização de compostos produzidos por actinomicetos para biocontrole de *Bipolaris sorokiniana*. PhD. Thesis, Universidade Federal do Rio Grande doSul, Brasil,.

Mitchell S., Nicholson B., Teisan S., Lam KS and Potts BC. (2004). Aureoverticillactam, a novel 22-atom macrocyclic lactam from the marine actinomycete *Streptomyces aureoverticillatus*.J Nat Prod,vol 67,p 1400–1402.

N

Neelu Nawani., Dr. D. Y.(2013). Patil Biotechnology and Bioinformatics Institute, Tathawade, Pune 411033, India

Neelu Nawani., Bertrand Aigle., Abul Mandal., Manish Bodas.,Sofiane Ghorbel.,Divya Prakash .(2013). Actinomycetes: Role in Biotechnology and Medicine. BioMed Research International,vol 687190, p 1.

Nijveldt RJ., van Nood E., van Hoorn DEC., et al. (2001) Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. Am J Clin Nut,vol 74 (4),p 418-2.

O

Odabasoglu f.,Aslan A., cakir A., Suleyman H., Karagaz Y;Malici M.et Bayir Y.(2004).Comparaison of antioxidant activity and phenolic content of theree lichen species.photherapy research,vol 18,p 938-941.

P

Percival M.(1998)Antioxidants.Clinical Nutrition Insights. NUT031; 1/96(10/98): 1-4.

Petkovic H., Cullum J., Hranueli D., Hunter IS., Peric ConchaN, Pigac J, Thamchaipenet A, Vujaklija D and Long PF.(2006). Genetics of *Streptomyces rimosus*, the oxytetracycline producer. *Microbiol Mol Biol Rev*,vol 70 p704–728

Pimentel-Elardo S., Kozytska, S., Bugni, T.S., Ireland C.M., Moll H., Hentschel U. (2010). Anti-Parasitic compounds from *Streptomyces* sp. strains isolated from VITSVK5 spp. *Saudi J. Biol. Sci*,vol 19,p 81–86.

Pincemail J., Le Goff C., Charlier C., Gillion P., Cheramy-Bien.JP., EVan Honacker JP., Chapelle et Defraigne JO.(2009). Evaluation biologique du stress oxydant Application en routine clinique .*Nutritions et Endocrinologie - Université de Liège – CHU Sart Tilman (Liège, Belgique) , p 31.*

Prakash D., N. Nawani M., Prakash et al. (2013).Actinomycetes: a repertory of green catalysts with a potential revenue resource,” *BioMed Research International*, vol.2013 Article ID 264020, p8.

Powers SK., Sen CK., Physiological antioxidants and exercise training.In: Sen CK, Packer L, Hanninen O, editors. (2000).*Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. Amsterdam:Elsevier, p 221–41.

Priya AJ., Sagadevan E., Dhanalakshmi P., Kumar S., Karthikeyan V., Arumugam P. (2012).Detection of antioxidant and antimicrobial activities in marine actinomycetes isolated from Puducherry coastal region, *Journal of Modern Biotechnology*, , 1(2), 63–69.

Pullen C., Schmitz P., Meuer K., Bamberg D., Lohman S., De Castro França S et al., 2002.New and bioactive compounds from *Streptomyces* strain residing in the wood of Celastraceae. *Planta*,vol 16,p 162-167.

R

Rakesh K.N., Syed Junaid., Dileep N.,(2013), Prashith Kekuda T.R. Antibacterial and antioxidant activities of *Streptomyces* species srdp-h03 isolated from soil of Hosudi, Karnataka, India” *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*,vol 3(4),p 47-53.

Re.,PellegriniN.,Prteggeent A.Yang M.,Rice-Evans C.(1998).antioxydant activit applying animpoves ABTS radical cation de colorization assay. Free radical biology and Medicine,vol 26,p 1231-1237.

Rechner AR., Kuhnle G., Bremmer P., Hubbard GP., Moore KP., Rice-Evans CA. (2002). The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. Free Radic Biol Med,vol 33,p 220-35.

Ribéreau-Gayon P.(1968). Les composés phénoliques des végétaux. Ed Dunod. Paris.

Rice-Evans CA., Miller NJ .(1994). Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. Biochem Soc Trans,vol 24,p 790-5.

Rice-Evans C. (2001).Flavonoid antioxidants. Curr Med Chem,vol 8,p 797-807

S

SahreenS.,KHanM.R.et Khan.(2010).Evaluation of antioxidant activities of various solvent extract of Carissa op aca fruit.Food Chemistry.

Saurav, K., and Kannabiran, K. (2012). Cytotoxicity and antioxidant activity of 5-(2, 4-dimethylbenzyl) pyrrolidin-2-one extracted from marine Streptomyces A from a newly isolated Streptomyces sp. Biotechnol. Lett,vol 29,p 599–603.

