

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

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Spécialité Biotechnologie Microbienne



Réf :.....

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

MASTER

Thème

**Evaluation et optimisation du
potentiel antioxydant d'une
souche d'actinobactérie**

Présenté par :
MOKHTARI Abdelmoumen & MOULAI ARBI Fatima
Soutenu le : **24 Juin 2018**

Devant le jury composé de :

M^{me} YAHIAOUI Haoua
M^{elle} DJINNI Ibtissem
M^{me} LAINCER Firdaous

MAA Présidente
MCB Encadreur
MCB Examinatrice

Année universitaire : 2017 / 2018

Remerciements

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

Nous tenons à exprimer notre gratitude, notre profond respect et notre remerciement aux membres de jury : Notre enseignante Mme YAHIAOUI Haoua. qui nous a fait honneur par sa présence en qualité de président de jury. Mme LAINCER Firdaous qui a accepté de faire partie de ce jury et examiner ce travail et consacré de son temps pour son évaluation.

Nos vifs remerciement à notre promotrice Melle DJINNI Ibtissem qui a accepté la responsabilité de superviser ce travail, pour son aide, ses conseils, sa disponibilité, ces précieux encouragements, sa patience et sa confiance. Nous lui témoignons, notre gratitude et notre reconnaissance.

Nos remerciements s'adressent à notre Co-promotrice Mme ARKOUB Warda qui nous a permis de réaliser une partie de ce travail, pour son soutien, son aide, ces conseils et sa sympathie.

On tient à exprimer notre grande considération et notre vive reconnaissance à Melle TOUATI Naima enseignante à l'université d'A. Mira, qui nous a aidé, conseillé et soutenu à tout moment afin de réaliser ce travail dans les meilleures conditions, pour ses orientations et sa gentillesse.

Abdelmoumen et Fatima

Dédicaces

Je dédie ce mémoire...

A mon très cher père, Que ce modeste travail concrétise ton rêve le plus cher et qui n'est que le fruit de tes conseils et de tes encouragements.

A ma très chère mère, la plus douce et la plus merveilleuse de toutes les mamans, j'implore Dieu qu'il te procure santé et qu'il m'aide à te compenser tous les malheurs passés. Pour que plus jamais le chagrin ne pénètre ton cœur, car j'aurais encore besoin de ton amour.

A mes très chères belles sœurs Warda la douce et Linda l'aimable, vous êtes la joie de ma vie.

A mes amis et collègues en particulier l'équipe de csgo (tika, Karim, Silm, luxuse, zighod, djamel ...) et l'équipe de rouda (Youyou, Hicham, Kika, Abdelah, Khali ahmed et Zazi mombay...).

A mes frères Rouji, El hadj, Koukmi, Ferhat et Houssmi sans oublier mes braves amies de la promotion de biotechnologie microbienne : Younes, Walid, Mourad, Malek, Mohamed et Abdelghani.

*Une spéciale dédicace a une personne qui compte vraiment pour moi
A toi Tat b*



Abdelmoumen

Dédicaces

Je dédie ce mémoire...

A mes chers parents, Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez.

A ma sœur Nazîha la prunelle de mes yeux, la douce, au cœur si grand.

A toutes les kabyles de Bejaia qui m'ont aidés, conseillés et soutenus à tout moment en particulier : IdIR Salîma, IDRISOU Souhîla, HAMLAT Asmaa, YAHIA CHERIF Nedjma, BORDJAH Lîla, MODOUB Malek, OUMELLIL Mourad et BARKAT Abdelghani que je porte beaucoup de respect et remerciement.

*Une spéciale dédicace a deux personnes qui compte déjà énormément pour moi et pour qui je porte beaucoup de tendresse et de respect
A vous Tat C et FATMI Lînda.*



Fatîma

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction.....	1

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I. Les actinobactéries : Généralités et importance.....	3
1. Généralités.....	3
1.1. Ecologie.....	3
1.2. Distribution dans la nature.....	3
1.3. Taxonomie et critères d'identification.....	4
1.4. Cycle de développement du genre <i>Streptomyces</i>	4
2. Importance des actinobactéries.....	4
2.1. En agronomie.....	4
2.2. En biotechnologie.....	5
2.3. Dans le domaine pharmaceutique.....	6
3. Le métabolisme des actinobactéries.....	6
3.1. Métabolisme primaire.....	6
3.2. Métabolisme secondaire.....	7
II. Le potentiel antioxydant.....	7
1. Les radicaux libres et le stress oxydatif.....	8
2. Les antioxydants.....	9
3. Les molécules antioxydants chez les actinobactéries.....	10
III. Modélisation statistique.....	10
1. La méthodologie de la surface de réponse (RSM).....	10
2. Plan composite centré.....	11

Chapitre II : Matériel et méthodes

I. Matériel.....	12
1. Matériel analytique.....	12
2. Matériel biologique.....	12
2.1. Souche d'actinobactérie étudiée.....	12
II. Méthode.....	12

1. Repiquage de la souche MM1.....	12
2. Etude morphologique de la souche MM1.....	12
2.1. Caractères macromorphologiques.....	12
2.2. Caractères micromorphologiques.....	12
3. Mise en évidence de l'activité antioxydante.....	13
3.1. Culture de la souche et obtention de l'extrait brut.....	13
3.2. Extraction des molécules actives.....	13
3.3. Dosage des polyphénols totaux.....	13
3.4. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl- 1-picrylhydrazyl).....	14
4. Modélisation de la production des polyphénols totaux et de l'activité antioxydante par la souche MM1.....	15

Chapitre III : Résultats et discussion

I. Etude des caractéristiques morphologiques de la souche MM1.....	17
1. Etude des caractères macromorphologiques.....	17
2. Etude des caractères micromorphologiques.....	19
II. Mise en évidence de l'activité antioxydante.....	19
1. Dosage des polyphénols totaux.....	20
2. Piégeage du radical DPPH et évaluation de l'activité antioxydante.....	21
III. Modélisation de la production des polyphénols totaux et l'activité antioxydante..	22
1. Elaboration du modèle du second degré pour la teneur en polyphénols totaux.....	22
1.1. Calcul des coefficients du modèle.....	23
1.2. Analyse statistique de l'équation de régression.....	24
1.3. Test de validation de l'équation de régression.....	25
1.4. Test de signification de la régression.....	25
1.5. Tracé des courbes iso-réponse et surfaces de réponses.....	26
2. Elaboration de modèle du second degré pour l'activité antioxydante.....	29
2.1. Calcul des coefficients du modèle.....	30
2.2. Analyse statistique de l'équation de régression.....	31
2.3. Tracé des courbes iso-réponses et surfaces de réponses.....	32
Conclusion et perspective.....	36
Références	
Annexe	
Résumé	

N° du tableau	Titre	Page
I	Quelques exemples d'enzymes produites par les actinobactéries	5
II	Quelques exemples de composés bioactifs produits par les bactéries de l'ordre des <i>Actinomycetales</i>	6
III	Exemples de molécules antioxydantes produites par des quelques espèces d'actinobactéries	10
IV	Valeurs extrêmes des paramètres opératoires étudiés	15
V	Matrice des expériences du plan composite centré pour k=3 (trois facteurs)	16
VI	Etude des caractères macromorphologiques et culturaux de la souche MM1 après 21 jours d'incubation à 28°C	17
VII	Matrice des expériences de la teneur en polyphénols totaux du plan composite centré pour k=3 (trois facteurs)	23
VIII	Valeurs des coefficients du modèle de second degré pour la teneur en polyphénols totaux	24
IX	Valeurs de t_j du modèle de second degré pour la teneur en polyphénols totaux	24
X	Matrice des expériences de l'activité antioxydante du plan composite centré pour k=3 (trois facteurs)	30
XI	Valeurs des coefficients du modèle de second degré pour l'activité antioxydante	31
XII	Valeurs de t_j du modèle de second degré pour l'activité antioxydante	31

N°	Titre	Annexe
XIII	Table de Student	IV
XIV	Table de Fisher valeurs des 95 nièmes centiles (niveaux 0.05)	V

N° de figure	Titre	Page
1	Cycle de développement du genre <i>Streptomyce</i>	4
2	Métabolites secondaires bioactifs produits par les actinobactéries	7
3	Principales voies de formation des espèces réactives de l'oxygène	8
4	Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques	9
5	Mécanisme d'action des composés phénoliques.	10
6	Plan composite pour l'étude de deux facteurs (k=2)	11
7	Réaction entre un antioxydant et le radical DPPH	14
8	Macromorphologie de la souche MM1 sur différents milieux de culture après 21 jours d'incubation à 28°C	18
9	Observation au microscope optique du mycélium aérien de la souche MM1, cultivée pendant 14 jours à 28°C sur milieu SCA 50% eau de mer, au grossissement x40	19
10	Teneur en polyphénols totaux de l'extrait brut à l'acétate d'éthyle de la souche de <i>Streptomyces</i> MM1	20
11	Activité de piégeage radicalaire de l'extrait brut à l'acétate d'éthyle de la souche de <i>Streptomyces</i> MM1	21
12	Courbes iso-réponses (a) et surface de réponse (b) de la teneur en polyphénols totaux pour $X_2 = -1,68$ (Hexane)	26
13	Courbes iso-réponses (a) et surface de réponse (b) de la teneur en polyphénols totaux pour $X_2 = -1$ (Dichloromethane)	27
14	Courbes iso-réponses (a) et surface de réponse (b) de la teneur en polyphénols totaux pour : $X_2 = 0$ (Acétate d'éthyle)	27
15	Courbes iso-réponses (a) et surface de réponse (b) de la teneur en polyphénols totaux pour : $X_2 = +1$ (Acétone)	28
16	Courbes iso-réponses (a) et surface de réponse (b) de la teneur en polyphénols totaux pour : $X_2 = +1,68$ (Méthanol)	28
17	Courbes iso réponses (a) et surface de réponse (b) de l'activité antioxydante pour : $X_2 = -1,68$ (Hexane)	32
18	Courbes iso réponses (a) et surface de réponse (b) de l'activité antioxydante pour : $X_2 = -1$ (DCM)	32
19	Courbes iso réponses (a) et surface de réponse (b) de l'activité	33

	antioxydante pour : $X_2= 0$ (Acétate d'éthyle)	
20	Courbes iso réponses (a) et surface de réponse (b) de l'activité antioxydante pour : $X_2= +1$ (Acétone)	33
21	Courbes iso réponses (a) et surface de réponse (b) de l'activité antioxydante pour : $X_2= +1,68$ (Méthanol)	34

N°	Titre	Annexe
22	Variation de l'absorbance en fonction des concentrations de l'acide galique	III
23	Variation de l'absorbance en fonction des concentrations en Trolox	III

AE: Acétate d'éthyle
CAT : Catalase
CCD : Central Composite Design
DCM : Dichloromethane
DPPH: 2,2-diphényl- 1 -picrylhydrazyl
ES: Extrait sec
EQ.AG: Equivalent Acide Galique
EQ.TLX : Equivalent Trolox
ERO : espèces réactifs de l'oxygène
G+C% : Pourcentage Guanine + Cytosine
Hex : Hexane
ISP: International *Streptomyces* Project
K : Nombre de facteur opératoire
LMA: Laboratoire de Microbiologie Appliquée
MA : Mycélium aérien
MEM : Mincer 50% Eau de Mer
MOTH : Méthanol
MS : Mycélium de substrat
N₀ : Points au centre
N_f : Essais d'un plan factoriel
N_α : Points en étoile
PI%: Pourcentage d'inhibition
q.s.p : quantité suffisante pour
RSM : méthodologie de surface de réponses
SCA : Starch Casein Agar
SOD: superoxyde dismutase
UFC/mL : Unité Formant Colonie par Millilitre
X_i : Niveau du facteur i

Introduction

Nous sommes confrontés ces dernières décennies à l'apparition de bactéries multirésistantes aux antibiotiques couramment utilisés et à la toxicité des antioxydants synthétiques. Ce qui a poussé les scientifiques à rechercher d'autres sources en quête de molécules naturelles efficaces et dénuées de tout effet secondaire. En effet, les radicaux libres induisent des dommages oxydatifs aux biomolécules telles que les lipides, les protéines et l'ADN. Ces dommages sont impliqués dans le développement de nombreuses maladies, telles que les maladies cardio-vasculaires, l'athérosclérose...etc (Valko et al., 2007 ; Ferreira et al., 2009 ; Cavar et al., 2012). Parmi les sources étudiées de molécules antioxydantes d'origine naturelle, le monde microbien constitue l'une des alternatives prometteuses dans ce domaine.

Les microorganismes d'origine marine sont des producteurs prolifiques de molécules actives en particulier les bactéries appartenant à l'ordre des *Actinomycetales* (Jensen et Fenical, 1996; De Carvalho et Pedro, 2010).

De tous les genres d'actinobactéries, le genre *Streptomyces* est représenté dans la nature par le plus grand nombre d'espèces et de variétés. Ces espèces peuvent produire un grand nombre d'antibiotiques et de métabolites secondaires actifs (Thomas et al., 2010). En effet, les activités décrites et associées à ce genre sont très diverses: antimicrobiennes, anti-inflammatoires, cytotoxiques, antivirales, antioxydantes ainsi que bien d'autres activités.

Les métabolites secondaires sont généralement produits en phase stationnaire de croissance des microorganismes. Ils peuvent être induits suite à l'épuisement des nutriments dans leur milieu de croissance, créant des conditions stressantes. Les différences dans la composition des milieux de croissance affectent également le type de métabolites secondaires produits par les microorganismes. C'est dans cette approche que s'inscrit cette étude qui propose l'optimisation de l'extraction des polyphénols totaux et de molécules antioxydantes à partir d'une culture de *Streptomyces*. L'outil statistique le plus approprié employé pour maximiser les teneurs de ces molécules est la méthodologie de surface de réponse (RSM). Selon Bas et Boyaci (2007), Granato et al. (2010), Cruz et al. (2010) et Pena et al (2014), la RSM est une technique mathématique basée sur l'analyse de régression utilisée pour développer et améliorer (optimiser) les produits.

Cette étude s'organise autour de trois parties : la première fait état des connaissances actuelles sur les actinobactéries et un aperçu de leur capacité à produire des molécules bioactives et éventuellement leur pouvoir antioxydant ainsi que des notions fondamentales relatives à la méthodologie de surface de réponse.

La deuxième partie de ce mémoire expose l'ensemble des méthodes expérimentales mises en œuvre dans l'étude des caractères morphologiques et le profil antioxydant, la

modélisation et l'optimisation de la production des polyphénols totaux et l'activité antioxydante par l'isolat *Streptomyces* sp. MM1 par la méthodologie de surface de réponse.

La troisième et dernière partie discute les résultats obtenus au cours de cette étude suivi par une conclusion générale.



Synthèse bibliographique

I. Les actinobactéries: Généralités et importance

1. Généralités

Les actinobactéries sont des procaryotes à Gram positif (Williams et al., 1993 ; Sanglier et Trujillo, 1997). Ils ont une teneur élevée en GC, variant entre 51% chez certains corynebactéries à plus de 70% chez *Streptomyces* et *Frankia* (Benson and Silvester, 1993; Perrine-Walker et al., 2011). Leur morphologie est très diversifiée, allant de la forme cocci (*Micrococcus*) ou batonnet-cocci (*Arthrobacter*) en passant par ceux formant des hyphes qui se divisent (*Nocardia*, *Rhodococcus*) et ceux qui possèdent un mycélium persistant et bien différencié (*Streptomyces*, *Actinomadura*, *Micromonospora*, etc.) (Oskay et al., 2004 ; Srivibool et Sukchotiratana, 2006). Les actinobactéries sont des eubactéries chimio-organotrophes (Conn, 2005; Hayakawa, 2008). La plupart sont saprophytes et aérobies, bien qu'il existe des formes anaérobies regroupant généralement des espèces pathogènes (Andariambololona, 2010).

1.1. Ecologie

Comme on peut s'y attendre d'un grand phylum, les représentants des *Actinobacteria* sont isolés à partir d'un large éventail de niches écologiques, y compris aquatiques tels que les sédiments marins (Maldonado et al., 2009), eau de mer (Subramani et Aalbersberg, 2013), écosystèmes d'eau douce (Allgaier et Grossart, 2006), sédiments océaniques (Jensen et al., 2005 ; Solano et al., 2009) et les invertébrés marins (Cheng et al., 2016). Dans les environnements terrestres, différents styles de vie sont rencontrés chez les actinobactéries, tels que les commensaux végétaux, les symbiotes fixateurs d'azote, les habitants du tractus gastro-intestinal, et les pathogènes des animaux et des plantes (Fiedler et al., 2005). Les habitats comprennent également des écosystèmes plus extrêmes, tels que les sédiments profonds et les sols désertiques hyperarides (Stach et Bull, 2005 ; Stackebrandt et Schumann, 2006 ; Goodfellow et Fiedler, 2010).

1.2. Distribution dans la nature

Les actinobactéries constituent une proportion importante de la microflore tellurique (10^7 - 10^8 UFC/ml) (Hoorman et Islam, 2010). 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). Par ailleurs, ces microorganismes sont capables de sporuler ce qui leur permet de survivre aux conditions défavorables telles que la salinité (Zaitlin et Watson, 2006), qui joue un rôle important dans leur distribution.

1.3. Taxonomie et critères d'identification

Le phylum *Actinobacteria* représente l'une des plus grandes unités taxonomiques dans le domaine *Bacteria* (Embley et al., 1994; Goodfellow, 2012). Selon le *Bergey's* manuel de la systématique bactérienne (2012), le phylum renferme six classes incluant *Rubrobacteries*, *Thermoleophilia*, *Coriobacteriia*, *Acidimicrobiia*, *Nitriliruptoria* et *Actinobacteria*. La taxonomie des actinobactéries est basée sur plusieurs critères : morphologiques, chimiques, physiologiques et moléculaires. L'identification des genres est facilitée par les études morphologiques et chimiques tandis que les critères physiologiques et moléculaires séparent les espèces (Badji, 2006).

1.4. 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 du substrat (MS) formé d'hyphes qui se ramifient. Le développement du mycélium du substrat vers la partie superficielle donne le mycélium 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).