Sharma S., and Shah G. (2014). Isolation and screening of actinomycetes for bioactive compounds from the marine coast of South-Gujarat region. Int. J.Res. Sci. Innov. 1, 345– 349. Available online <http://www.rsisinternational.org/Issue>,vol 7, p345-349.pdf

Shirling E.B and Gottlieb. (1966). Methode fr characterization of Streptomyces species.int.J.Syst.Bact,vol 16,p 313-340.

Shindo K.,Takenaka A., Noguchi T., Hayakawa Y., and Seto H. (1989).Thiazostatin A and thiazostatin B. new antioxidants produced by *Streptomyces tolurosus*. J. Antibiot. Vol 42,p 1526–1529.

Shinya K., Kunigami T., Kim TS., Furihata K., Hayakawa Y and Seto H (1997). Carquinostatin B, a new neuronal cell protecting substance produced by *Streptomycesexfoliatus*. Biosci Biotechnol Biochem,vol 61,p 1768–1769.

Smaoui S. (2010). Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de, microorganismes nouvellement isolés et identifiés.Thèse de doctorat. Université de Toulouse (France). p251

Solano G., Jiménez KR., Jaspars M., Castillo GT. (2009).Study of the diversity of culturable actinomycetes in the North Pacific and Caribbean coasts of Costa Rica. Antonie Van Leeuwenhoek,vol 96,p 71-8.

Sousa A.,Ferreiral.C.F.R.,BarrosL.,Bento A.,Pereira J.A.(2008).Effect of solvent and extraction temperatures on the antioxidant potential of traditional stoned table olives alcaparras .Food science and technology, vol 41, p739-725.

Subramani R., Aalbersberg W. (2013). Culturable rare Actinomycetes: diversity, isolation and marine natural product discovery. *Appl Microbiol Biotechnol*, vol 97(21), p 9291-321.

Sujatha P., Bapi Raju KV., Ramana T. (2005). Studies on a new marine *Streptomyces* BT 408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Res*, vol 160, p119–126.

Suzuki K., Nagai K., Shimizu Y., Suzuki Y. (1994). Search for actinomycetes in screening for new bioactive compounds. *Actinomycetologica*, vol 8, p122–127.

T

Takahiro E., Yoshiro Y., Tadao K. (1999). Synthetic study on radical scavenger benthocyanin A. *Nippon Kagakkai Koen Yokoshu*, vol 7, p 774

Theilleux J. (1993). Les actinomycètes In : *Microbiologie industrielle : Les microorganismes d'intérêt industriel*, Lavoisier, Tech et Doc, vol 612, p 425.

Thenmozhi M., Kannabiran K., Antimicrobial and antioxidant properties of marine actinomycetes *Streptomyces* sp VITSTK7. (2012). *Oxidants and Antioxidants in Medical Science*, vol 1(1), p 51-57.

U

Uyeda M., Mizukami M., Yokomizo K., Suzuki K. (2001). Pentalenolactone I and hygromycin A, immunosuppressants produced by *Streptomyces* sp. *lipinensis* and *Streptomyces hygrosopicus*. *Biosci Biotechnol Biochem*, vol 65, p 1252–1254.

V

Valko M., Rhodes CJ., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, vol 160(1), p 1-40.

Vaughan M. Oxidative modification of macromolecules. *J Biol Chem* .(1997). Vol 272 ,p18513.

W

Williams ST., Kuster E. (1964). Selective media for the isolation of *Streptomyces* *Nature*, vol 202, p 928-929.

Williams ST., Goodfellow M., Alderson G. (1998). 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, p. 2452- 2492.

Y

Yong-chao G., Shu-hai G., Wang J., Li D., Wang H., Zeng DH. (2014). Effects of different remediation treatments on crude oil contaminated saline soil. *Chemosphere*; 117:486–493.

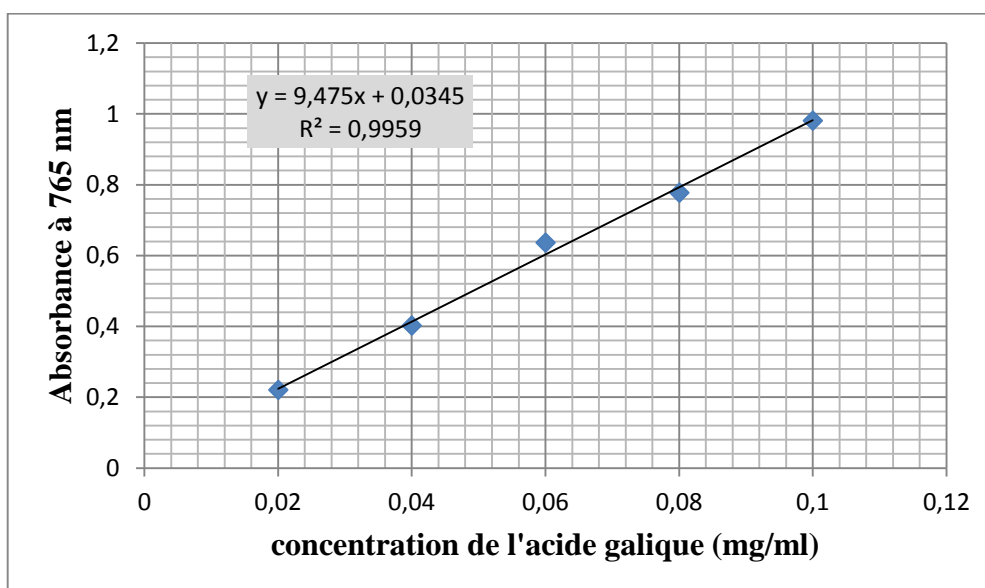
Yoshiteru Hashimoto. (2007). Development of novel expression systems for actinomycetes. *Actinomycetologica*, vol 21, p70–75.

Annexes

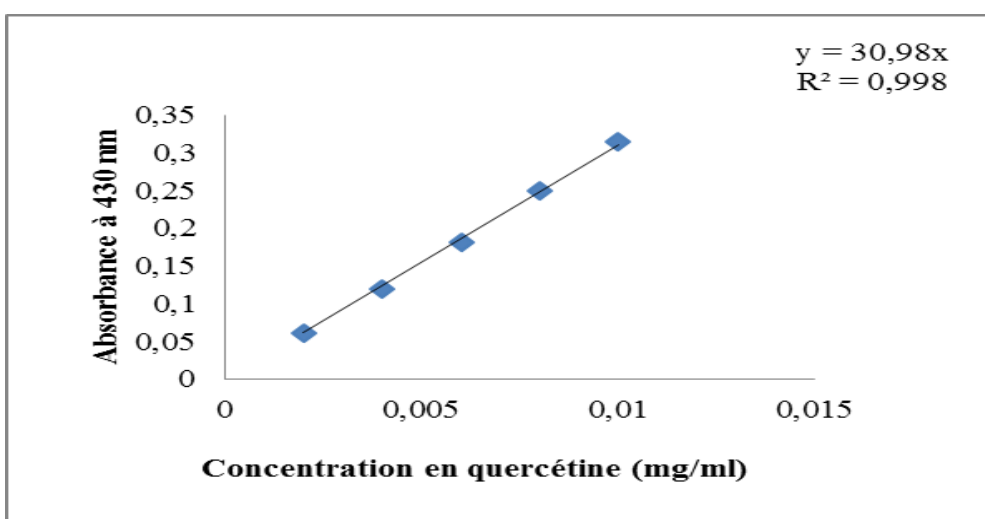
Matériel utilisé

- Autoclave
- Bain-Marie
- Ballons
- Bec Bunsen
- Bechers
- Boîtes de pétri
- Ecouillons
- Entonnoir
- Eprouvette
- Erlenmeyers
- Etuves à 28 °C et à 37°C (memmert)
- Flacons
- Micropipette de 10-100µL
- Microscope optique (ZEISS)
- Pied à coulisse (STINLESS HARDEND)
- Pipettes Pasteur
- Plaque agitatrice (Raypa AG-5)
- Rotavapor (Bûchi Rotavapor R-114)
- Spectrophotomètre (RAYLEIGH)
- Tube à essais
- Vortex (VELP scientifica)