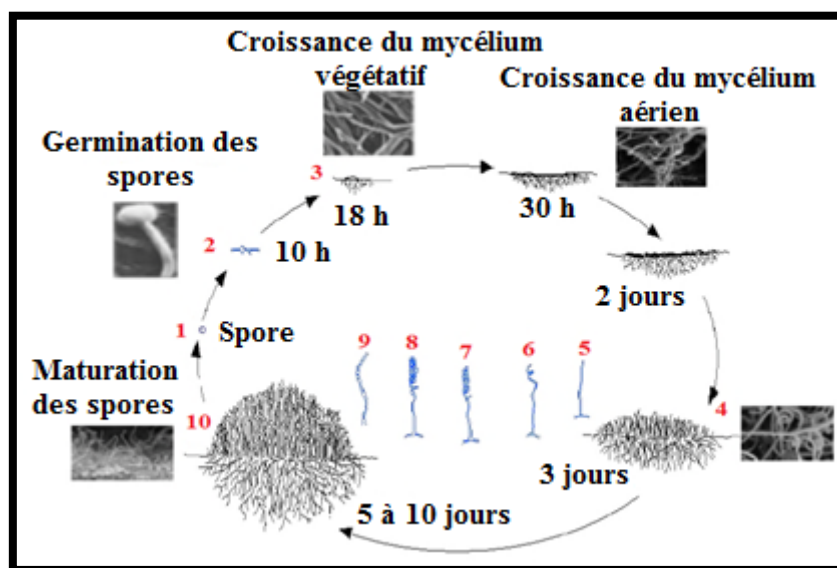


Figure 1 : Cycle de développement du genre *Streptomyces* (Hopwood et al., 1985)

2. Importance des actinobactéries

2.1. En agronomie

Les actinobactéries ont un intérêt particulier dans l'agriculture car ils possèdent de nombreuses propriétés qui pourraient bénéficier à la croissance des plantes comme les auxines,

les cytokinines et les gibbérellines, ou produire des sidérophores afin de lier les ions Fe^{3+} et aider à améliorer l'absorption des nutriments (Compant et al., 2005; Kannan et Sureendar, 2008; Sun et al., 2009; Nimnoi et al., 2010) par conséquent, protéger les racines contre l'attaque des phytopathogènes (Kekuda et al., 2013).

Au sein des actinobactéries, les streptomycètes jouent un rôle important dans le sol en raison de leur métabolisme qui comprend la dégradation des polymères et complexes insolubles, tels que la lignocellulose et la chitine, qui sont les plus abondants dans la nature (Bentley et al., 2002), ainsi que la dégradation des matières organiques complexes en compost, sol ou sédiments en produisant plusieurs biocatalyseurs tels que les protéases, les cellulases, les amylases, les gélatinases, les pectinases, les uréases, les amidases, les estérases et les lipases, qui rend les streptomycètes des microorganismes essentiels dans le recyclage du carbone (Eusta et al., 2005).

2.2. En biotechnologie

La biotechnologie environnementale, connue sous le nom de la bioremediation, peut être définie comme «l'utilisation des organismes vivants pour nettoyer les polluants du sol, de l'eau ou des eaux usées » (EPA, 2016). Actuellement, les membres du phylum *Actinobacteria* sont étudiés pour leur efficacité en bioremédiation des pesticides et des métaux lourds (Polti et al., 2014 ; Aparicio et al., 2015). Par ailleurs, les actinobactéries sont d'excellents producteurs d'enzymes ayant des applications biotechnologiques multiples (Tableau I) (Tanaka et Omura, 1990 ; Vonothini et al., 2008).

Tableau I : Quelques exemples d'enzymes produites par les actinobactéries

Enzyme	Espèce	Application en biotechnologie	Référence
Cellulase	<i>Streptomyces craterifer</i>	Les industries des pâtes et papier, les textiles, le vin et le brassage. Le traitement des peaux animales.	Gobalakrishnan et al., (2016)
Xylanase	<i>Streptomyces</i> sp.	Industrie des pâtes et du papier. Clarification de jus de fruit.	Rosmine et al.,(2017)
Amylase	<i>Streptomyces</i> sp.	Industries de distillation. Saccharification de l'amidon.	Chakraborty et al., (2009)
Lipase	<i>Actinomadura</i> sp	Le traitement des graisses et des huiles. Industries cosmétiques	Taibi et al., (2012)
Protéase	<i>Streptomyces carpaticus</i>	Industrie des textiles, des détergents	Haritha et al., (2012).

Industries laitière et fromagerie

2.3. Dans le domaine pharmaceutique

De nombreux composés bioactifs à diverses activités biologique ont été isolés à partir des actinobactéries comme des molécules dotées de diverses activités telles que antibiotiques, antifongiques, anticancéreux, antitumoraux, anti-inflammatoires, antioxydantes...etc (Tableau II) (Lam, 2006).

Tableau II : Quelques exemples de composés bioactifs produits par les bactéries de l'ordre des *Actinomycetales*

Activité biologique	Substance	Espèce	Autres activités pharmacologiques	Références
Antibactérien	N-acetyl-N-demethylmayamycin	<i>Streptomyces sp.</i>	Antitumorale	Liang et al., (2016)
Antibactérien	Curvularin-7-O- a-d-Glucopyranoside	<i>Pseudonocardia sp.</i>	Anticancéreux	Ye et al., (2015)
Antifongique	Saadamycin	<i>Streptomyces sp.</i>	-	El-Gendy et El-Bondkly, (2010)
Antiviral	Butenolides 1a, 1b, 2, 3, 4	<i>Streptomyces sp.</i>	Cytotoxique	Strand et al., (2014)
Antipaludique	Trioxacarcin A,B and C	<i>Streptomyces ochraceus</i>	Antibactérien Antitumorale	Maskey et al., (2004)
Antipaludique	Cyclomarin A	<i>Streptomyces sp</i>	Anti-Tuberculose	Bürstner et al., (2015)
Antibactérien	Diazepinomicin	<i>Micromonospora</i>	Anti-inflammatoire Antitumorale	Charan et al., (2004)
Antibactérien	2-Allyloxyphenol	<i>Streptomyces sp.</i>	Désinfectant oral	Arumugam et al., (2009)
Antipaludique	Salinosporamide A	<i>Salinispora tropica</i>	Anticancéreux	Prudhomme et al., (2008)

3. Le métabolisme des actinobactéries**3.1. Métabolisme primaire**

Les métabolites primaires des actinobactéries forment la structure cellulaire et permettent le fonctionnement du métabolisme général (Theilleux, 1993). En effet ils servent de précurseurs pour les métabolites secondaires, y compris l'acétyl-CoA, le glucose-6-phosphate, le glycéraldéhyde-3-phosphate, l' α -cétoglutarate et l'oxaloacétate, principalement générés par le métabolisme central du carbone (Rokem et al., 2007).

3.2. Métabolisme secondaire

Les actinobactéries produisent divers métabolites secondaires (Figure 2) (Das et al., 2008). La synthèse de ces derniers commence lorsque la croissance ralentit ou s'arrête (Demain et al., 1983; Doull et Vining, 1990; Augustine et al., 2004). La production de ces métabolites est grandement influencée par divers paramètres de fermentation tels que la disponibilité des nutriments (Augustine et al., 2004, Fourati et al., 2005), le pH et la température (Sujatha et al., 2005), l'agitation (Bode et al., 2002), les sels minéraux (Wang et al., 2003), les ions métalliques (Gesheva et al., 2005), les précurseurs (Omura et Tanaka, 1986), les inducteurs (Cheng et al., 1995) et les inhibiteurs (Bibb, 2005) qui souvent varient d'un organisme à un autre (Iwai et Omura, 1982; Stanbury et al., 1997).

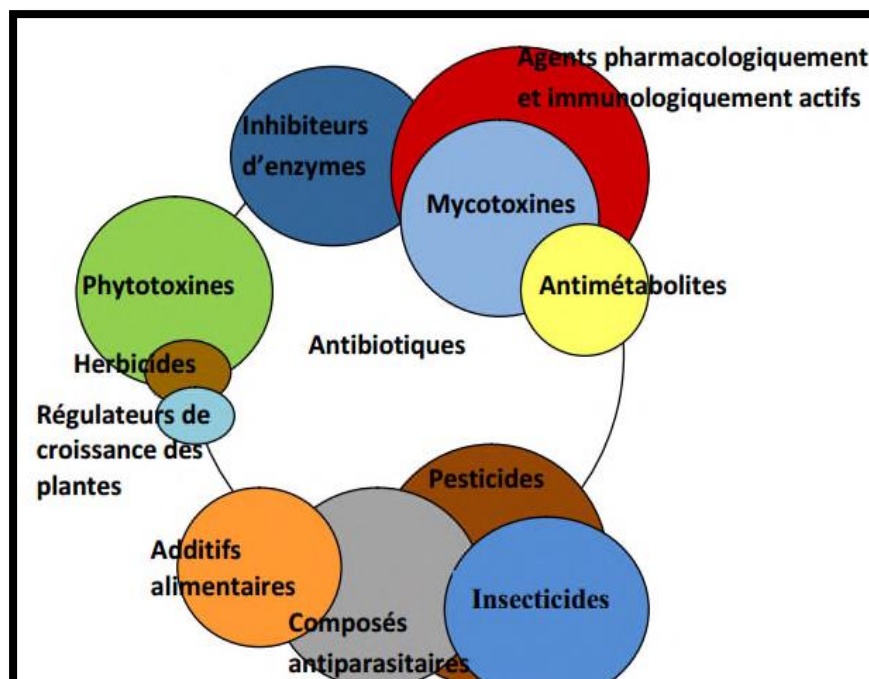


Figure 2: Métabolites secondaires bioactifs produits par les actinobactéries (Conn, 2005)

II. Le potentiel antioxydant

Notre organisme a besoin d'énergie pour fonctionner correctement. Les cellules transforment les nutriments apportés par l'alimentation en énergie et en eau. Cette transformation génère environ 2% de molécules d'oxygène (Edeas, 2005). L'oxygène peut s'avérer délétère en raison de son caractère oxydant, il est à l'origine de la formation de dérivés plus réactifs appelés espèces réactives de l'oxygène (Ichai et al., 2011).

La figure 3 illustre les principales voies de formation des espèces réactives de l'oxygène.

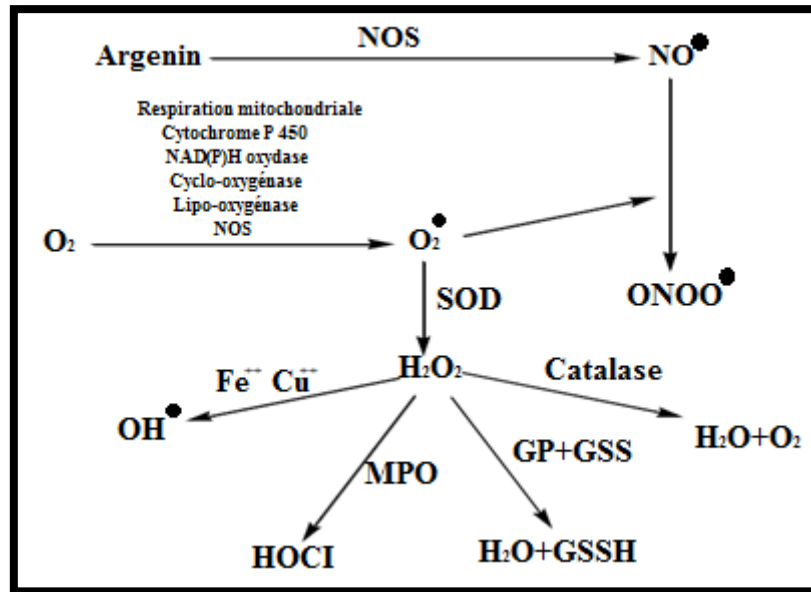


Figure 3: Principales voies de formation des espèces réactives de l'oxygène (Ichai et al., 2011)

1. Les radicaux libres et le stress oxydatif

1.1. Les radicaux libres

Un radical libre est défini comme toute molécule possédant un ou plusieurs électrons non appariés (Jacques et André, 2004). C'est une molécule très instable et réagit rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir la stabilité. Une réaction en chaîne débute lorsqu'un radical libre attaque la molécule stable la plus proche en lui arrachant son électron et la molécule attaquée devient elle-même un radical libre (Martinez-Cayuela, 1995).

Parmi les espèces radicalaires les plus intéressantes se trouvent les espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui sont des radicaux libres qui dérivent de la molécule d'oxygène, par addition d'un électron (Gutteridge, 1993 ; Jacques et André, 2004). Les principales espèces réactives de l'oxygène sont: le radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$, le radical hydroxyl OH^\bullet , le monoxyde d'azote NO^\bullet , mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante : l'oxygène singulet 1O_2 , peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , peroxynitrite $ONOO^-$ (Favier, 2003).

1.2. Le stress oxydatif

Un stress oxydatif survient lorsque l'équilibre est rompu en faveur des radicaux libres. Toutefois, une production excessive de ces molécules réactives ou une insuffisance des mécanismes antioxydants peut déséquilibrer la balance oxydant/antioxydant (Papazian et Roch, 2008).

2. Les antioxydants

Les antioxydants sont des substances qui sont présentes à de faibles concentrations par rapport à un substrat oxydable, capables d'inhiber ou de prévenir son oxydation en éliminant les radicaux libres et en diminuant le stress oxydatif (Leong et al., 2002). Généralement il existe deux types d'antioxydants : les antioxydants enzymatiques naturellement fabriqués par notre organisme et les antioxydants non enzymatiques d'origine alimentaire (Rees et al., 2004; Haleng et al., 2007; Eboh, 2014).

2.1. Les antioxydants enzymatiques

La cellule est pourvue d'enzymes antioxydantes qui sont des systèmes de défense très efficaces. Cette ligne de défense est constituée de la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydases et le système thioredoxine (Figure 4) (Rees et al., 2004 ; Lone et al., 2013). Ces enzymes antioxydantes permettent l'élimination des ERO, selon les réactions suivantes :

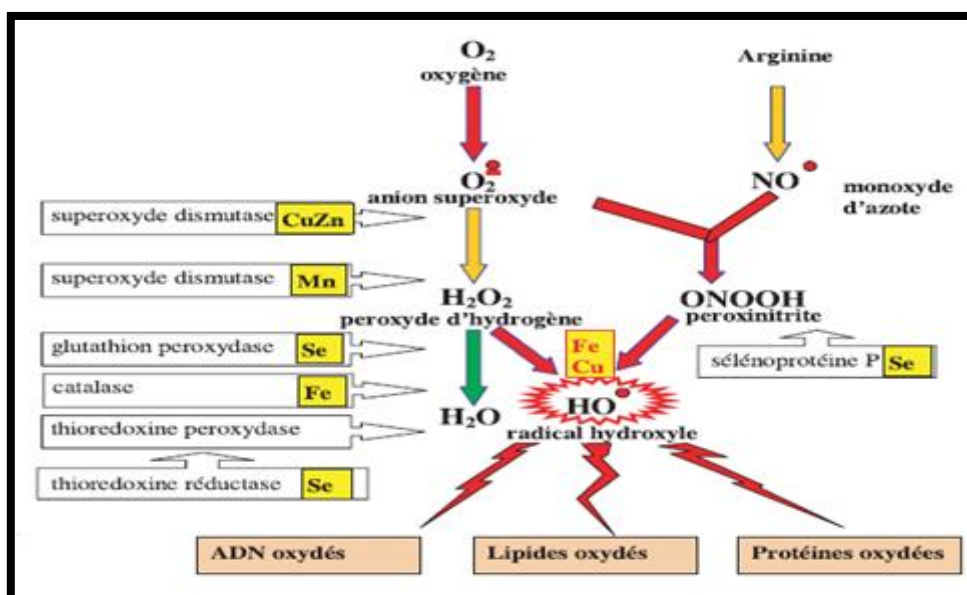


Figure 4: Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques (Favier, 2003).

2.2. Les antioxydants exogènes non enzymatiques

Ce sont des molécules exogènes. Contrairement aux enzymes antioxydantes, une molécule antioxydante piège un seul radical libre (Figure 5). Pour pouvoir fonctionner à nouveau, cette molécule d'antioxydant doit donc être régénérée par d'autres systèmes (Dacosta, 2003).

Plusieurs substances pouvant agir en tant qu'antioxydant in vivo ont été proposées. Elles incluent : la vitamine E (Vamecq, 2004), la vitamine C (Ji et Leichtweis, 1997), le β -carotène

(Haleng et al., 2007)., les flavonoïdes, les composés phénoliques (Haleng et al., 2007 ; Eboh, 2014)...etc.

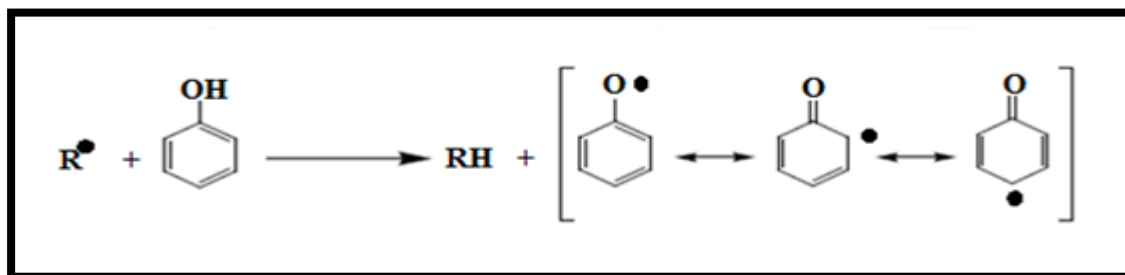


Figure 5 : Mécanisme d'action des composés phénoliques (Berset et Cervelier, 1996)

3. Les molécules antioxydantes chez les actinobactéries

Les actinobactéries produisent un grand nombre de composés bioactifs uniques comme les molécules antioxydantes naturelles (Tableau III) (Hassan et al., 2017).

Tableau III : Exemples de molécules antioxydantes produites par des quelques espèces d'actinobactéries.