Annexe III : Courbe d'étalonnages utilisée pour le dosage des antioxydants

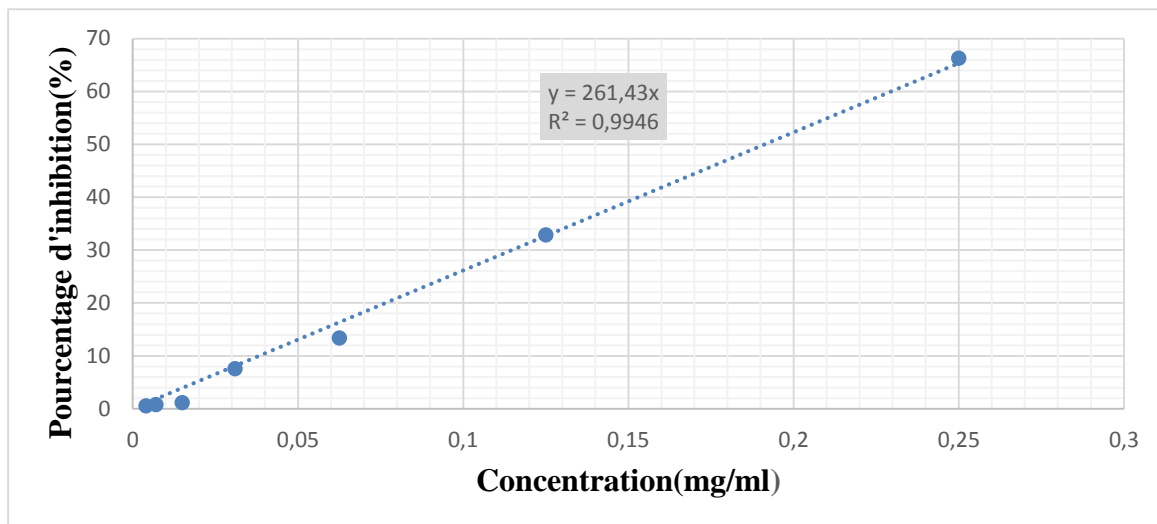


1. Variation de l'absorbance de l'acide galique en fonction des concentrations

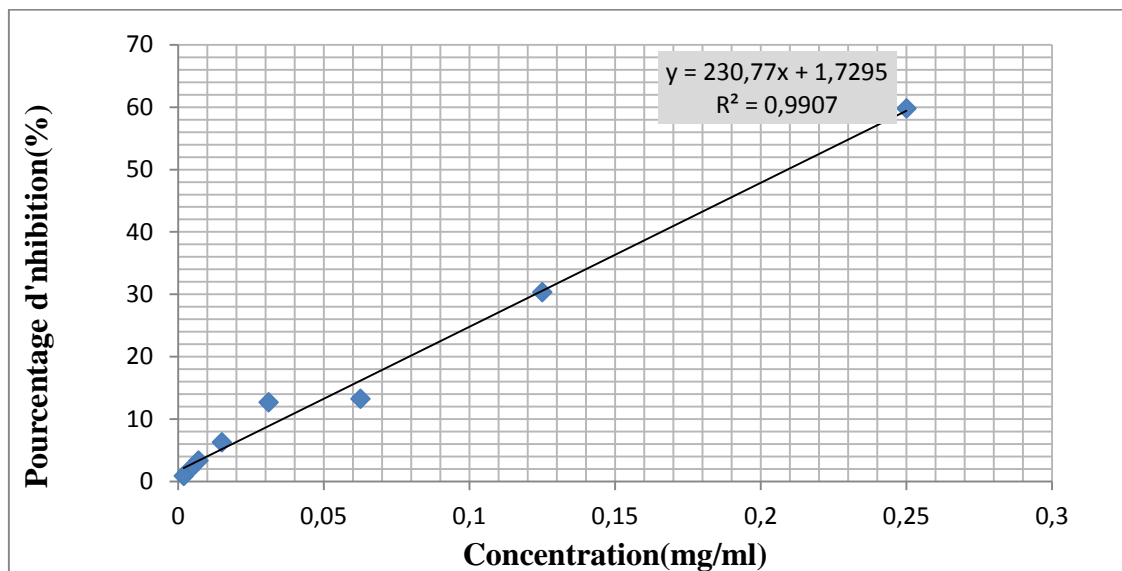


2. Variation de l'absorbance de la quercétine en fonction des concentrations

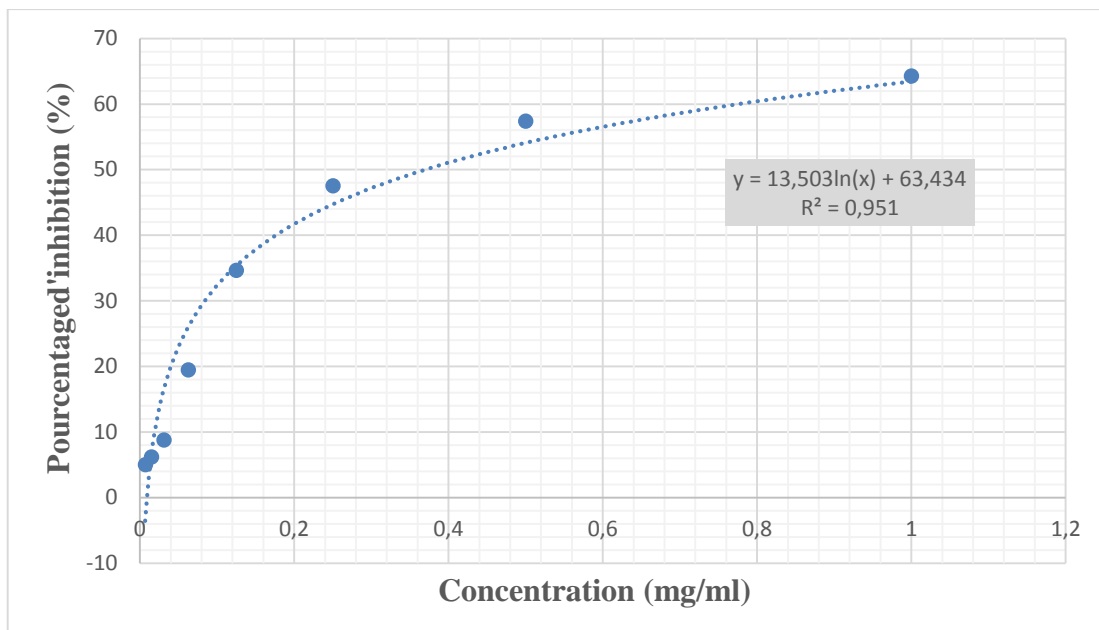
Courbe d'étalonnages utilisée pour la détermination de l'activité antioxydantes



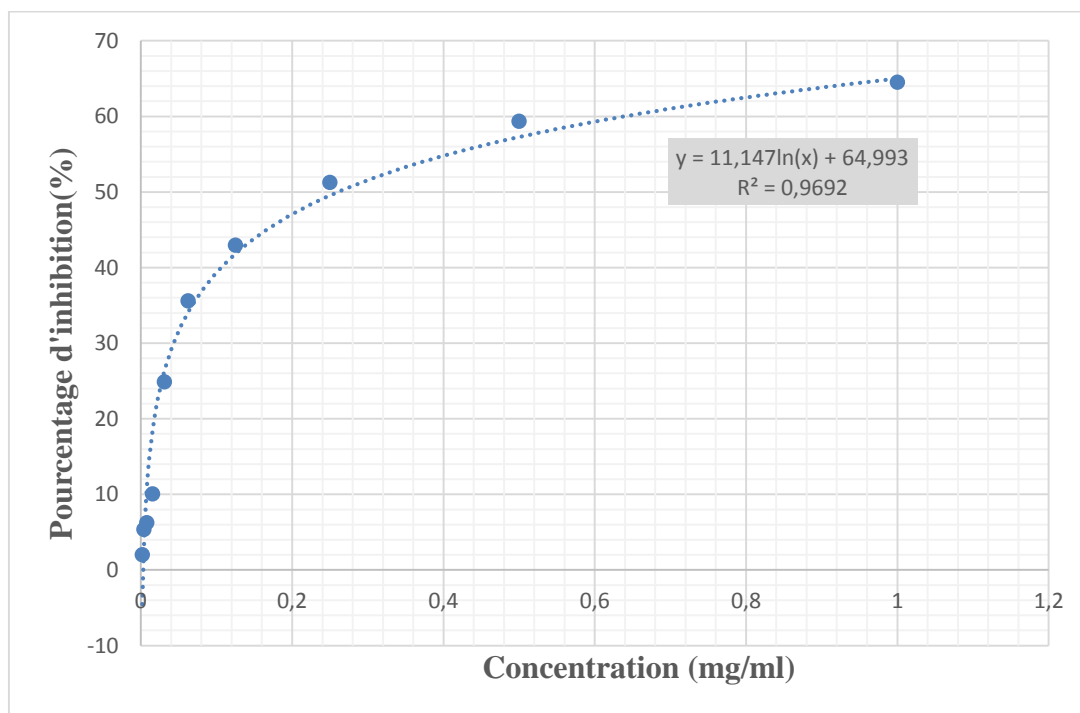
1. Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration du trolox



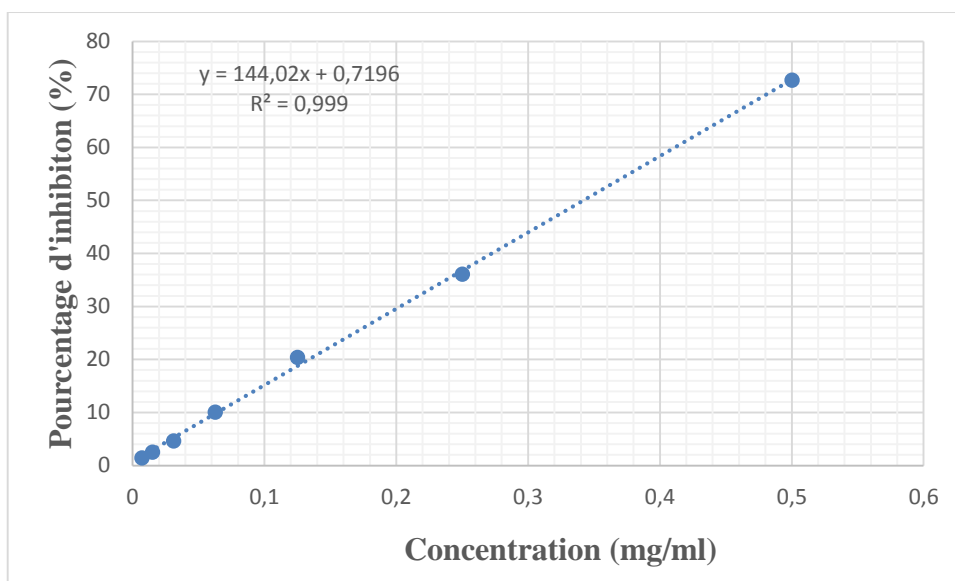
2. Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'Acide ascorbique