Molécules	Espèces	Références
Ageloline A	<i>Streptomyces sp.</i>	Cheng et al. (2016)
5-(2,4-dimethylbenzyl)pyrrolidin-2-one	<i>Streptomyces spp.</i>	Sauvar et Kannabiran, (2011)
2-allyoxyphenol	<i>Streptomyces sp</i>	Arumugam <i>et al.</i> (2010)
Protocatechualdehyde	<i>Streptomyces lincolnensis</i>	Ja kim et al., (2008)
Streptopyrrolidine	<i>Streptomyces sp</i>	Shin <i>et al.</i> (2008)
JBIR-94 et JBIR-125	<i>Streptomyces sp</i>	Kawahara et al. (2012)
5-(2,4-dimethylbenzyl)-2-one (DMBPO)	<i>Streptomyces sp</i>	Saurvar et Kannabiran et al. (2012)

III. Modélisation statistique

1. La méthodologie de surface de réponses (RSM)

La RSM est exploitée pour concevoir des expériences statistiques, modéliser les processus, vérifier la signification statistique des variables indépendantes et obtenir les conditions optimales de fonctionnement de l'ensemble du processus (Salimi et al., 2014 ; Sarfarazi et al., 2015). La méthodologie comporte trois étapes: (i) conception expérimentale,

dans laquelle les variables indépendantes et leurs niveaux expérimentaux sont établis à l'aide de conceptions expérimentales statistiques bien établies, telles que la conception composite centrée (CCD); (ii) modélisation de surface de réponse par analyse de régression; et (iii) l'optimisation du processus en utilisant les modèles de surface de réponse (Liyana-Pathirana et Shahidi, 2005). Le principal avantage de la RSM est la réduction du nombre d'essais expérimentaux nécessaires pour évaluer plusieurs paramètres et leur interactions (Khuri et Mukhopadhyay, 2010, Yin et al., 2011).

2. Plan composite centré (CCD)

Les plans composites centrés, s'avèrent particulièrement utiles dans les expériences séquentielles (Goupy et Creighton, 2006). Le plan se compose généralement d'une conception factorielle complète 2^k (Kuehl, 2000) qui consiste à réaliser les essais d'un plan factoriel, complété par des expériences au centre du domaine d'étude et des essais en étoile. La figure 6 présente un plan composite pour deux facteurs (Goupy, 2006). Les points A, B, C et D sont les points expérimentaux d'un plan 2^k . Le point E est le point central. Ce point peut être répliqué une ou plusieurs fois. Les points F, G, H et I sont les points axiaux forment le plan en étoile (Ozil, 1997; Goupy, 1999).

Le nombre N , des essais d'un plan composite est donné par la relation suivante (keharom et al., 2016). $N = N_f + N_0 + N_\alpha$

Avec :

- N_f essais d'un plan factoriel ;
- N_0 points au centre ;
- N_α points en étoile.

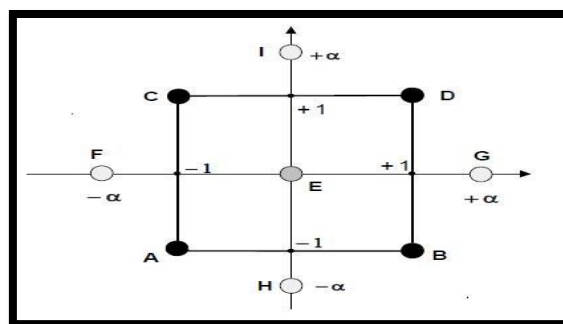


Figure 6 : Plan composite pour l'étude de deux facteurs ($k=2$) (Goupy, 2006)

Le modèle mathématique postulé utilisé avec les plans composites est un modèle du second degré avec interactions (Shivakumar et al., 2008). Ainsi pour deux facteurs ($k=2$), l'équation de régression s'écrit :

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + \varepsilon$$



Matériel et méthodes

I. Matériel

1. Matériel analytique

Le matériel utilisé dans cette étude est rapporté en annexe I

2. Souche d'actinobactérie étudiée

L'isolat d'actinobactérie (MM1) étudiée dans cette étude appartient à la collection du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA) de l'Université A. Mira de Bejaia.

La souche est d'origine marine, elle a été isolée par Dr. Djinni Ibtissem à partir d'une algue brune marine du genre *Fucus*, récoltée dans la région de Bejaïa.

II. Méthodes

1. Repiquage de la souche MM1

La souche MM1 étudiée a été repiquée, à partir d'une culture sur milieu solide conservée à 4°C, sur les milieux Amidon Caséine Agar (SCA) additionné de 50% d'eau de mer (Williams et Kuster, 1964) et Mincer 50% eau de mer (MEM) (Mincer et al., 2002). Les boîtes de pétri ont été incubées à 28°C pendant 7 à 10 jours.

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

2. Etude morphologique de la souche MM1

2.1. Caractères macromorphologiques

Cette étude consiste à déterminer la forme et la taille des colonies; la couleur des mycelia aérien (MA) et de substrat (MS), la production ainsi que la couleur des pigments solubles produits sur les différents milieux de culture préconisés par « l'international *Streptomyces* project » (ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ISP6, ISP7) (Shirling et Gottlieb, 1966). Les boîtes sont incubées à 28°C et les observations sont effectuées après 7, 14 et 21 jours de culture.

La composition des milieux ISP utilisés est donnée en Annexe II.

2.2. Caractères micromorphologiques

La souche MM1 cultivée sur milieu SCA50% eau de mer a été observée à l'aide d'un microscope optique à deux grossissements (X40 et X10). L'analyse est réalisée directement sur boîtes de Petri afin d'étudier les mycelia en place sans altérer les structures et ce pour :

- Etudier la fragmentation ou non du mycélium du substrat.

- Observer la formation des spores sur le MA et/ ou du substrat, leur forme et leur agencement (isolées, en chaînes) ainsi que la surface des spores (lisse, rugueuse, épineuse ou chevelue).
- Etudier la présence et / ou l'absence ainsi que l'abondance et la disposition des hyphes du MS ou du MA (Williams et al., 1989).

3. Mise en évidence de l'activité antioxydante

3.1. Culture de la souche et obtention de l'extrait brut

Dans le but d'obtenir l'extrait brut de la souche MM1 nécessaire à notre étude, une culture sur milieu solide a été entreprise. En effet, la souche MM1 est ensemencée en stries serrées à la surface du milieu SCA50% eau de mer sur 5 boîtes de Petri. Les boîtes sont mises à incuber à 28°C pendant 7 jours.

3.2. Extraction des molécules actives

Après la culture, l'extraction des molécules actives est réalisée par macération. Pour cela, les mycélia et les géloses sont découpés en petits morceaux de 1 cm² puis introduits dans un Erlenmeyers additionné de 250 ml d'acétate d'éthyle. Le mélange est mis à macérer sous agitation permanente durant toute une nuit à température ambiante.

L'extrait brut est obtenu après filtration à travers du papier Wattman N°1 afin de séparer le solvant des blocs de gélose et du mycélium, puis évaporés à sec en utilisant un Rotavapor. L'extrait sec obtenu est par la suite récupéré dans 5 mL de méthanol et la concentration massique déterminée. L'extrait est conservé à l'abri de la lumière et à 4°C pour une utilisation ultérieure.

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

3.3.1. Principe de la méthode

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et phosphomolybdique (H₃PMO₁₂O₄₀). Il est réduit par les phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (Junaid et al., 2013). La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits (Boizot et Charpentier, 2006).

3.3.2. Mode opératoire

Le dosage des polyphénols totaux présentes dans l'extrait est réalisé par la méthode de Folin-ciocalteu (Singh et al., 2016).

Une prise d'essai de 250 μ L de la solution mère de l'extrait (1/10), à laquelle est ajouté 250 μ L de réactif de Folin-Ciocalteu fraîchement préparé (dix fois dilué) et 2000 μ L 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 déterminée à une longueur d'onde de 765 nm après centrifugation. Le blanc est préparé en parallèle, représenté par le méthanol en suivant le même protocole.

L'acide gallique, utilisé comme étalon à différentes concentrations et utilisé dans les mêmes conditions opératoires que celles des échantillons, servira à la quantification des polyphénols.

Les résultats sont exprimés en microgrammes équivalents d'acide gallique par millilitre (μ g EQ AG/mL).

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

3.4.1. Principe de la méthode

Le radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est l'un des radicaux azotés organiques les plus stables, qui porte une couleur pourpre. C'est une méthode colorimétrique basée sur la perte de couleur à 515 nm due à la réduction du DPPH (Figure 7). La concentration en antioxydants est proportionnelle à la baisse de l'absorbance due à la diminution de l'intensité de la coloration de la solution DPPH. Cette concentration sera donc calculée en pourcentage:

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

Où :

Abs T : Absorbance de témoin après 30 min

Abs Ech : Absorbance d'extrait après 30 min

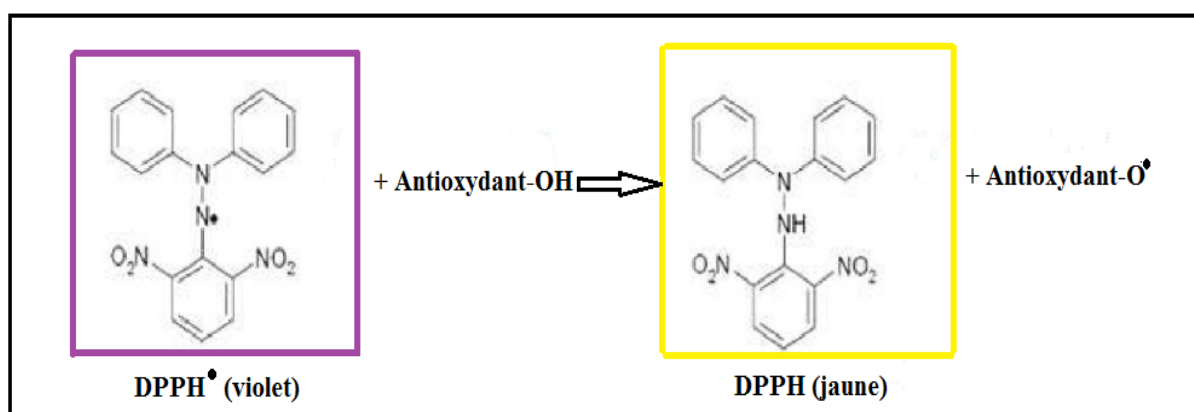


Figure 7 : Réaction entre un antioxydant et le radical DPPH (Molyneux, 2004)

3.4.2. Mode opératoire

L'activité anti-radicalaire envers le radical DPPH est mesurée selon la méthode de Popovici *et al.*, (2009).

Une prise d'essai de 50 μL d'extrait brut est ajoutée à 1950 μL d'une solution méthanolique de DPPH. Le mélange est soumis à une agitation au vortex, puis une incubation à l'obscurité pendant 30 minutes et à température ambiante. La lecture de l'absorbance est effectuée à 517 nm.

Le blanc est représenté par le méthanol et est préparé en suivant le même protocole.

L'évaluation de l'activité antioxydante en utilisant la méthode DPPH est exprimée en $\mu\text{g EQ TLX/ml}$. Une courbe d'étalonnage réalisée pour le Trolox à différentes concentrations et dans les mêmes conditions opératoires que celles des échantillons servira à la quantification de l'activité antioxydante.

4. Modélisation de la production des polyphénols totaux et de l'activité antioxydante par la souche MM1

Le plan composite centré (CCD) a été utilisé pour examiner les effets des trois variables: pourcentage en eau de mer (X_1), le solvant d'extraction (X_2) et la température d'extraction (X_3). Les variables indépendantes codées utilisées dans le modèle RSM sont répertoriées dans le Tableau IV.

Tableau IV : Valeurs extrêmes des paramètres opératoires étudiés.

Les paramètres opératoires	Symbole	Niveau				
		$-\alpha$	- 1	0	+ 1	$+\alpha$
Pourcentage en eau de mer	X_1	0%	25%	50%	75%	100%
Solvant d'extraction	X_2	HEX	DCM	AE	Acétone	MTOH
Température d'extraction	X_3	5	15	25	35	45

Note : Hex : hexane, DCM : dichlorométhane, AE : acétate d'éthyle, MTOH : méthanol

Vingt milieux de culture ont été préparés avec variation des facteurs opératoires. La matrice d'expériences pour $k=3$ et $N= 20$ ($N= 2^3 + 2(3) +6$) pour la teneur en polyphénols totaux et l'activité antioxydante est représentée dans le tableau V.

Tableau V : Matrice des expériences du plan composite centré pour k=3 (trois facteurs)

Numéro d'essai	Eau de mer (%)	Solvant d'extraction	Température d'extraction			
				X ₁	X ₂	X ₃
1	25%	DCM	15	-1	-1	-1
2	75%	DCM	15	+1	-1	-1
3	25%	Acetone	15	-1	+1	-1
4	75%	Acetone	15	+1	+1	-1
5	25%	DCM	35	-1	-1	+1
6	75%	DCM	35	+1	-1	+1
7	25%	Acetone	35	-1	+1	+1
8	75%	Acetone	35	+1	+1	+1
9	50%	AE	25	0	0	0
10	50%	AE	25	0	0	0
11	50%	AE	25	0	0	0
12	50%	AE	25	0	0	0
13	50%	AE	25	0	0	0
14	50%	AE	25	0	0	0
15	0%	AE	25	-α (1.68)	0	0
16	100%	AE	25	+α (1.68)	0	0
17	50%	Hex	25	0	-α (1.68)	0
18	50%	MTOH	25	0	+α (1.68)	0
19	50%	AE	5	0	0	-α (1.68)
20	50%	AE	45	0	0	+α (1.68)

Note : Hex : hexane, DCM : dichlorométhane, AE : acétate d'éthyle, MTOH : méthanol



Résultats et discussion

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Mycologie de l'Université A. Mira de Bejaia durant la période allant du 05/02/2018 au 08/04/2018.

Dans ce chapitre, seront présentés les résultats et les discussions relatives à l'étude de l'optimisation de la production des polyphénols totaux et de l'activité antioxydante, produits par la souche d'actinobactéries *Streptomyces* sp. MM1, à travers la description de l'élaboration d'un modèle mathématique par le biais d'un plan composite centré. Par ailleurs, il sera question de l'étude des caractères morphologiques de la souche MM1 étudiée.

I. Etude des caractéristiques morphologiques de la souche MM1

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.

1. Etude des caractères macromorphologiques

Les propriétés culturales de l'isolat MM1 cultivé sur différents milieux est rapportée dans le tableau VI ci-dessous.

Tableau VI : Etude des caractères macromorphologiques et culturaux de la souche MM1 après 21 jours d'incubation à 28°C.

Milieu de culture	Croissance	Couleur du mycélium aérien	Couleur du mycélium de substrat	Production de pigments diffusibles et mélaniodes	Aspect des colonies
SCA 50% EM	+++	Beige crème	Marron	+ Marron	Aspect de craie
MEM 50%	+++	Beige avec une teinte verte	Marron clair	-	Colonies aplatis à aspect de craie
ISP 1	+++	Blanc	Jaune	-	Colonies rugueuses
ISP 2	+++	Vert-crème	Jaune foncé	-	Colonies rugueuses
ISP 3	+++	Vert-crème	Marron	-	Colonies rugueuses
ISP 4	+	Beige	Blanc	-	Petite colonies à aspect de craie
ISP 6	+++	Blanc	Jaune foncé	-	Colonies rugueuses
ISP 7	+++	Beige avec une teinte verte	Blanc	-	Petite colonies, bombées, à aspect de craie

Note : +++ : Croissance abondante ; + : Croissance faible ; - Absence de production de pigments

D'après les résultats rapportés dans le tableau VI, il est clairement remarqué que la souche MM1 présente une croissance abondante sur tous les milieux à l'exception de l'ISP4. En effet, les colonies présentent généralement un aspect de craie et rugueux sur tous les milieux étudiés. L'isolat est de croissance rapide sur les milieux ISP1 et ISP2 (3 jours d'incubation) alors que le développement est plus lent sur le reste des milieux testés. Par ailleurs, la couleur des mycéliums aériens varie du blanc-vert au beige en fonction du milieu de culture considéré alors que celle des mycéliums du substrat semblent varier du jaune foncé au marron.

La souche MM1 produit des pigments diffusibles de couleur marron sur le milieu SCA 50% EM. Toutefois, leur absence a été observée sur le reste des milieux testés ainsi que les pigments mélanoides sur le milieu ISP6 et ISP7. Les actinobactéries sont connues pour leur capacité à produire plusieurs pigments qui sont habituellement bruns à noirs et possédant des applications aussi bien en cosmétologie qu'en pharmaceutique et en teinturerie (Dastager et al., 2006).

La figure 8 rapporte l'aspect macromorphologique de la souche MM1 sur différents milieux de culture.

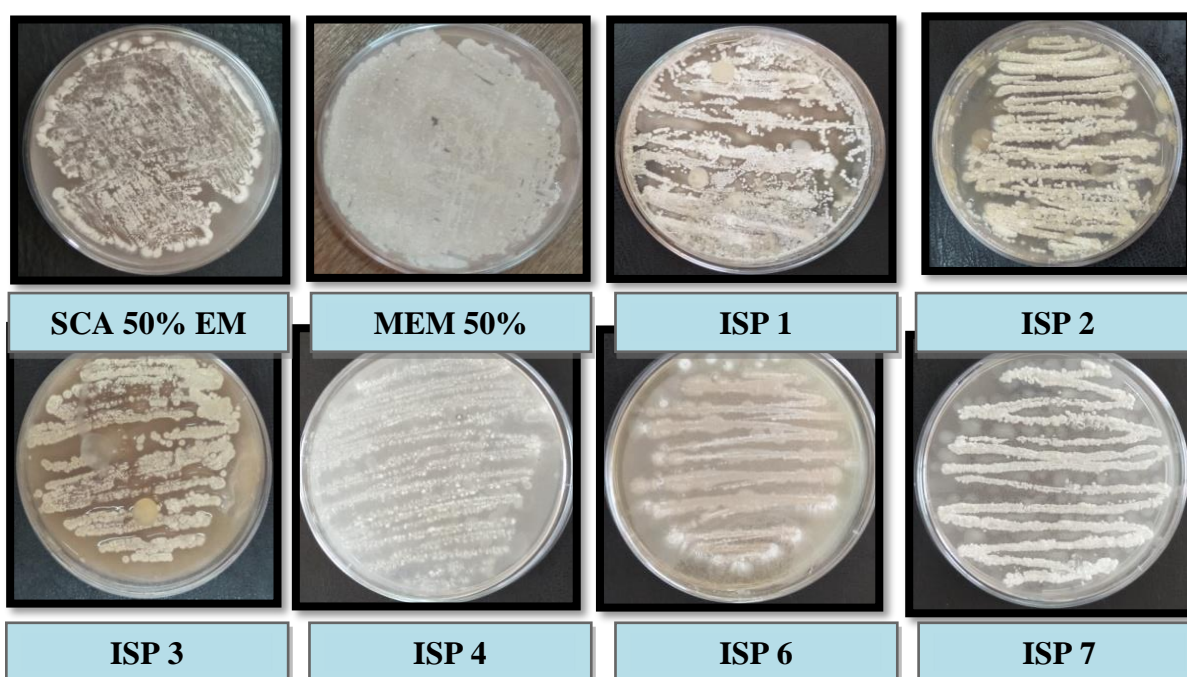


Figure 8 : Macromorphologie de la souche MM1 sur différents milieux de culture après 21 jours d'incubation à 28°C.