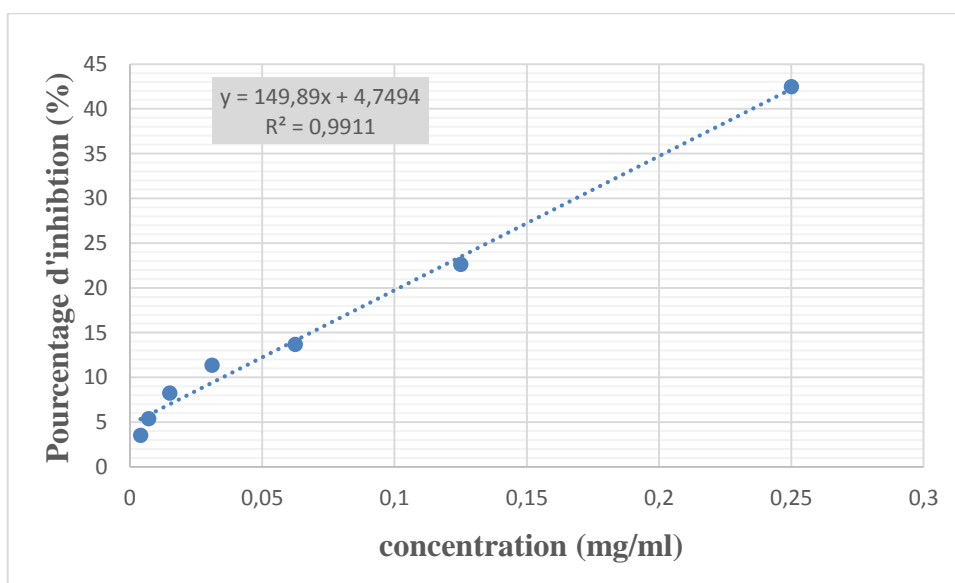
3. Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration du BHT



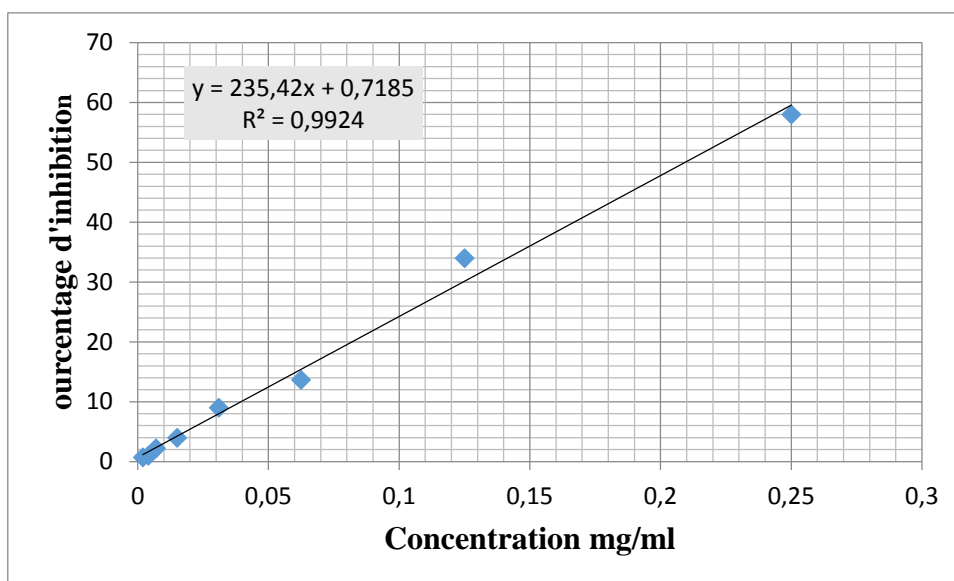
4. Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration du BHT



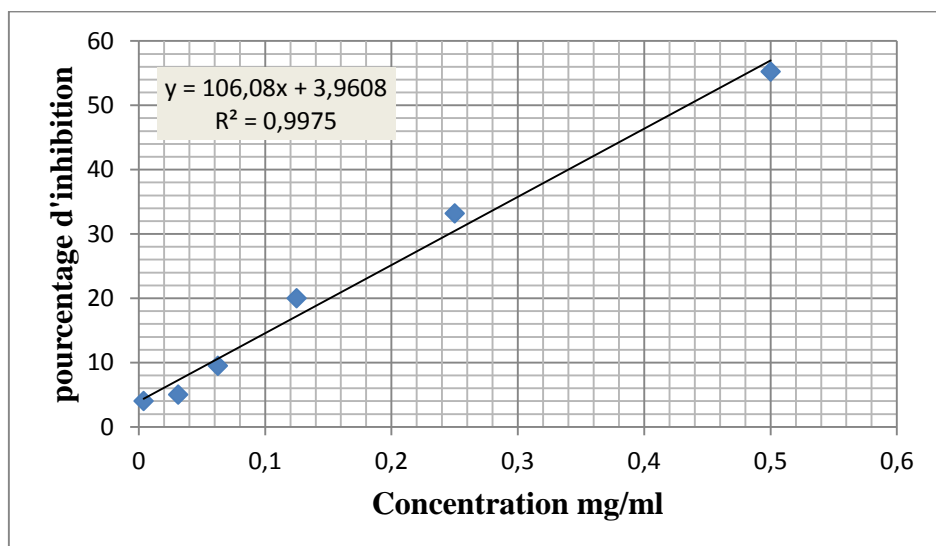
Variation de l'inhibition de l'ABTS en fonction de la concentration du Trolox.