2. Etude des caractères micromorphologiques

L'appréciation des caractères micromorphologiques de l'isolat MM1 a été réalisée directement sur boîte de Petri sur milieu SCA 50% eau de mer à l'aide d'un microscope optique au grossissement x40 après 14 jours d'incubation à 28°C. Les observations ont permis de

constater que les filaments du mycélium aérien sont ramifiés. Ils sont droits, non cloisonnés et fins avec des surfaces lisses. À l'état de maturation, ces hyphes se fragmentent irrégulièrement en longues chaînes de spores. Les spores individuelles sont de forme ovale, lisses et immobiles, alors que toutes autres structures telles que les sporanges, les synnemata, les sporophores ou encore les sclérotés sont absentes (Figure 9).

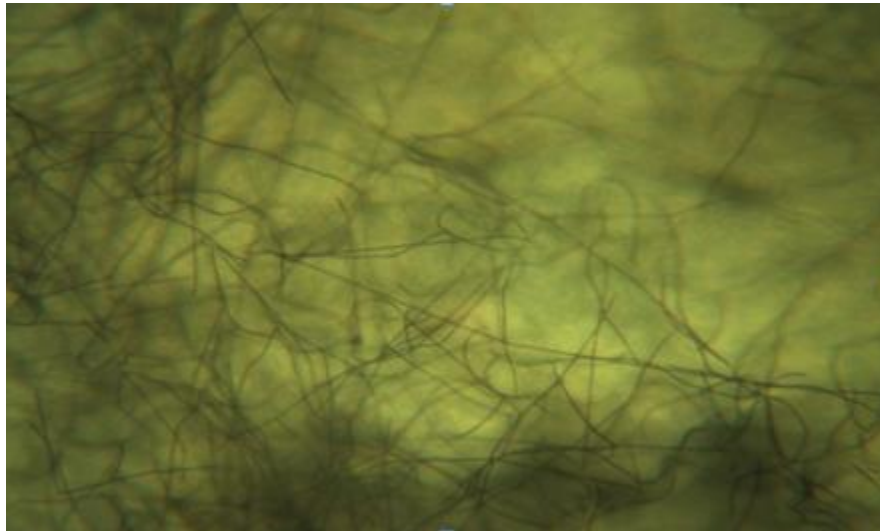


Figure 9 : Observation au microscope optique du mycélium aérien de la souche MM1, cultivée pendant 14 jours à 28°C sur milieu SCA 50% eau de mer, au grossissement x40.

La caractérisation macro et micro morphologique de l'isolat MM1 sur les milieux ISP nous a permis d'affilier la souche MM1 au genre *Streptomyces*, d'où le nom *Streptomyces* sp. MM1 lui a été attribué.

Le genre *Streptomyces* est largement répandu dans la nature. Ils sont retrouvés dans des habitats aussi variés 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) ou on retrouve également des espèces à croissance lente telles que *Streptomyces* sp. *DKDVIT1*, *Streptomyces* sp. *DKDVIT2* et *Streptomyces* sp. *DKDVIT3* sur le milieu SCA 50% EM celles décrits par Deepika et al., (2009), et celles à croissance rapide tels que *Streptomyces* sp. FACC-A032, *Streptomyces filipensis* NRRL 2437, *Streptomyces achromogenes* NBRC 12735 sur milieu ISP2 celles isolées par Okami and Umezawa, (1953); Gordon et Lapa, (1966); Husin et al., (2015), respectivement.

II. Mise en évidence de l'activité antioxydante

En prenant en considération la complexité des processus d'oxydation, le potentiel antioxydant de l'extrait brut de la souche MM1 a été caractérisé en combinant les résultats obtenus sur deux tests différents et complémentaires. Ces derniers sont des tests chimiques et

leur principe repose sur un changement de couleur suivie par la lecture de l'absorbance à des longueurs d'ondes spécifiques pour chaque test.

1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux présents dans l'extrait brut testé 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. La teneur en polyphénols totaux est exprimée en μg EQ Acide gallique/ml.

Le résultat obtenu est rapporté dans la figure 10 ci-dessous.

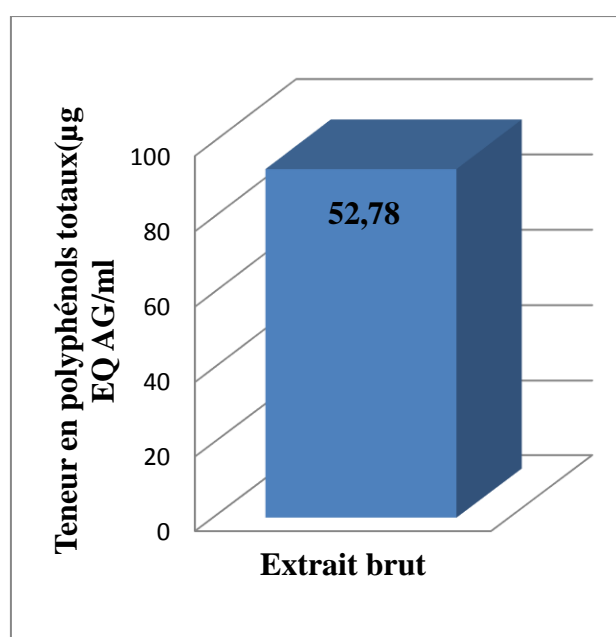


Figure 10 : Teneur en polyphénols totaux de l'extrait brut à l'acétate d'éthyle de la souche de *Streptomyces* MM1.

La figure 10 montre que la teneur en polyphénols totaux de la souche MM1 est de 52,78 μg EQ AG/ml (18,98 mg EQ AG/ g d'ES). Cette teneur est relativement plus importante comparativement à celle rapportée par Sanjivkumar *et al.*, (2016) où la teneur en polyphénols totaux de l'extrait brut d'acétate d'éthyle de la souche *Streptomyces olivaceus* MSU3 était de 0,0421 mg EQ AG/g d'ES, ainsi que celle rapportée par Janardhan *et al.*, (2014) pour quatre composés bioactifs avec des teneurs de 13.62 ± 1.12 ; 13.94 ± 0.98 ; 12.52 ± 1.39 ; et 14.37 ± 1.47 mg EQ AG/g d'ES. La présence des groupes phénoliques dans les métabolites secondaires est considérée comme un élément clé de l'efficacité antioxydante (Markovi *et Manojlovi*, 2010). Cependant, des teneurs plus importantes telles que celle rapporté par Kumar *et al.*, (2014) pour une souche *Streptomyces lavendulae* SCA5 ont été enregistrés et estimés à 577,12 mg d'équivalents GAE / g d'ES.

Par ailleurs, l'étude effectuée par Lertcanawanichakul *et al.* (2014) sur des extraits bruts de 3 souches de *Streptomyces*, a rapporté la variation de la teneur en polyphénols totaux en fonction du type de solvant utilisé enregistrant des valeurs de 0.24 ± 0.02 mg EAG /g d'ES pour l'extrait à l'acétate d'éthyle et 0.00 ± 0.00 mg/g d'ES pour les deux autres extraits bruts méthanoliques et à l'hexane des 2 autres souches.

2. Piégeage du radical DPPH et évaluation de l'activité antioxydante

L'effet des antioxydants sur le radical DPPH est dû à leur capacité à donner des électrons. Dans ce test, les antioxydants réduisent le radical DPPH de couleur violette à un composé diphénylpicrylhydrazine de couleur jaune, et l'effet de la réaction dépendra de la capacité donneuse d'électrons des antioxydants.

Une courbe d'étalonnage a été réalisée en utilisant le Trolox comme standard (Annexe III).

L'activité antioxydante de l'extrait brut est rapportée dans la figure 11 ci-dessous.

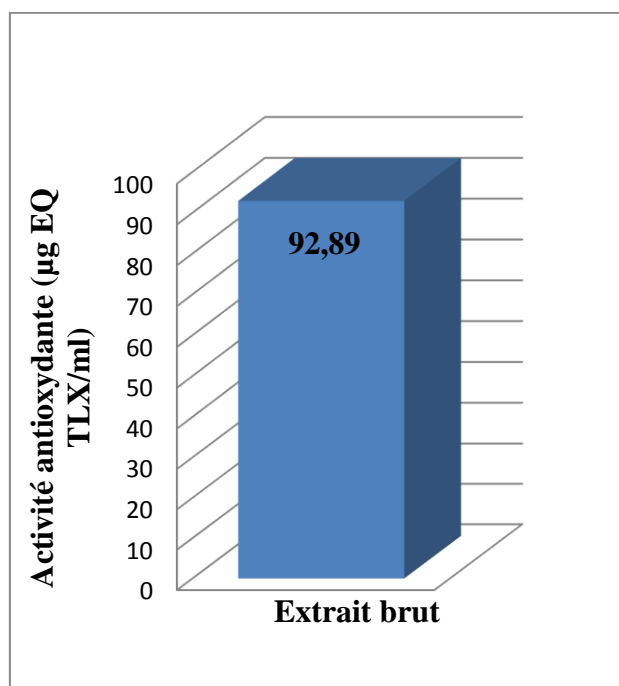


Figure 11 : Activité de piégeage radicalaire de l'extrait brut à l'acétate d'éthyle de la souche de *Streptomyces* MM1.

Le résultat présenté dans la figure 11 indique que l'activité de piégeage radicalaire est de $92,89 \mu\text{g EQ TROLOX/ml}$ (17,26%). Cette activité est relativement faible en comparaison à d'autres études menées sur des extraits bruts d'actinobactéries d'origine marines telles que celle réalisées par Jemimah *et al.*, (2015), Saurav *et* Kannabiran (2014), Thenmozhi *et* Kannabiran (2012) dont les valeurs sont estimées à 85%, 59,32%, 43,20%, respectivement. Par ailleurs, la capacité réductrice d'un composé peut servir d'indicateur significatif de son activité

antioxydante potentielle (Hsu et al., 2006). Il est évident que notre extrait est en mesure de céder des hydrogènes.

Par ailleurs, des recherches ont démontré l'effet du choix du solvant utilisé pour l'extraction dans la mise en évidence de l'activité antioxydante. En effet, l'étude menée par Thenmozhi et al., (2010) sur des extraits bruts acétoniques et à l'acétate d'éthyle d'une souche de *Streptomyces* sp. a démontré la variation de l'activité antioxydante selon le type de solvant considéré. Cette activité est de l'ordre de 96% à 5 mg/ml pour l'extrait à l'acétate d'éthyle et seulement de 22% pour l'extrait acétonique. Des résultats similaires ont été constatés par Lertcanawanichakul et al., (2015) ou des activités antioxydantes des extraits bruts d'acétate d'éthyle et de l'hexane d'une souche de *Streptomyces* ont atteint des valeurs de 50% et 0%, respectivement.

III. Modélisation de la production des polyphénols totaux et de l'activité antioxydante

Après avoir préparé les 20 milieux de culture nécessaires à l'étude, à partir de la matrice générée par le plan d'expérience, la souche étudiée a étéensemencée en stries serrées sur ces derniers.

Les plans composites centrés se prêtent au déroulement séquentiel d'une étude. La première étape consiste à appliquer un plan factoriel complet à deux niveaux avec interactions, complété par des points au centre du domaine d'étude. Quand les tests de validation du modèle pour la teneur des polyphénols totaux et l'activité antioxydante sont négatifs, des essais supplémentaires sont entrepris pour établir un modèle du second degré.

1. Elaboration du modèle de second degré pour la teneur en polyphénols totaux

Les paramètres opératoires (Z_1, Z_2, Z_3) considérés pour la modélisation de la production des polyphénols totaux (Y_1) par la souche MM1 sont respectivement : pourcentage en eau de mer, le solvant d'extraction et la température d'extraction.

Les valeurs des variables naturelles Z_j et codées X_j des différents paramètres opératoires ainsi que les teneurs en polyphénols totaux obtenues pour chaque essai sont regroupés dans le tableau VII, qui représente la matrice des expériences.

Ainsi un plan composite centré comporte trois types de points :

- Les N_f sommets d'un plan factoriel à deux niveaux ($N_f = 2^k$) : $N_f = 8$
- les N_0 points au centre : $N_0 = 6$
- les N_α points « en étoile » ($N_\alpha = 2k$) : $N_\alpha = 6$

Le nombre N des essais d'un plan composite est donné par la relation :

$$N = N_f + N_0 + N_\alpha \text{ pour } N = 20 \text{ essais}$$

Tableau VII : Matrice des expériences de la teneur en polyphénols totaux du plan composite centré pour k=3 (trois facteurs)

N	Z ₁	Z ₂	Z ₃	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁ (µg EQ AG/ml)
1	25%	DCM	15	-1	-1	-1	22,97
2	75%	DCM	15	+1	-1	-1	8,55
3	25%	Acétone	15	-1	+1	-1	59,08
4	75%	Acétone	15	+1	+1	-1	37,50
5	25%	DCM	35	-1	-1	+1	5,56
6	75%	DCM	35	+1	-1	+1	20,41
7	25%	Acétone	35	-1	+1	+1	42,41
8	75%	Acétone	35	+1	+1	+1	47,54
9	50%	AE	25	0	0	0	75,21
10	50%	AE	25	0	0	0	85,68
11	50%	AE	25	0	0	0	52,78
12	50%	AE	25	0	0	0	52,14
13	50%	AE	25	0	0	0	55,98
14	50%	AE	25	0	0	0	51,07
15	0%	AE	25	-α (1.68)	0	0	24,68
16	100%	AE	25	+α (1.68)	0	0	41,24
17	50%	Hex	25	0	-α (1.68)	0	6,20
18	50%	MTOH	25	0	+α (1.68)	0	16,35
19	50%	AE	5	0	0	-α (1.68)	57,59
20	50%	AE	45	0	0	+α (1.68)	184,83

Note : X₀ : variable fictive, Z₁ : pourcentage en EM (%), Z₂ : solvant d'extraction, Z₃ : température d'extraction

La moyenne de la teneur en polyphénols totaux obtenue par le modèle du deuxième degré est:

$\bar{y} = 47,39 \mu\text{g EQ AG/ml}$.

1.1. Calcul des coefficients du modèle

Le calcul des coefficients de l'équation de régression s'obtient à partir du produit suivant :

$$\mathbf{B} = [\mathbf{X}^T \cdot \mathbf{X}]^{-1} \cdot [\mathbf{X}]^T \cdot \mathbf{y}$$

Avec :

[X^T.X]⁻¹ : La matrice de dispersion

[X]^T : La matrice transposée de [X]

Les résultats de ce calcul sont regroupés dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Valeurs des coefficients du modèle de second degré pour la teneur en polyphénols totaux.

Terme constant		Effets linéaires			
b_0	b_1	b_2	b_3		
62,95	0,86	10,71	14,77		

Effets d'interactions quadratiques					
b_{12}	b_{13}	b_{23}	b_{11}	b_{22}	b_{33}
-2,11	6,99	-0,13	-15,46	-23,15	15,80

1.2. Analyse statistique de l'équation de régression

Vérification de la signification des coefficients par le test de Student

La signification des coefficients du modèle est vérifiée par les mêmes calculs réalisés pour le plan factoriel de premier degré, on a la valeur de la variance de reproductibilité pour la teneur en polyphénols totaux $S_{rep}^2 = 214,69$.

Les variances des coefficients du modèle sont obtenues en multipliant les éléments C_{jj} de la diagonale de cette matrice de dispersion par la variance de reproductibilité :

$$S_{bj}^2 = C_{jj} \cdot S_{rep}^2$$

Les valeurs de t_j du test de Student sont rassemblées dans les tableaux IX suivant :

Tableau IX : Valeurs de t_j du modèle de second degré pour la teneur en polyphénols totaux.

Terme constant		Effets linéaires			
t_0	t_1	t_2	t_3		
10,54	0,22	2,70	3,72		

Effets d'interactions quadratiques					
t_{12}	t_{13}	t_{23}	t_{11}	t_{22}	t_{33}
0,41	1,35	0,02	4,00	5,99	4,09

Une fois que les valeurs de t_j sont déterminées, ces dernières sont comparées à la valeur tabulée du test de Student (Annexe IV) réalisé pour un niveau de signification de $\alpha = 0.05$ et un nombre de degrés de liberté $f = n_0 - 1 = 5$. La signification des coefficients du modèle pour les polyphénols totaux exige des valeurs de t_j supérieures à la valeur tabulée $t_{0,05}(5) = 2.57$, pour cela les coefficients du modèle suivants : b_1 , b_{12} , b_{13} , b_{23} , correspondants aux valeurs de t_1 , t_{12} ,

t_{13} , t_{23} , inférieures à 2.57 seront éliminés de l'équation de régression du modèle de second degré.

1.3. Tests de validation de l'équation de régression

Recherche du biais

Avant de valider le modèle postulé, l'absence du biais doit être vérifiée. Pour cela, la variance résiduelle est calculée puis comparée à la variance de reproductibilité par le test de Fisher Snedecor (Ozil *et al.*, 1997).

F est donné par le rapport :

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

$$S_{\text{rés}}^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N - \ell}$$

Avec :

Pour : $N = 20$ et $\ell = 6$

On aura $S_{\text{rés}}^2 = 660,11$ et $F = 3,07$

La valeur tabulée du test de Fisher (Annexe V) pour $F_{0,95}(N-1, n0-1) = F_{0,95}(14,5)$ est entre 5.86 et 5,91. Puisque la valeur F calculée est inférieure à la valeur tabulée, le modèle est considéré sans biais, ce qui signifie que les paramètres étudiés ont réellement une influence sur la production des polyphénols totaux par la souche MM1.