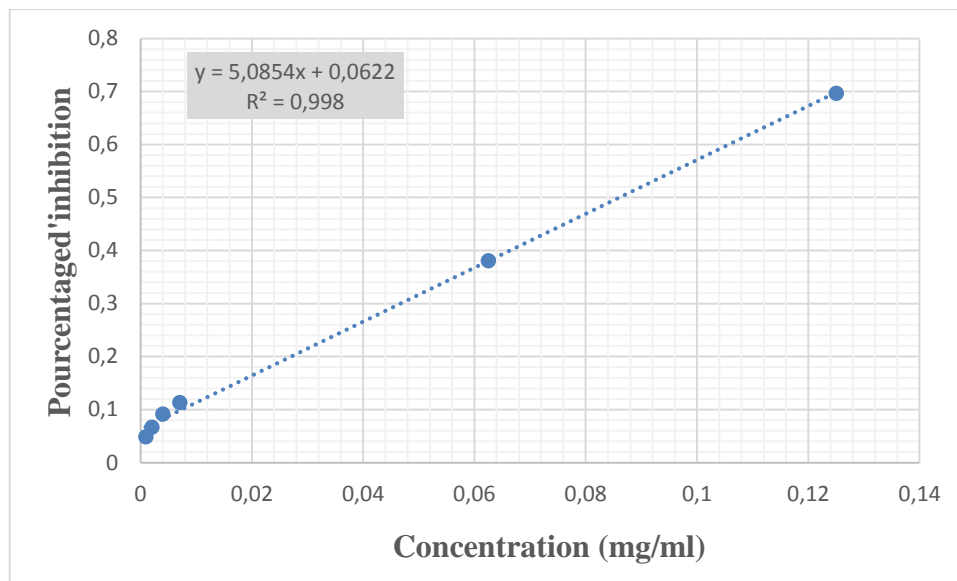
Variation de l'inhibition de l'ABTS en fonction de la concentration du BHT



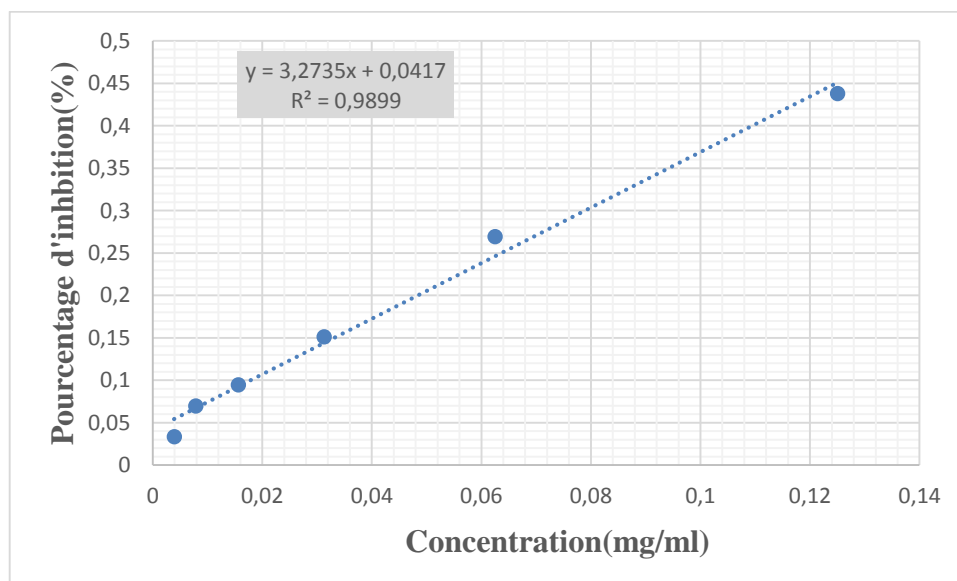
5. Variation de l'inhibition du l'ABTS en fonction de la concentration de l'acide ascorbique



6. Variation de l'inhibition du l'ABTS en fonction de la concentration de BHA



7. Variation du pouvoir réducteur en fonction de la concentration de l'acide ascorbique



8. Variation du pouvoir réducteur en fonction de la concentration du trolox

Milieu de culture

1. Milieu Gause (Ivantiskaya et al., 1978)

Amidon 20 g; K_2HPO_4 0.5g; KNO_3 1g; $FeSO_4$ 0.01g; $MgSO_4 \cdot H_2O$ 0.5g; Agar 20g; H_2O d 1000 mL, pH 7.4 ± 0.2

2. Milieu SCA (Starch Casein Agar) (Kuster et Williams, 1964)

Amidon 10g ; Casein 0.3g ; KNO_3 2g ; K_2HPO_4 2g ; NaCl 2g ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05g ; $CaCO_3$ 0.02g ; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01g ; Agar 18g ; H_2O d 50 ml ; Eau de mer 50 ml ; pH 7.2 ± 0

Les milieux ISP ont été préconisés lors de l'« International *Streptomyces* Project » (Shirling et Gottlieb, 1966).