1.4. Test de signification de la régression

Lorsque le modèle est sans biais, nous pouvons effectuer le test de signification de la régression dont le rapport F est donné par la relation :

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

Avec : $\bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^N y_i}{N}$

$\bar{y} = 47,39 \mu\text{g EQ AG/ml}$.

On aura : $F = 6,12$

D'après la valeur tabulée du test de Fisher, $F_{0,95}(\ell - 1, N - \ell) = F_{0,95}(5, 14)$ est égale à 2,96. Comme la valeur calculée est supérieure à celle tabulée, le modèle ainsi obtenu est considéré significatif et valide à 95%.

L'équation de régression d'un modèle du second degré relative à la teneur en polyphénols totaux et est comme suit:

$$\hat{y} = 62,95 + 10,71.X_2 + 14,77.X_3 - 15,47.X_1^2 - 23,15.X_2^2 + 15,80.X_3^2$$

1.5. Tracé des courbes iso réponses et surfaces de réponses

Les figures 12, 13, 14, 15 et 16 suivantes sont les courbes iso-réponses et de surface de réponse de la teneur en polyphénols totaux, tracées en fonction du niveau des variables X_1 (le pourcentage en eau de mer) et X_3 (la température d'extraction) en fixant la variable discrète X_2 (Solvant d'extraction) à différents niveaux (-1,68 ; -1 ; 0 ; +1 ; +1,68).

- Pour $X_2 = -1,68$ (Hexane) l'équation de régression s'écrit comme suit :

$$\hat{y} = -20,37 + 14,77.X_3 - 15,47.X_1^2 + 15,80.X_3^2$$

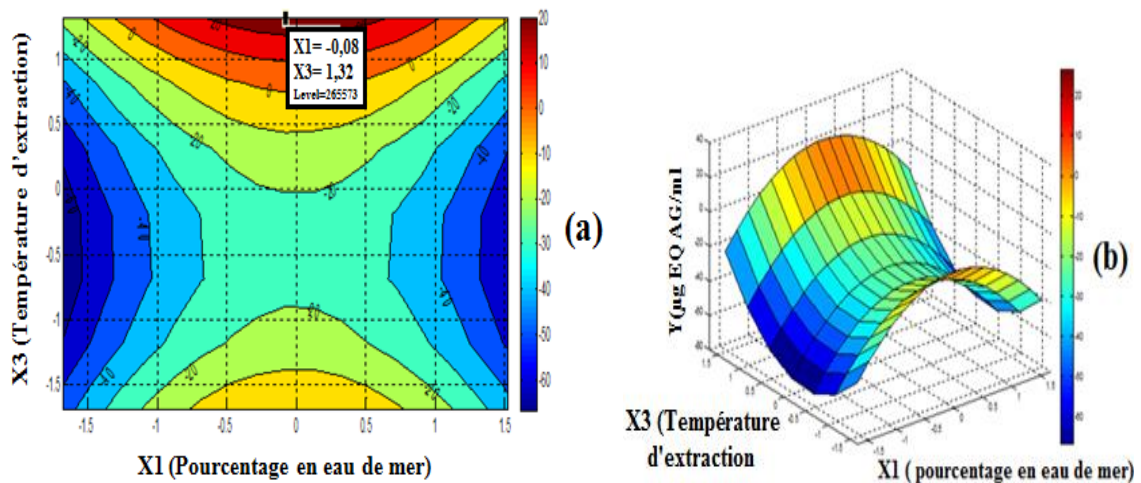


Figure 12 : Courbes iso-réponses (a) et surface de réponse (b) de la teneur en polyphénols totaux pour $X_2 = -1,68$ (Hexane)

L'analyse de la courbe iso-réponse (a) montre qu'une teneur en polyphénols totaux peut atteindre 26,56 µg EQ AG/ml pour un pourcentage en eau de mer égale à 46% ($X_1 = -0,08$) et une température d'extraction ($X_3 = +1,32$) = 38,2°C.

- Pour $X_2 = -1$ (DCM) l'équation de régression s'écrit comme suit :

$$\hat{y} = 29,09 + 14,77.X_3 - 15,47.X_1^2 + 15,80.X_3^2$$

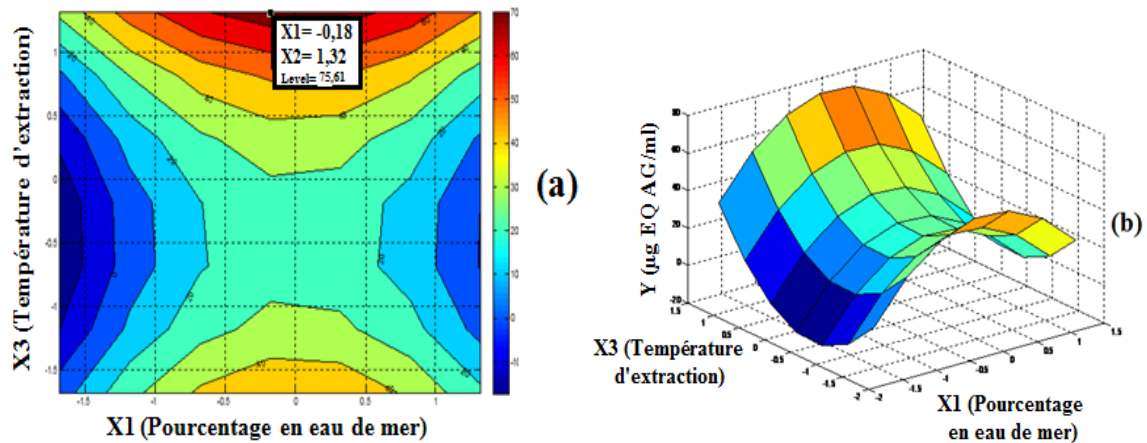


Figure 13 : Courbes iso-réponses (a) et surface de réponse (b) de la teneur en polyphénols totaux pour $X_2 = -1$ (DCM)

La courbe iso-réponse de la figure 13 (a) montre qu’une teneur optimale de 75.61 µg EQ AG/ml en polyphénols peut être obtenue pour 41% d’eau de mer ($X_1 = -0,18$) et une température d’extraction de 38,2°C ($X_3 = +1,32$).

- Pour $X_2 = 0$ (Acétate d’éthyle) l’équation de régression s’écrit comme suit :

$$\hat{y} = 62,95 + 14,77.X_3 - 15,47.X_1^2 + 15,80.X_3^2$$

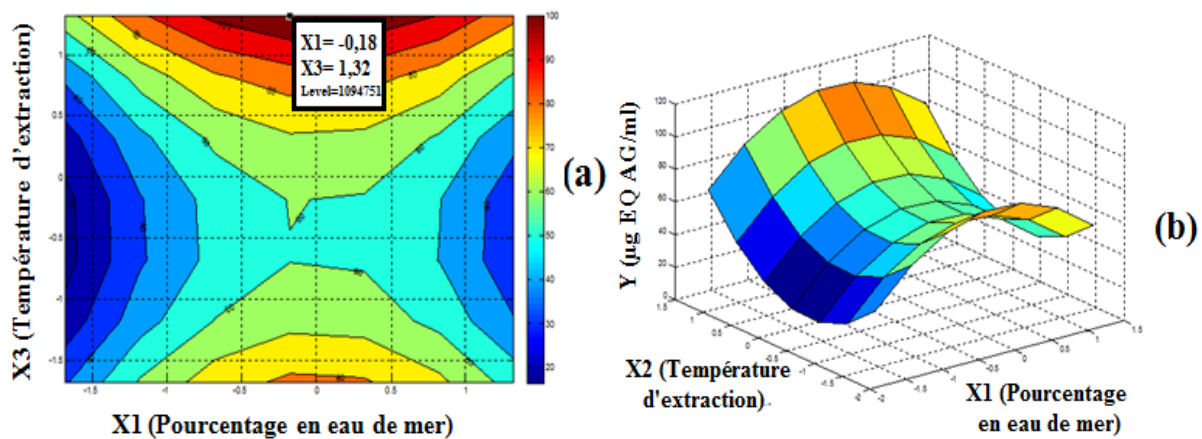


Figure 14 : Courbes iso-réponses (a) et surface de réponse (b) de la teneur en polyphénols totaux pour : $X_2 = 0$ (Acétate d’éthyle)

Sur la figure 14, on note une teneur importante en polyphénols totaux de 109,47 µg EQ AG/ml atteinte pour les mêmes conditions citées en figure 13 (un pourcentage en eau de mer égale à 41% ($X_1 = -0,18$) et une température d’extraction de 38,2°C ($X_3 = +1,32$)).

- Pour $X_1 = +1$ (Acétone) l’équation de régression s’écrit comme suit :

$$\hat{y} = 50,51 + 14,77.X_3 - 15,47.X_1^2 + 15,80.X_3^2$$

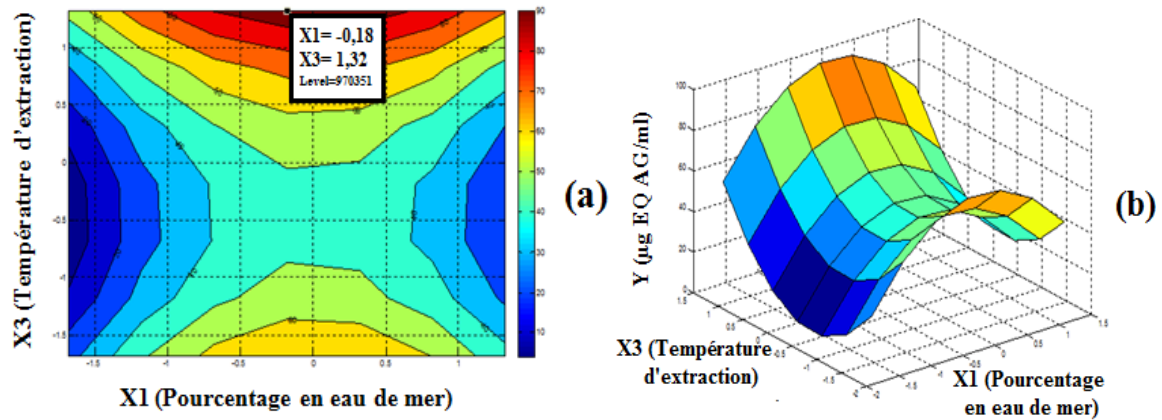


Figure 15 : Courbes iso-réponses (a) et surface de réponse (b) de la teneur en polyphénols totaux pour : $X_2 = +1$ (Acétone)

La courbe (a) indique une teneur en polyphénols totaux optimale de 97,04 µg EQ AG/ml obtenue pour les mêmes conditions citées précédemment (figure 14) (pourcentage en eau de mer = 41%) ($X_1 = -0,18$) et pour une température d'extraction de 38,2°C ($X_3 = +1,32$).

- Pour $X_2 = +1,68$ (Méthanol) l'équation de régression s'écrit comme suit :

$$\hat{y} = 15,61 + 14,77.X_3 - 15,47.X_1^2 + 15,80.X_3^2$$

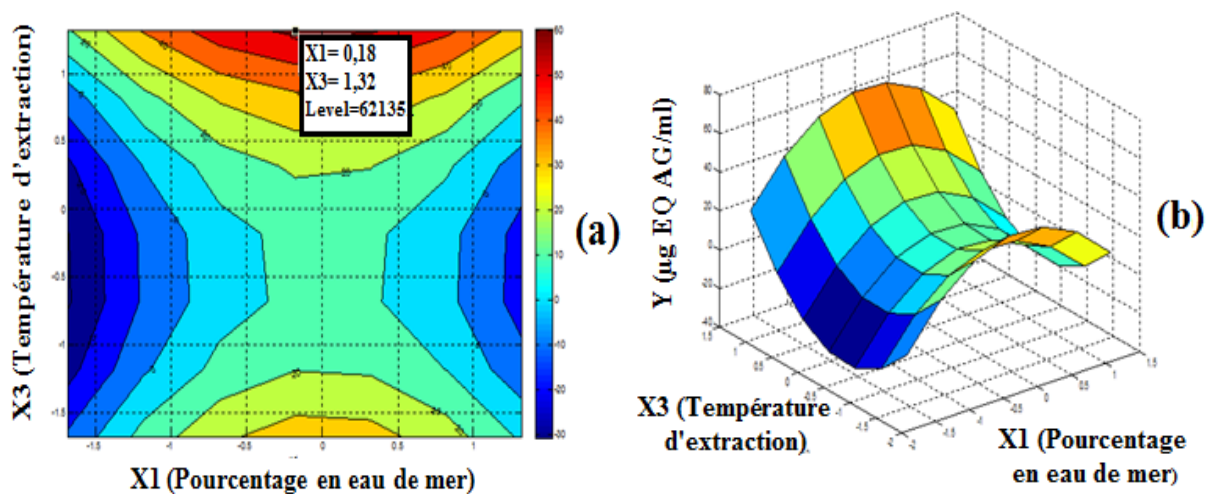


Figure 16 : Courbes iso-réponses (a) et surface de réponse (b) de la teneur en polyphénols totaux pour : $X_2 = +1,68$ (Méthanol)

La courbe iso-réponse de la figure 16 (a) montre une teneur optimale en polyphénols de 62,14 µg EQ AG/ml pour $X_1 = -0,18$ (41% en eau de mer) et $X_3 = +1,32$ (la température d'extraction de 38,2°C).

Suite aux résultats obtenus et d'après les courbes tracées ci-dessus, il y'a lieu de conclure que la meilleure teneur en polyphénols totaux qui est de 109,47 $\mu\text{g EQ AG/ml}$ peut être obtenue en utilisant le méthanol comme solvant d'extraction ($X_2 = 0$), une température d'extraction de 38,2°C ($X_3 = +1,32$) et un pourcentage en eau de mer de 41% ($X_1 = -0,18$).

A la lumière des résultats obtenus, il nous a été possible d'améliorer et d'optimiser la teneur en polyphénols totaux dans l'extrait brut de la souche d'actinobactérie *Streptomyces* sp. MM1 via la RSM par l'application d'un plan composite centré. Cette optimisation nous a permis de doubler la teneur en polyphénols totaux en passant de 52,78 $\mu\text{g EQ AG/ml}$ à 109,47 $\mu\text{g EQ AG/ml}$, avec un pourcentage en eau de mer de 41%, en utilisant l'acétate d'éthyle comme solvant d'extraction et une température d'extraction de 38,2°C.

D'après les courbes iso-réponse et les surfaces de réponse, les facteurs opératoires les plus influents sur la teneur en polyphénols totaux sont le pourcentage en eau de mer (X_1) avec un effet de (-0,18) et la température d'extraction (X_3) avec un effet de (+1,32). Le signe positif de l'effet de la température indique que son augmentation favorise l'accroissement de la teneur en polyphénols totaux. Cependant, le pourcentage en eau de mer (X_1) exerce un effet négatif sur la production de polyphénols ce qui veut dire que l'augmentation du pourcentage en eau de mer de 41% à 46% fait diminuer la production de polyphénols totaux. L'équation de régression montre également qu'il n'existe aucune interaction entre les facteurs opératoires étudiés.

Par ailleurs, au meilleur de nos connaissances, il n'y a pas d'études sur l'optimisation de l'extraction des polyphénols totaux à partir des actinobactéries en utilisant une modélisation statistique (RSM). Cependant, de nombreuses espèces végétales et leurs principes actifs ont été étudiés pour la recherche des antioxydants naturels ayant des propriétés pharmacologiques. En outre, une étude menée par Saci et al., (2017) sur l'optimisation de la teneur en polyphénols totaux à partir de la pulpe de caroube par la RSM où quatre paramètres ont été considérés (concentration de solvant, ration salante, temps et température d'extraction) et l'analyse de surface de réponse a montré que les paramètres d'extraction optimaux étaient de 70,85%, 16,65 mg / 10ml, 101,50 min, 88,35 °C, respectivement. La teneur en polyphénols totaux optimales étaient 2557,96 mg EQ AG / 100g.

2. Elaboration du modèle de second degré pour l'activité antioxydante

Les paramètres opératoires (Z_1 , Z_2 , Z_3) considérés pour la modélisation de l'activité antioxydante (Y_2) par la souche MM1 sont respectivement : pourcentage en eau de mer, le solvant d'extraction et la température d'extraction.

Les valeurs des variables naturelles Z_j et codées X_j des différents paramètres opératoires ainsi que les activités antioxydantes obtenues pour chaque essai sont regroupées dans le tableau X, qui représente la matrice des expériences pour $N= 20$ essais.

Tableau X : Matrice des expériences de l'activité antioxydante du plan composite centré pour $k=3$ (trois facteurs)

N	Z ₁	Z ₂	Z ₃	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₂ (µg EQ TLX/ml)
1	25%	DCM	15	-1	-1	-1	53,08
2	75%	DCM	15	+1	-1	-1	50,24
3	25%	Acétone	15	-1	+1	-1	288,15
4	75%	Acétone	15	+1	+1	-1	77,73
5	25%	DCM	35	-1	-1	+1	61,14
6	75%	DCM	35	+1	-1	+1	37,20
7	25%	Acétone	35	-1	+1	+1	92,65
8	75%	Acétone	35	+1	+1	+1	90,52
9	50%	AE	25	0	0	0	105,21
10	50%	AE	25	0	0	0	102,84
11	50%	AE	25	0	0	0	92,89
12	50%	AE	25	0	0	0	91,00
13	50%	AE	25	0	0	0	100,47
14	50%	AE	25	0	0	0	97,63
15	0%	AE	25	$-\alpha (1.68)$	0	0	91,71
16	100%	AE	25	$+\alpha (1.68)$	0	0	51,90
17	50%	Hex	25	0	$-\alpha (1.68)$	0	32,94
18	50%	MTOH	25	0	$+\alpha (1.68)$	0	74,41
19	50%	AE	5	0	0	$-\alpha (1.68)$	73,22
20	50%	AE	45	0	0	$+\alpha (1.68)$	354,05

Note : X₀ : variable fictive, Z₁ : pourcentage eu EM(%), Z₂ : solvant d'extraction, Z₃ : température d'extraction

La moyenne de l'activité antioxydante des 8 extraites brutes est : $\bar{y} = 93,84 \mu\text{g EQ TLX/ml}$

2.1. Calcul des coefficients du modèle

Les coefficients de l'équation de régression b_j sont obtenus par le produit scalaire de la colonne y par les colonnes X_j correspondantes divisé par le nombre d'expériences N.

Les valeurs de ces coefficients sont regroupées dans le tableau XI.

Tableau XI : Valeurs des coefficients du modèle de second degré pour l'activité antioxydante.

Terme constant		Effets linéaires			
b ₀	b ₁	b ₂	b ₃		
99,01	-22,44	30,57	20,82		

Effets d'interactions quadratiques					
b ₁₂	b ₁₃	b ₂₃	b ₁₁	b ₂₂	b ₃₃
-23,22	23,40	-22,22	-13,66	-20,09	36,59

2.2. Analyse statistique de l'équation de régression

Vérification de la signification des coefficients par le test de Student

Les variances des coefficients du modèle sont obtenues par les mêmes calculs réalisés pour la teneur des polyphénols totaux sachant que la variance de reproductibilité de l'activité antioxydante est : $S_{rep}^2 = 31,24$.

Les valeurs t_j du test de Student sont rassemblées dans les tableaux XII suivant :

Tableau XII : Valeurs de t_j du modèle de second degré pour l'activité antioxydante.

Terme constant		Effets linéaires			
t ₀	t ₁	t ₂	t ₃		
43,43	14,83	20,20	13,76		

Effets d'interactions quadratiques					
t ₁₂	t ₁₃	t ₂₃	t ₁₁	t ₂₂	t ₃₃
11,75	11,84	11,24	9,27	13,62	24,81

Pour le niveau de signification $\alpha = 0,05$ et le nombre de degrés de liberté: $f = n_0 - 1 = 5$, la valeur tabulée du test de Student $t_{0,05}(5)$ est égale à 2,57. D'après les résultats de t_j pour l'activité antioxydante, on remarque que toutes les valeurs de t_j calculées sont supérieures à la valeur tabulée ce qui nous permet de déduire que tous les coefficients b_j sont significatifs. Le modèle ainsi obtenu est considéré significatif et valide à 95%.

L'équation de régressions d'un modèle du second degré relatives à l'activité antioxydant de l'extrait brut de la souche MM1 est rapportée ci-dessus :

$$\hat{y} = 99,01 - 22,44 \cdot X_1 + 30,57 X_2 + 20,82 \cdot X_3 - 23,22 \cdot X_1 \cdot X_2 + 23,40 \cdot X_1 \cdot X_3 - 22,22 \cdot X_2 \cdot X_3 - 13,66 \cdot X_1^2 - 20,09 \cdot X_2^2 + 36,59 \cdot X_3^2$$

2.3. Tracé des courbes iso réponses et surfaces de réponses pour l'activité antioxydante

Les figure 17, 18, 19, 20 et 21 illustrent des courbes iso-réponses et surface de réponse de l'activité antioxydante, tracées dans le plan le plus important X_1 et X_3 (pourcentage en eau de mer et température d'extraction) en faisant varier X_2 à différents niveaux (-1,68, -1, 0, +1, +1,68).

- Pour $X_2 = -1,68$ (Hexane) l'équation de régression s'écrit comme suit :

$$\hat{y} = -9,04 + 16,56.X_1 + 58,14.X_3 + 23,40.X_1.X_3 - 13,66.X_1^2 + 36,59.X_3^2$$

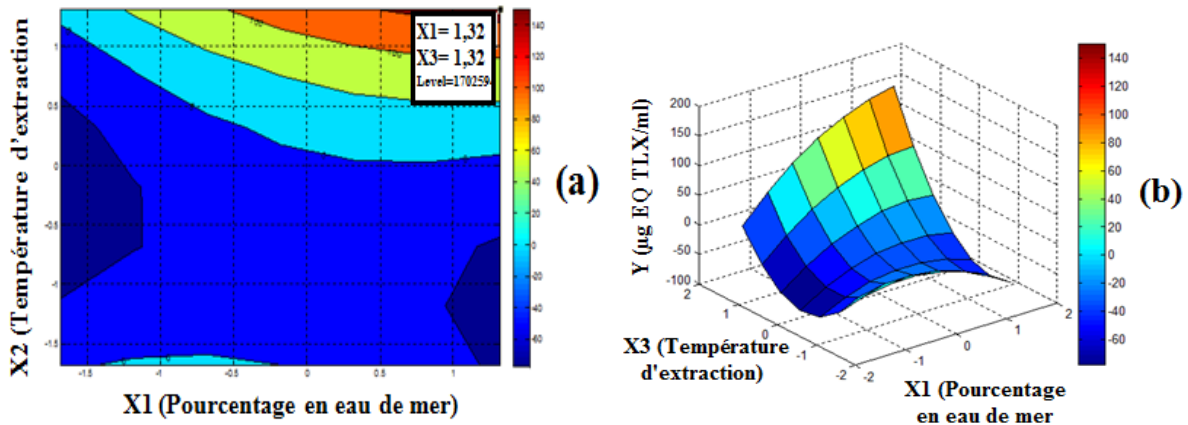


Figure 17 : Courbes iso réponses (a) et surface de réponse (b) de l'activité antioxydante pour : $X_2 = -1,68$ (Hexane)

L'analyse de la courbe iso-réponse présentée en figure17 (a) montre qu'une activité de 170,25 µg EQ TLX/ml peut être atteinte pour un pourcentage de 83 % en eau de mer ($X_1 = +1,32$) et une température de 38,2°C ($X_3 = +1,32$).

- Pour $X_2 = -1$ (DCM) l'équation de régression s'écrit comme suit :

$$\hat{y} = 88,53 + 0,78.X_1 + 43,04.X_3 + 23,40.X_1.X_3 - 13,66.X_1^2 + 36,59.X_3^2$$

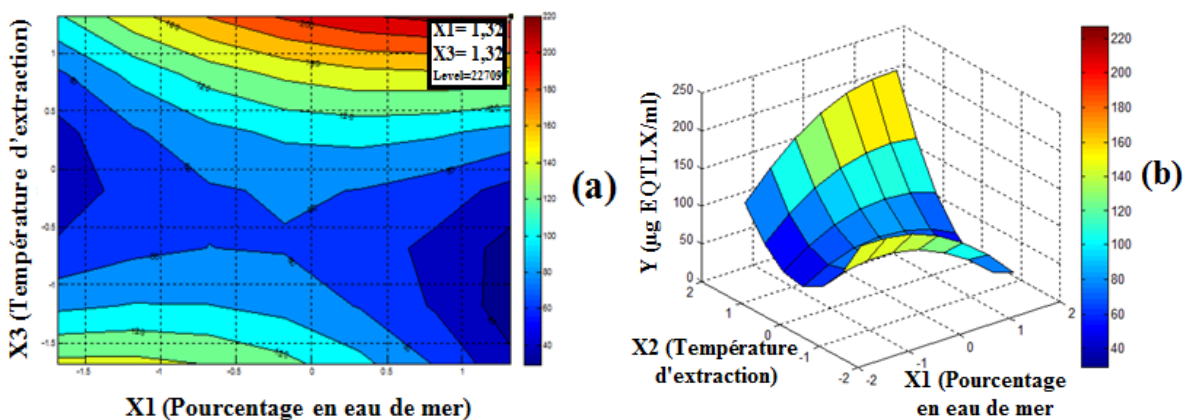


Figure18 : Courbes iso réponses (a) et surface de réponse (b) de l'activité antioxydante pour : $X_2 = -1$ (DCM)

La figure 18 (a) indique qu'une activité de 227,09 µg EQ TLX/ml peut être obtenue pour un pourcentage de 83 % en eau de mer ($X_1 = +1,32$) et une température de 38,2°C ($X_3 = +1,32$).

- Pour $X_2 = 0$ (Acétate d'éthyle) l'équation de régression s'écrit comme suit :

$$\hat{y} = 99,01 - 22,44 \cdot X_1 + 20,82 \cdot X_3 + 23,40 \cdot X_1 \cdot X_3 - 13,66 \cdot X_1^2 + 36,59 \cdot X_3^2$$

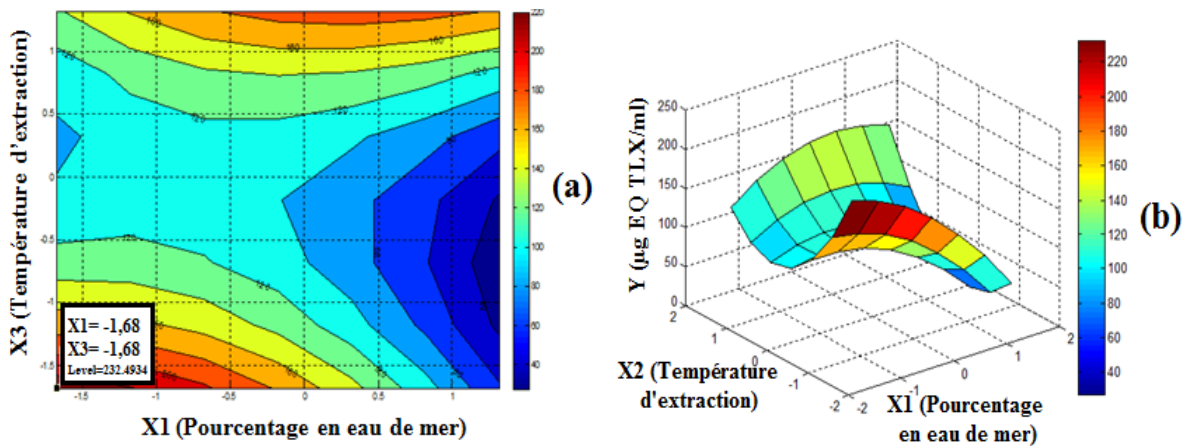


Figure 19 : Courbes iso réponses (a) et surface de réponse (b) de l'activité antioxydante pour : $X_2 = 0$ (Acétate d'éthyle)

La courbe iso-réponse de la figure 19 (a) montre une activité similaire à celle rapportée dans la figure 18 (a) qui est de 232,49 µg EQ TLX/ml mais dans des conditions plus favorables et plus économiques qui sont : un pourcentage de 0 % en eau de mer ($X_1 = -1,68$) et une température de 5°C ($X_3 = -1,68$).

- Pour $X_2 = +1$ (Acétone) l'équation de régression s'écrit comme suit :

$$\hat{y} = 109,49 - 45,66 \cdot X_1 - 1,4 \cdot X_3 + 23,40 \cdot X_1 \cdot X_3 - 13,66 \cdot X_1^2 + 36,59 \cdot X_3^2$$

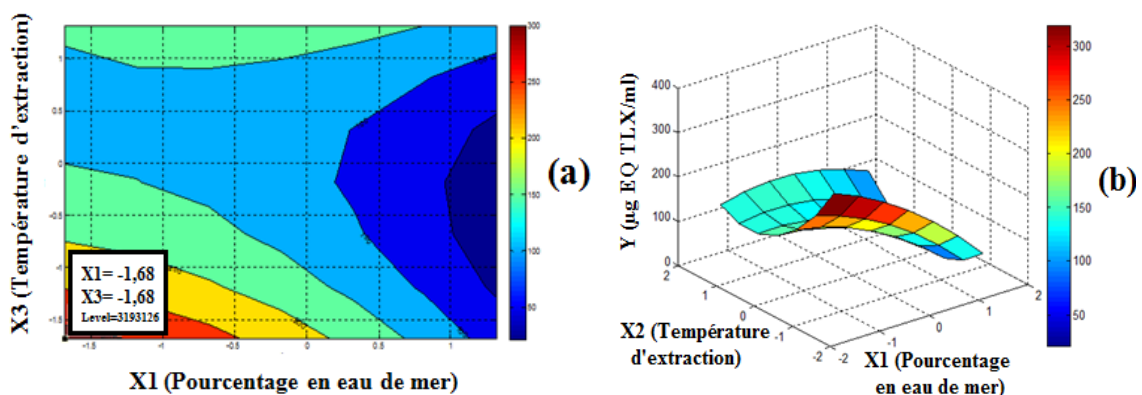


Figure 20 : Courbes iso réponses (a) et surface de réponse (b) de l'activité antioxydante pour : $X_2 = +1$ (Acétone)

La courbe iso-réponse de la figure 20 nous montre que dans les mêmes conditions précédentes : un pourcentage de 0 % en eau de mer ($X_1 = -1,68$) et une température de 5°C ($X_3 = -1,68$), l'activité a augmenté jusqu'à 319,31 $\mu\text{g EQ TLX/ml}$.

- Pour $X_2 = +1,68$ l'équation de régression s'écrit comme suit :

$$\hat{y} = 93,66 - 61,44 \cdot X_1 - 16,5 \cdot X_3 + 23,40 \cdot X_1 \cdot X_3 - 13,66 \cdot X_1^2 + 36,59 \cdot X_3^2$$

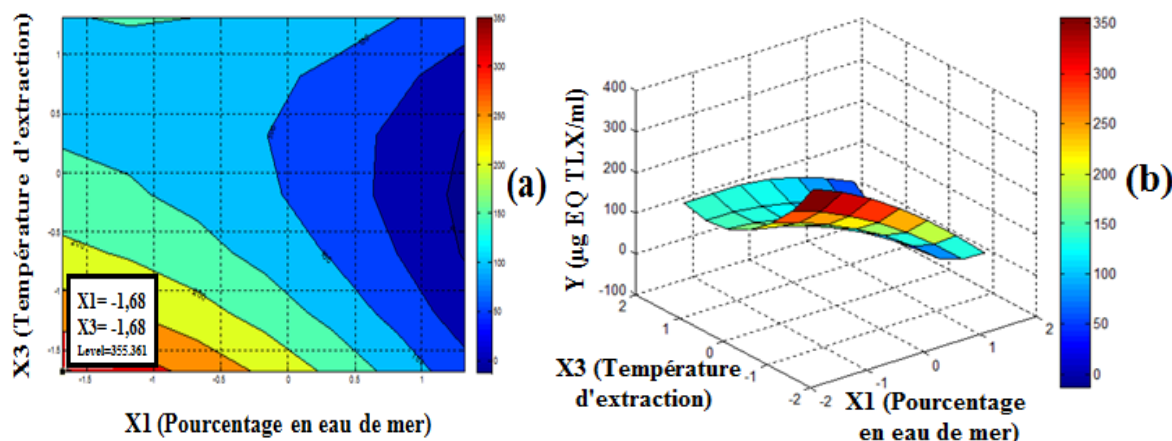


Figure 21 : Courbes iso réponses (a) et surface de réponse (b) de l'activité antioxydante pour : $X_2 = +1,68$ (Méthanol)

La courbe iso-réponse de la figure 21 (a) présente une activité optimale de 355,36 $\mu\text{g EQ TLX/ml}$ dans des conditions plus favorables et plus économiques pour un pourcentage de 0 % en eau de mer ($X_1 = -1,68$) et une température de 5°C ($X_3 = -1,68$).

Selon les résultats obtenus, il a été possible d'améliorer et d'optimiser l'activité antioxydante de la souche d'actinobactérie *Streptomyces* sp. MM1 via la RSM par l'application d'un plan composite centré. Cette optimisation a permis l'augmentation de l'activité antioxydante de trois fois en passant de 92,89 $\mu\text{g EQ TLX/ml}$ à 355,36 $\mu\text{g EQ TLX/ml}$, avec un pourcentage en eau de mer de 0% et une température d'extraction de 5°C, en utilisant le méthanol comme solvant d'extraction.

D'après le modèle de second degré obtenu traduisant l'activité antioxydante, les facteurs opératoires les plus influents sur l'activité antioxydante sont le pourcentage en eau de mer (X_1) avec un effet de (-1,68) et la température d'extraction (X_3) avec un effet de (-1,68). Leurs signes négatifs indiquent que lorsque ces derniers sont à 0% et 5°C respectivement, l'influence est positive sur l'activité antioxydante. Ainsi, d'après les courbes iso-réponses, il a été remarqué que plus la polarité des solvants est importante, plus l'activité antioxydante augmentait ce qui veut dire que le méthanol représente le solvant d'extraction le plus approprié pour la préparation de l'extrait brut de la souche MM1.

Cependant, les activités antioxydantes menées sur des extraits bruts d'actinobactéries sont très limitées en comparaison à celle rapportées sur les principes actifs des plantes. Toutefois, Lee et al., (2014) ont rapporté une activité antioxydante de 81,6% à 500 µg/ml de l'extrait brut d'acétate d'éthyle de l'isolat *Streptomyces sp.* Ainsi, différentes études sont menées sur l'optimisation de l'activité antioxydante des extraits bruts de plantes telles que celle réalisées par Yim et al., (2013) , Makanjuola et al., (2015), Wani et al., (2015), Safaryan et al., (2016), dont les valeurs sont estimées à 85,10%, 95%, 91,165% , 91,03%, respectivement.

Par ailleurs, il est important de signaler que de nombreuses études sont menées pour améliorer les conditions d'extraction des flavonoïdes et des composés phénoliques des herbes médicinales exerçant une activité antioxydante en utilisant l'approche du one-factor-at-a-time (OFAT). En effet, une seule variable est testée pour augmenter la teneur en composés phénoliques et en activité antioxydante (Nishiyama et al., 2010). Cette méthode semble attrayante mais ne permet pas l'étude l'interaction entre les facteurs qui influencent les réponses conduisant à une optimisation non représentative.

A cet égard, la RSM est considérée comme la meilleure approche statistique pour évaluer l'influence de différents facteurs expérimentaux et leurs interactions linéaires et quadratiques sur les réponses analytiques et pour modéliser et optimiser les conditions d'extraction des composés phénoliques qui présentent des activités biologiques importantes (Li et al., 2010 ; Chen et al 2012).

Conclusion

L'objectif visé à travers cette étude est l'optimisation des conditions d'extraction des molécules bioactives pour évaluer la production des polyphénols totaux et l'activité antioxydante par une souche *Streptomyces sp.* MM1 isolée à partir d'une algue brune marine du genre *Fucus* récoltée dans la région de Bejaïa, via la méthodologie de surface de réponse par l'application d'un plan composite centré.