3. Milieu ISP1

Tryptone : 5g ; extrait de levure : 3g ; agar : 15g ; eau distillée q.s.p :1000 ml. pH = 7,2

4. Milieu ISP2

Glucose: 4 g ; extrait de levure: 4 g ; extrait de malt: 10 g ; au distillée q.s.p. 1000 ml ; agar 20g.

5. Milieu ISP3

Farine d'avoine : 20 g ; solution saline standard : 1 mL ; agar: 20 g ; eau distillée q.s.p.1000 ml. pH 7,2.

* Solution saline standard: $FeSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,1 g ; $MnC_{12} \cdot 4H_2O$: 0,1 g ; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$: 0.1 g eau distillée q.s.p. 100 ml.

5. Milieu ISP4

Amidon: 10 g ; K_2HPO_4 : 1 g ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 1 g ; NaCl: 1 g ; $(NH_4)_2SO_4$: 2 g ; $CaCO_3$: 2g ; Solution saline standard (voir ISP3) : 1 ml ; agar 20 g ; eau distillée q.s.p. 1000 ml. pH 7,2.

6. Milieu ISP5

Glycérol 10g, L-aspergine 1g, K_2HPO_4 1g, Solution saline 1ml, Agar 20, Eau distillé qsp 1000 ml, PH=7 / 7,4

7. Milieu ISP6

Peptone 15g ; protéose peptone 5g ; citrate de ferammoniacal 0,5g ; thiosulfate de sodium 0,08g ; Extrait de levure 1g ; K_2HPO_4 1 g ; Agar 20g ; Eau distillé 1000 ml.

8. Mueller Hinton

Résumé

Les activités antimicrobiennes et antioxydantes de deux extraits bruts d'acétate d'éthyle originaire de deux souches d'actinobactéries, d'origine terrestre et marine, ont été étudiées. Les caractéristiques phénotypiques des deux souches, ont été de ce fait étudié. Le pouvoir antagoniste des deux extraits bruts a été évalué à l'égard de 5 bactéries pathogènes (*L.inocua*, *S.Typhi*, *V.cholerae*, *A.baumani* et *C.albicans*). les deux extraits bruts ont présentés des effets inhibiteur non négligeable à l'égard de pratiquer la totalité des germe cibles testés. Le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes a permet d'obtenir des teneurs de l'ordre de $18,03 \pm 0,40$ mg (EAG) / g d'extrait sec et $13,78 \pm 0,75$ mg (EAG) / g d'extrait sec ($4,7$ mg EQ/g (D2)), respectivement. L'activité antioxydante des deux extraits bruts a été évalué à travers le piégeage des radicaux DPPH ABTS et la réduction de l'ion ferrique. Pour le premier test les pourcentages d'inhibition du DPPH a été estimé à 47%, 58% pour D1 et D2 respectivement, par ailleurs le pourcentage de l'ABTS a été estimé à 47%, 61.44% pour D1 et D2 respectivement. Pour le dernier test les IC50 ont été estimé à 9.23 pour l'extrait brut D1 et 5.72 pour l'extrait brut D2.

Mots clé : Actinobactérie, Activité antioxydante, Polyphénols, Flavonoïdes.

Abstract

The antimicrobial and antioxidant activities of two crude extracts of ethyl acetate originating from two strains of actinobacteria, of terrestrial and marine origin, were studied. The phenotypic characteristics of the two strains were studied. The antagonist potency of the two crude extracts was evaluated with respect to pathogenic bacteria (*L.inocua*, *S.Typhi*, *V.cholerae*, *A.baumani* and *C.albicans*). The two crude extracts showed non-negligible inhibitory effects with regard to practicing all the target germs tested. The total polyphenols and flavonoids a result in contents of the order of $18.03 \pm 0,40$ mg (EAG) / g dry extract and 13.78 ± 0.75 mg (EAG) / g dry extract (4.7 mg EQ / g (D2)), respectively. The antioxidant activity of the two crude extracts was evaluated through the trapping of the ABTS DPPH radicals and the reduction of the ferric ion. For the first test, the percentages of DPPH inhibition were estimated to be 47%, 58% for D1 and D2 respectively, and the percentage of ABTS was estimated at 47%, 61.44% for D1 and D2 respectively. For the last test the IC50 was estimated at 9.23 for the crude extract D1 and 5.72 for the crude extract D2.

Keywords: Actinobacterium, Antioxidant activity, Polyphenols, Flavonoids.