Pour cela, des objectifs ont été fixés et détaillés dans les différentes parties de ce travail:

- La caractérisation macro et micro morphologique de l'isolat MM1 sur les milieux ISP nous a permis d'affilier la souche MM1 au genre *Streptomyces*, ou le nom *Streptomyces sp.* MM1 lui a été attribué.
- L'évaluation du potentiel antioxydant de l'isolat MM1 en adoptant la méthode de Folin-Ciocalteu révèle la présence de quantités moyennement importantes en polyphénols totaux. L'activité antioxydante de l'extrait brut de *Streptomyces sp.* MM1 a été déterminée, par la méthode du piégeage du radical DPPH dont le résultat a montré une activité antioxydante faible.
- La modélisation statistique par le Plan Composite Centré et le tracé des courbes iso-réponses sont consacrés à l'optimisation de la teneur en polyphénols totaux et de l'activité antioxydante sont réalisées par la sélection de trois facteurs : le pourcentage en eau de mer, le solvant d'extraction, la température d'extraction.

Les résultats ont démontré que la température d'extraction influence positivement la teneur en polyphénols totaux de la souche MM1. En outre, l'interaction la plus importante influençant l'activité antioxydante est marquée par le couple (pourcentage en eau de mer - température d'extraction).

D'après le tracé des courbes iso-réponses, les valeurs optimales des paramètres opératoires qui nous ont permis de doubler la teneur en polyphénols totaux en passant de 52,78 $\mu\text{g EQ AG/ml}$ à 109,47 $\mu\text{g EQ AG/ml}$ sont les suivantes : un pourcentage en eau de mer de 41%, en utilisant l'acétate d'éthyle comme solvant d'extraction et une température d'extraction de 38,2°C.

Par ailleurs, un pourcentage en eau de mer de 0% et une température d'extraction de 5°C, en utilisant le méthanol comme solvant d'extraction permet l'augmentation de l'activité antioxydante de trois fois en passant de 92,89 $\mu\text{g EQ TLX/ml}$ à 355,36 $\mu\text{g EQ TLX/m}$.

Au terme de ce travail, les résultats obtenus ouvrent d'autres perspectives et méritent d'être complétés par :

- ❖ Identification moléculaire de l'isolat MM1 et confirmation de sa parenté phylogénique au genre *Streptomyces*.
- ❖ La purification et la caractérisation des molécules à l'origine de l'activité antioxydante.



**Références
bibliographiques**

A

- Allgaier M., Grossart HP. (2006). Diversity and seasonal dynamics of *Actinobacteria* populations in four lakes in northeastern Germany. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3489-3497.
- Andriambololona T. (2010). Etudes biologiques et chimiques des métabolites secondaires des actinomycètes telluriques cas de la forêt d'Ankafobe. Thèse Maîtrise-Sciences. Université d'Antananarivo-Madagascar, Faculté des sciences, 6p.
- Aparicio JD., Simon Sola M.Z., Benimeli CS., Amoroso M.J., Polti M.A. (2015). Versatility of *Streptomyces* sp. M7 to bioremediate soils co-contaminated with Cr(VI) and lindane. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 116, 34-39.
- Arumugam M., Mitra A., Jaisankar P., Dasgupta S., Mukhopadhyay UK., Mukherjee J. (2010). Isolation of an unusual metabolite 2-allyloxyphenol from a marine *actinobacterium*, its biological activities and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 109-117.
- Augustine SK., Bhavsar SP., Baserisalehi M., Kapadnis BP. (2004). Isolation and characterization of antifungal activity of an actinomycete of soil origin. *Indian. J. Exp. Biol.* 42, 928–932.

B

- Badji B. (2006). Etude de la taxonomie et des antibiotiques antifongiques de trois souches d'actinomycètes d'origine saharienne appartenant aux genres *Actinomadura* et *Nonomurea*. Thèse de doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. P.226.
- Balagurunatha R., Radhakrishnan M., Somasundaram ST. (2010). L-glutaminase Producing Actinomycetes from marine sediments-selective isolation, semi quantitative assay and characterization of potential strain. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* 4, 698-705.
- Bas D., Boyaci IH. (2007). Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *J. Food. Eng.* 78, 836-845.
- Benson DR., Silvester WB. (1993). Biology of Frankia strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiol. Rev.* 57, 293–319.

- Bentley S., Chater K. (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2) .Nature. 417, 141–147.
- Berset C et Cervelier ME. (1996). Methods of estimating the degree of lipid oxidation and of measuring antioxidizing power. Science des Aliments, 16, 219-245.
- Bibb MJ. (2005). Regulation of secondary metabolism in Streptomyces. Curr.Opin. Microbiol. 8,208–15.
- Bode HB., Bethe B., Hofs R., Zeeck A.(2002). Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. Chem.Biol.Chem.3, 619–27.
- Boizot N., 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.
- Bürstner N., Roggo S., Ostermann N., Blank J., Delmas C., Schmitt K. (2015). Gift from nature: cyclo marinA kills mycobacteria and malaria parasites by distinct modes of action. Chem.Bio.Chem. 16, 2433.

C

- Cavar S., Kovac F., Maksimovic M. (2012). Evaluation of the antioxidant activity of a series of 4-methylcoumarins using different testing methods. Food.Chem.133, 930-937.
- Chakrabortya S., Khopadea A., Kokarea C., Mahadika K., Chopadeb B. (2009) Isolation and characterization of novel α -amylase from marine *Streptomyces* sp. D1. J. Mol. Cat. B: Enz. 58 , 17–23.
- Charan RD., Schlingmann G., Janso J., Bernan V., Feng X., Carter GT. (2004). Diazepinomicin, a new antimicrobial alkaloid from a marine *Micromonospora* sp. J. Nat. Prod. 67 , 1431–1433.
- Chen B., Zhou W., Ning M., Wang Z., Zou W., Zhang H., Wang Q. (2012). Evaluation of antitumour activity of tea carbohydrate polymers in hepatocellular carcinoma animals. Int. J Biol .Macromol. 50, 1103- 1108.
- Cheng C., Othman EM., Reimer A., Grüne M., Kozjak-Pavlovic V., Stopper H., Hentschel U., Abdelmohsen, UR. (2016). Ageloline A, new antioxidant and

antichlamydial quinolone from the marine sponge-derived bacterium *Streptomyces* sp. SBT345, Tetrahedron Lett.4039,30565-2.

- Cheng JR., Fang A., Demain AL.(1995). Effect of amino acids on rapamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus*. Appl Microbiol Biotechnol. 43,1096–8.
- Compant S., Duffy B., Nowak J., Clément C., Barka EA .(2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. Appl.Environ.Microbiol. 71, 4951–4959.
- Conn VM. (2005). Molecular Interactions of endophytic Actinobacteria in Wheat and Arabidopsis. Thèse de Doctorat. Flinders University. Adelaide, South Australia. pp 297.
- Cruz AG., Faria JAF., Walter EH., Andrade RR., Cavalcanit RN., Oliveira CA., Granato D. (2010). Processing optimization of probiotic yagurt containing glucose oxidase using response surface methodology. J.Dairy.Sci. 93, 5059-5068.

D

- Das S., Lyla PS., Ajmal Khan S. (2008). Distribution and generic composition of culturable marine actinomycetes from the sediments of Indian continental slope of Bay of Bengal. Chin .J.Oceanol.Limnol. 26, 166–177.
- Dastager S., Li WJ., Dayanand A., Tang SK., Tian XP., Zhi XY., Xu LH., Jiang CL. (2006). Separation, identification and analysis of pigment (melanin) production in *Streptomyces*. Afr .J .Biotechnol. 5, 1131–1134.
- De Carvalho CCCR., Pedro F. (2010) Production of metabolites as bacterial responses to the marine environment. Mar.Drugs. 8, 705–727.
- Deepika T., Lakshmiathy ., Kannabiran K.(2009). A Morphological, Biochemical and Biological Studies of Halophilic *Streptomyces* sp. Isolated from Saltpan Environment. Am .J Infect .Dis. 5, 207-213.
- Demain AL., Aharonowitz Y., Martin JF.(1983). Metabolite control of secondary biosynthetic pathways. In: Vining LC, editor. Biochemistry and genetic regulation of commercially important antibiotics. London: Addison-Wesley ,49–67.
- Doull J and Vining L. (1990). Nutritional control of actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A (3) 2: suppressive effects of nitrogen and phosphate. Appl.Microbiol. Biotechnol. 32, 449–454.

E

- Eboh. A S. (2014) . Review Article. Biochemistry of free radicals and oxidants . Scholars .Acad. J .Biosci. 2, 110-118.
- Edeas, M. (2005). Les secrets de santé du thé : c'est naturel, c'est ma santé. Alpen Editions s.a.m., p 18.
- El-Gendy MM., El-Bondkly AM. (2010). Production and genetic improvement of anovel antimycotic agent saadamycin, against dermatophytes and other clinicalfungi from endophytic *Streptomyces* sp. Hedaya 48. J. Ind. Microbiol.Biotechnol. 37, 831–841.
- Embley TM., Hirt RP., Williams DM. (1994). Biodiversity at the molecular level: the domains, kingdoms and phyla of life. Phil. Trans. R. Soc. B. 345, 21–33.
- EPA, (2016). United States Environmental Protection Agency. <https://www3.epa.gov/>
- Eusta´ quio AS., Gust B., Galm U., Chater KF., Heide L., Eusta AS., Li S. (2005). Heterologous Expression of Novobiocin and Clorobiocin Biosynthetic Gene Clusters. Appl. Environ. Microbiol. 71 , 2452–2459.

F

- Favier A. (2003). Le stress oxydant: intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'Act. Chim.108-117.
- Ferreira ICFR., Barros L., Abreu RMV. (2009). Antioxidants in wild mushrooms. Curr. Med.Chem. 16, 1543-1560.
- Fiedler HP., Bruntner C., Bull AT., Ward AC., Goodfellow M., et al . (2005). Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. Anton. Leeuw. 87, 37-42.
- Fourati BFL., Fotso S., Ben Ameer-Mehdi R., Mellouli L., Laatsch H.(2005). Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80. Res.Microbiol.156, 341–347.

G

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

- Gobalakrishnan R., Sivakumar K. (2016). Systematic characterization of potential cellulolytic marine *actinobacteria* *Actinoalloteichus* sp. MHA15. *Biotechnol.Rep.* 13, 30-36.
- Goodfellow M. (2012). Phylum XXVI. Actinobacteria phyl. nov. In: Goodfellow, M., Kampfer P., Busse H.-J., Trujillo M.E., Suzuki K.-I., Ludwig W., Whitman B. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer, United States, 33–35.
- Goodfellow M., Fiedler HP. (2010). A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. *Anton. Leeuw.* 98, 119–142.
- Gordon MA., Lapa E W. (1966). Durhamycin, a pentaene antifungal antibiotic from *Streptomyces durhamensis* sp. *J. Appl. Microbiol.* 14, 754-760.
- Goupy J., Creighton L. (2006). Introduction aux plans d'expériences. 3^{ème} édition : DUNOD. Paris : 324p.
- Goupy J. (1999). Plans d'expériences pour surfaces de réponses. Edition: DUNOD. Paris, 409 p.
- Goupy J. (2006). Les plans d'expériences. *Revue Modulad.* 34, 74-116.
- Granato D., Castro IA., Ellendersen LSN., Masson ML. (2010). Physical stability assessment and sensory optimization of a dairy-free emulsion using response surface methodology. *J.Food.Sci.* 73, 149-155.
- Gutteridge JM. (1993). Free radicals in disease processes: a complication of cause and consequence. *Free Radic. Res. Commun.* 19, 141-158.

H

- Haleng J., Pincemail., Defraigne J O., Harlier CC., Chapelle JP. (2007). Le stress oxydants. *J.Rev.Med.Liege.* 62, 628-638.
- Haritha R., Sivakumar K., Swati A., Jagan Mohan YS., Ramana T. (2012) Characterization of marine *Streptomyces carpaticus* . And optimization of conditions for production of extracellular protease. *Microbiol. J.* 2 , 23–35.
- Hassan SS., Anjum K., Abbas SQ., Akhter N., Shagufta BI., Shah SAA., Tasneem U. (2017) Emerging biopharmaceuticals from marine *actinobacteria*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 49, 34–47.
- Hayakawa M. (2008). Studies on the Isolation and Distribution of Rare Actinomycetes in Soil. *The Society for Actinomycetes Japan.* 22 ,12-19.

- Hoorman J., Islam R. (2010). Understanding soil microbes and nutrient recycling. FACT SHEET. Agriculture and Natural Resources. The Ohio State University, p.1-5.
- Hopwood DA., Bibb MJ., Chater KF., Kieser T., Bruton CJ., Kieser HM., Lydiate DJ., Smith CP., Ward JM., Schrempf H. (1985). Genetic Manipulation of *Streptomyces*, Colney, Norwich NR4, England.
- Hsu B., Coupar IM., Ng K. (2006). Antioxidant Activity of Hot Water Extract from the Fruit of the Doum palm, *Hyphaenethebaica*. Food. Chem. 98, 17-328.
- Husin LS., Krishnasamy G., Azahar MS., Govender HT., Ismail N., Jauri MH., Mutalip SSM, Adenan MI. (2015). Taxonomic characterization and isolation of antitrypanosomal compound from *Streptomyces* sp. FACC-A032 isolated from Malaysian forest soil. Malays. J Microbiol .11, 128-136.

I

- Ichai C., Quintar, H., Orban ., JC. (2011). Désordres métaboliques et réanimation : de la physiopathologie au traitement, Edition Springer, p 427.
- Iwai Y., Omura S.(1982). Culture conditions for screening of new antibiotics. J Antibiot .35, 123–141.

J

- Jacques B., André R. (2004). Biochimie métabolique Ed ellipses .Paris. pp: 217-219-220-223-225.
- Janardhan A., Kumar AP., Viswanath B., Saigopal DVR., Golla Narasimha G. (2014). Production of Bioactive Compounds by Actinomycetes and Their Antioxidant Properties. Biotechnol. Res. Int. 2014 , 8.
- Jemimah Naine S., Devi S., Mohanasrinivasan ., Vaishnavi B. (2015), Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activity of Marine *Streptomyces parvulus* VITJS11 Crude Extract. Braz .Arch .Biol .Technol . 58, 198-207.
- Jensen PR., Gontang E., Mafnas C., Mincer TC., Fenical W. (2005). Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. Environ.Microbiol .7,1039-1048.
- Jensen P.R., Fenical W. (1996) Marine bacterial diversity as a resource for novel microbial products. J.Ind.Microbiol.Biotechnol.17, 346–351.

- Ji L., Leichtweis S. (1997). Exercise and oxidative stress : sources of free radicals and their impact on antioxidant systems. Interdepartmental Program of Nutritional Sciences, and Institute on Aging University of Wisconsin-Madison. 20 , 91-106.
- Junaid S., Rakesh KN., Dileep N., Poornima G., Kekuda TRP., Mukunda S. (2013). Total phenolic content and antioxidant activity of seed extract of *Lagerstroemia speciosa* L. Chem. Sci. Trans. 2, 75–80.

K

- Kannan V., Sureendar R. (2008). Synergistic effect of beneficial rhizosphere microflora in biocontrol and plant growth promotion. J.Basic.Microbiol. 49 , 158–164.
- Kawahara T., Izumikawa M., Otaguro M., Yamamura H., Hayakawa M., Takagi M., Shin-ya K.(2012) . JBIR-94 and JBIR-125, antioxidative phenolic compounds from *Streptomyces* sp. R56-07. J.Nat.Prod. 27;75 , 107-110.
- Keharom S., Mahachai R., Chanthai S. (2016). The optimization study of α - amylase activity based on central composite design-response surface methodology by dinitrosalicylic acid method. Food.Res. Int. Journal. 23, 10-17.
- Kekuda Prashith TR., Rakesh KN ., Syed Junaid ., Dileep N. (2013). Antibacterial and antioxidant activities of *Streptomyces* species Srdp-H03 Isolated from soil of hosudi, Karnataka, India. J. drug.deliv. ther. 3, 47-53.
- Khamna S., Yokota A., Peberdy JF., Lumyong S. (2010). Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp isolated from some Thai medicinal plant rhizospheres soil. .Eurasia. J. Biosci. 4,23-32.
- Khuri AI., Mukhopadhyay S. (2010). Response surface methodology. Wiley.Interdiscip. Rev: Comput. Stat., 2, 128-149.
- Kim KJ., Kim MA., Jung JH. (2008). Antitumor and antioxidant activity of protocatechualdehyde produced from *Streptomyces lincolnensis* M-20. Arch. Pham. Res. 31, 1572-1577.
- Kim SB., Seong CN., Jeon SJ., Bae KS., Goodfellow M. (2004). Taxonomic study of neurotolerant acidophilic actinomycetes isolated from soil and description of *Streptomyces yeochonensis* sp.nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54, 211-214.
- Kitouni M., Boudemagh A., Oulmi L., Reghioua 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. J Mycol Med.15, 45-51.

- Kuehl RO. (2000). Design of experiments : statistical principles of research design and analysis. Edition : Duxbury Press. Pacific Grove : 666p.
- Kumar PS., Al-Dhabi NA., Duraipandiyan V., Balachandran C., Kumar PP., Ignacimuthu S. (2014). In vitro antimicrobial, antioxidant and cytotoxic properties of *Streptomyces lavendulae* strain SCA5 . BMC.Microbiol.. 14, 291.

ℒ

- Lam KS. (2006). Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. Curr.Opin. Microbiol. 9, 245–251.
- Lee SY., Ramirez J., Franco M., Lectez B., Gouzaley M., Barrio R., Mayor U. (2014).Ube 3a,the E3 ubiquitin ligase causing angelman syndrome and linked to antism,regulates protein homeostasis through the proteasomal shuttle Rpn 10. Cell. Molec.Life.Sci. 71, 2747-2758.
- Leong LP., Shui G. (2002) . An investigation of antioxydant capacity of fruit Singapore markets. Food.Chem .76 , 69-75.
- Lertcanawanichakul K ., Pondet J., Kwantep. (2015). In vitro antimicrobial and antioxidant activities of bioactive compounds (secondary metabolites) extracted from *Streptomyces lydicus* A2. J.Appl. Pharm .Sci. 5, 017-021.
- Lertcanawanichakul K.,Chawawisit K., Pondet J., Kwantep .(2014). Quantitation of Total Phenolic Contents of Bioactive Compounds Fractions *Streptomyces* species. Int. J .Pharmtech .Res.7,320-324.
- Li B., Xu Y., Jin YX., Wu YY., Tu YY. (2010) . Response surface optimization of supercritical fluid extraction of kaempferol glycodides from tea seed cake. Ind. Crop. Prod .32, 123-128.
- Liang Y., Xie X., Chen L., Yan S., Ye X., Anjum K., Zhang Z. (2016). Bioactive polycyclic quinones from marine *Streptomyces* sp. 182SMLY. Mar. Drugs 14,10.
- Liyana-Pathirana C., Shahidi F. (2005). Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using surface response methodology. Food.Chem. 93, 47–56.
- Lone AA ., Shaiq A., Ganai SA., Ahanger R A ., Bhat HA ., Bhat T A ., Wani IA.(2013). Free radicals and antioxidants : Myths, facts and mysteries. Afr. J. Pure .Appl. Chem. 7, 91-113.

M

- Makanjuola SA., Enjijugha VN., Omba OS., Sanni DM. (2015). Optimization and prediction of antioxidant properties of a tea-ginger extract. *Food .Sci .Nutr.* 3, 443-452.
- Maldonado LA., Yáñez DF., García AP., Druker JR., Quintana ET. (2009). Actinobacterial diversity from marine ,sediments collected in Mexico. *Antonie.Van.Leeuwenhoek .95*, 111-120.
- Markovi´c ZS., Manojlovi´c NT . (2010). Analytical characterization of lichexanthone in lichen: HPLC, UV spectroscopic, and DFT analysis of lichexanthone extracted from *Laurera benguelensis* (Mull. Arg.) *Zahlbr. Monatsh.Chem .Chem .Mon*, 141, 945–952.
- Martinez-Cayuela M. (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochem.77*, 147-161.
- Maskey RP., Helmke E., Kayser O., Fiebig HH., Maier A., Busche A. (2004).Anti-cancer and antibacterial trioxacarcins with high anti-malaria activity from a marine Streptomycete and their absolute stereochemistry. *J. Antibiot.* 57, 771–779.
- Mincer TJ., Jensen PR., Kauffman CA., Fenical W. (2002). Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5005–5011.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxydant activity, *Song Klama Karin J.Sci. Technol*, 26 (2): 211-219.

N

- Nichiyama MF., Costa MAF., Costa AM., Souza CGM., Boer CG., Bracht CK ., Peralta RM. (2010). Chà verde brasileiro (*Camellia sinensis* var. *asamica*): efeitos do tempo de infusao, acondicionamento da erva e forma de prepare sobre a eficiencia de extracao dos bioactivos e sobre a estabilidade da bebida. *Cienc Tecnol Aliment .30*, 261-268.
- Nimnoi P., Pongsilp N., Lumyong S. (2010). Endophytic actinomycetes isolated from *Aquilaria crassna* Pierre ex Lec and screening of plant growth promoters production. *World.J.Microbiol.Biotechnol.* 26,193–203.

O

- Okami ., Umezawa (1953). *Streptomyces achromogenes* subsp. *Achromogenes*. Int.J.Syst.Bacteriol. 30, 369-374.
- Omura S., Tanaka Y. (1986) Macrolide antibiotics. In: Pape H, Rehn HJ, editors. Biotechnology, IV. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft.360–91.
- Oskay M., Tamer A., Azeri C. (2004). Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. Afr. J.Biotechnol. 3 , 441–446.
- Ozil P. (1997). Plans d'expériences : Méthode de TAGUCHI. E.N.S d'électrochimie et d'Electrometallurgie INPG.

P

- Papazian L., Roch A. (2008). Le syndrome de détresse respiratoire aiguë, Edition Springer, p 153.
- Pena WEL., Andeade NJ., Soares NFF., Alvarenga VO., Rodrigues Junior S ., Zuniga ADG., Granato D., Sant'Ana AS. (2014). Modelling *Bacillus cereus* adhesion on stainless steel surface as affected by temperature, PH and time. Int.Dairy. J. 34, 153-158.
- Perrine-Walker F., Gherbi H., Imanishi L., Hocher V., Ghodhbane-Gtari F., Lavenus J., benabdoun FM., Nambiar-Veetil M., Svistoonoff S., Laplaze L. (2011). Symbiotic signaling in actinorhizal symbioses. Curr.Protein.Pept.Sci. 12 , 156–164.
- Polti M., Aparicio JD., Benimeli CS., Amoroso MJ. (2014). Simultaneous bioremediation of Cr (VI) and lindane in soil by *actinobacteria*. Int. Biodeterior. Biodegrad. 88, 48-55.
- Popovici C., Saykova I., Tylkowski B. (2009). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. Revue de génie industriel. 4, 25-39.
- Prudhomme J., McDaniel E., Ponts N., Bertani S., Fenical W., Jensen P., Le Rock K. (2008). Marine actinomycetes: a new source of compounds against the human malaria parasite. PLoS.One. 3, 2335.
- Pullen C., Schmitz P., Meuer K., Bamberg D., Lohman S., De Castro França S., Groth I., Schlegel B., Mollmann U., Gollmick F., Grafe U., Leistner E. (2002).New and

bioactive compounds from *Streptomyces* strain residing in the wood of Celastraceae. *Planta*. 216,162-167.

R

- Rees F J., Zal F., Thome J P. (2004). Enfer et paradis : la toxicité de l'oxygène chez les organismes abyssaux. *J .Océanis*. 30, 277-291.
- Rokem JS., Lantz AE., Nielsen J. (2007) Systems biology of antibiotic production by microorganisms. *Nat.Prod.Rep*. 24, 1212–1287.
- Rosmine E., Sainjan NC., Silvester R., Alikkunju A., Varghese SA. (2017). Statistical optimisation of xylanase production by estuarine *Streptomyces* sp. and its application in clarification of fruit juice . *Genet.Eng. Biotechnol.J*.

S

- Saci F., Lauaileche H., Bachir bey M., Meziant L. (2017). Optimization of phenolic compound recovery and antioxidant activity from carob pulp using response surface methodology. *Food .Res. Int*. 24, 1094-1101.
- Safaryan MJ., Ganjloo A., Bimakr M., Zarringhalami S. (2016). Optimization of Ultrasound- Assisted Extraction, Preliminary Characterization and In Vitro Antioxidant Activity of Polysaccharides from Green Pea Pods. *Foods*.5, 78.
- Salimi A., Maghsoudlou Y., Jafari SM., Mahoonak AS., Kashaninejad M., Ziaifar AM. (2014). Preparation of lycopene emulsions by whey protein concentrate and maltodextrin and optimization by response surface methodology. *J. Disper. Sci.Technol*. 36, 274–283.
- Sanglier JJ and Trujillo M. (1997). Substances bioactives produites par les actinomycetes et stratégie de sélection des souches. *Bull. Soc. Fr. Microbiol*. p: 12-13.
- Sanjivkumar M., Ramesh Babu D., Suganya M., Silambarasan T., Balagurunathan R., Immanuel G. (2016). INVESTIGATION ON PHARMACOLOGICAL ACTIVITIES OF SECONDARY METABOLITE EXTRACTED FROM A MANGROVE ASSOCIATED ACTINOBACTERIUM *STREPTOMYCES OLIVACEUS* (MSU3). *Biocatal .Agric. Biotechnol*. 8181, 30036-6.

- Sarfarazi M., Jafari SM., Rajabzadeh G. (2015). Extraction optimization of saffron nutraceuticals through response surface methodology. *Food Anal. Methods*. 8, 2273–2285.
- Saurav K., Kannabiran K. (2012). Cytotoxicity and antioxidant activity of 5-(2,4-dimethylbenzyl)pyrrolidin-2-one extracted from marine *Streptomyces* VITSVK5 spp. *Saudi. J. Biol. Sci.* 19, 81- 86.
- Saurav K., Kannabiran K. (2011). Cytotoxicity and antioxidant activity of 5-(2,4-dimethylbenzyl)pyrrolidin-2-one extracted from marine *Streptomyces* VITSVK5 spp. *Saudi. J. Biol. Sci.* 19, 81-86.
- Shin HJ., Kim TS., Lee HS., Park JY., Choi IK., Kwon HJ. (2008). Streptopyrrolidine, an angiogenesis inhibitor from a marine-derived *Streptomyces* spp. KORDI-3973. *Phytochemistry*. 69, 2363-2366.
- Shirling EB., Gottlieb. (1966). Methode for characterization of *Streptomyce* species . *int.J.Syst.Bact.*16, 313-340.
- Shivakumar HN., Patel R., Desai BG. (2008). Formulation Optimization of Propranolol Hydrochloride Microcapsules Employing Central Composite Design. *Indian. J Pharm. Sci.* 70, 408-413.
- Singh M., Pandey N., Agnihotri V., Singh KK., Pandey A. (2016). Antioxidant, antimicrobial activity and bioactive compounds of *Bergenia ciliata* Sternb.: A valuable medicinal herb of Sikkim Himalaya. *J .Tradit Complement .Med.* 1-6.
- Smaoui S. (2010). Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de doctorat., Institut national polytechnique de Toulouse. France. p26.
- 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* .96, 71-78.
- Srivibool R., Sukchotiratana M. (2006). Bioperspective of actinomycetes isolates from coastalsoils: A new source of antimicrobial producers Songklanakarin. *J.Sci.Technol.* 28, 493-499.
- Stach EM., Bull AT. (2005). Estimating and comparing the diversity of marine actinobacteria. *Anton. Leeuw.* 87, 3–9.

- Stackebrandt E., Schumann P. (2006). Introduction to the taxonomy of Actinobacteria. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.- H., Stackebrandt, E. (Eds.), The Prokaryotes. Springer, New York, NY. pp. 297–321.
- Stanbury PF., Whitaker A., Hall SJ. (1997). Principles of fermentation technology. 2nd ed. New Delhi: Aditya Books (P) Ltd. p. 357.
- Strand M., Carlsson M., Uvell H., Islam K Edlund K., Almqvist F.(2014). Isolation and characterization of anti-adenoviral secondary metabolites from marine actinobacteria. Mar. Drugs 12, 799–821.
- Subramani R., Aalbersberg W. (2013). Culturable rare Actinomycetes: diversity, isolation and marine natural product discovery. Appl.Microbiol.Biotechnol .97, 9291-321.
- Sujatha P., Bapi Raju KVVS.N., Ramana T. (2005). Studies on a new marine Streptomycete BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Microbiol.Res .160,119–126.
- Sun Y., Cheng Z., Glick BR. (2009). The presence of a 1- aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase deletion mutation alters the physiology of the endophytic plant growth promoting bacterium Burkholderia phytofirmans PsJN. FEMS.Microbiol. Lett. 296,131–136.

T

- Tanaka Y., Omura S. (1990). Metabolism and products of Actinomycetes - An introduction. Actinomycetologica. 4, 13-14.
- Taibi Z., Saoudi B., Boudelaa M., Trigui H., Belghith H., Gargouri A., et al (2012). Purification and biochemical characterization of a highly thermostable xylanase from actinomadura sp. Strain Cpt20 isolated from poultry compost. APP. Biochem. Biotechnol. 166, 663-679.
- Theilleux J. (1993). Les actinomycètes in Microbiologie Industrielle, les microorganismes d'intérêt industriel. Lavoisier , Tech et Doc, Apria. 612, 425.
- Thenmozhi M., Kannabiran K. (2012). Antimicrobial and antioxidant properties of marine actinomycetes *Streptomyces* sp VITSTK7. Oxi. Antioxi. Medi. Sci.1, 51-57.
- Thenmozhi M., Sindhura S., Kannabiran K. (2010). Characterization of antioxidant activity of *Streptomyces* species VITTK3 isolated from Puducherry Coast, India. J .Adv .Sci .Res. 1, 46-52

- Thomas TRA., Kavlekar DP., LokaBharathi PA. (2010) . Marine drugs from sponge-microbe association-A .Review.Mar.Drugs. 8, 1417–1468.

V

- Valko M., Leibritz D., Moncol J., Cronin MT., Mazur M., Telser J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int. J.Biochem. Cell. Biol, 39, 44-84.
- Vamecq J., Vallée L., Storme L., Gelé P., Bordet R. (2004). Les acteurs immédiats du stress oxydatif. J : La Lettre du Pharmacologue. 18, 16-22.
- Vonothini G., Murugan M., Sivakumar K., Sudha S. (2008). Optimization of protease production by an actinomycete Strain, P.S-18A isolated from an estuarine shrimp pond. Afr. J. Biotechnol.7, 3225-3230.

W

- Wang YH., Yang B., Ren J., Dong ML., Liang D., Xu AL.(2003) Optimization of medium composition for the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. Process.Biochem.40, 1116–1166.
- Wani SM., Jan N., Wani TA., Ahmed M., Masoodi FA., Gani A.(2015). Optimization of antioxidant activity and total polyphenols of dried apricot fruit extracts (*Prunus armeniaca* L.) using response surface methodology. Saudi. J. Agric. Sci.16, 119-126.
- Williams ST., Goodfellow M., Alderson G. (1989). Genus streptomyces Waksman and Henrici 1943,399 AL. In : Williams ST, Sharpe ME, Holt JG (eds) Bergey's manual of systematic bacteriology, 4. Williams, Baltimore. 2452-2492.
- Williams ST., Kuster E. (1964). Selective media for the isolation of *Streptomyces*. Nature. 202, 928-929.
- Williams ST., Locci R., Beswick A., Kurtboke DI., Kuznetsov VD., Le Monnier FJ., Long PF., Maycroft KA., palma RA., Petrolini B., Quaroni S., Todd JI., West M. (1993). Detection and identification of novel actinomycetes. Res. Microbiol. 144 , 653-656.

y

- Ye X., Anjum K., Song T., Wang W., Yu S., Huang H., Lian XY., Zhang Z. (2015). A new curvularin glycoside and its cytotoxic and antibacterial analogues from marine actinomycete *Pseudonocardia* sp. HS7. *Nat. Prod. Res.* 30, 1156–1161.
- Yim HS., Chye FY., Rao V., Low JY., Matanjun P., How SE., Ho CW. (2013). Optimization of extraction time and temperature on antioxidant activity of *Schizophyllum commune* aqueous extract using response surface methodology. *J. Food Sci. Technol.* 50, 275-283.
- Yin X., You Q., Jiang Z. (2011). Optimization of enzyme assisted extraction of polysaccharides from *Tricholoma matsutake* by response surface methodology. *Carbohydr. Polym.*, 86, 1358-1364.

Z

- Zaitlin B., Watson SB. (2006). Actinomycetes in relation to taste and odour in drinking water : Myths, tenets and truths. *Water. Res.* 40, 1741-1753.

Annexes

❖ Matériel utilisé

- Anse de platine
- Autoclave (Biobase)
- Bain Marie (Julabo TW12)
- Balance analytique (Adventurer OHAUS)
- Ballons
- Barreaux magnétiques
- Bec bunsen
- Bechers
- Boites de Pétri 99 mm
- Centrifugeuse (Hettich ZENTRIFUGER)
- Entonnoir
- Eprouvette
- Erlenmeyers
- Etuve à 28 °C (Memmert)
- Flacons
- Micropipette de 100 µl, 200 µL et 1000 µl
- Microscope optique (Zeiss West Germany)
- Pipettes Pasteur
- Plaque chauffante agitatrice (VELP SCientifica)
- Rotavapor (Buchi Rotavapor R-114)
- Spatule
- Spectrophotomètre (RAYLEIGH)
- Tube à essais et tube à hémolyse
- Vortex (VELP scientifica référence : ZX3)

Composition des milieux de culture❖ **Starch Casein Agar (SCA) (Kuster et Williams, 1964)**

• Amidon	10g
• Caseine.....	0.3g
• KNO ₃	2g
• K ₂ HPO ₄	2g
• NaCl.....	2g
• MgSO ₄ 7H ₂ O.....	0.05g
• CaCO ₃	0.02g
• FeSO ₄ 7H ₂ O.....	0.01g
• Agar.....	18g
• Eau distillée q.s.p.....	1000 ml
• pH.....	7.2±0.2

❖ **Milieu Mincer (MEM) (Mincer et al., 2002)**

• Amidon.....	10g
• Extrait de levure.....	4g
• Peptone.....	2g
• Agar.....	18g
• Eau distillée q.s.p	1000 ml
• pH.....	7.2±0.2

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

❖ **Milieu ISP1**

• Tryptone.....	5g
• Extrait de levure.....	3g
• Agar.....	15g
• Eau distillée q.s.p.....	1000 ml
• pH.....	7.2±0.2

❖ **Milieu ISP2**

• Glucose.....	4 g
• Extrait de levure.....	4 g
• Extrait de malt.....	10 g

• Eau distillée q.s.p.....	1000 ml
• Agar.....	20 g
❖ Milieu ISP3	
• Farine d'avoine.....	20 g
• Solution saline standard.....	1ml
• Agar.....	20 g
• Eau distillée q.s.p.....	1000 ml
• pH.....	7.2±0.2
✓ Solution saline standard	
• FeSO ₄ , 7H ₂ O.....	0,1 g
• MnCl ₂ , 4H ₂ O.....	0,1 g
• ZnSO ₄ , 7H ₂ O.....	0.1 g
• Eau distillée q.s.p.....	100 ml
❖ Milieu ISP4	
• Amidon.....	10 g
• K ₂ HPO ₄	1 g
• MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	1 g
• NaCl.....	1 g
• (NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
• CaCO ₃	2g
• Solution saline standard (voir ISP3).....	1ml
• Agar.....	20 g
• Eau distillée q.s.p.....	1000ml
• pH.....	7.2±0.2
❖ Milieu ISP6	
• Peptone.....	15g
• Protéose peptone.....	5g
• Citrate de ferammoniacal.....	0,5g
• Thiosulfate de sodium.....	0,08g
• Extrait de levure.....	1g
• K ₂ HPO ₄	1 g
• Agar.....	20g

- Eau distillée q.s.p.....1000 ml
- pH.....7±0.2
- ❖ **Milieu ISP7**
- Glycérol.....15 g
- L-tyrosine.....0,5 g
- L-asparagine.....1 g
- K₂HPO₄.....0,5 g
- MgSO₄, 7H₂O.....0,5 g
- NaCl.....0,5 g
- FeSO₄, 7H₂O.....0,01 g
- Solution saline standard (voir ISP3).....1 mL
- Agar.....18 g
- Eau distillée q.s.p.....1000 ml
- pH.....7,5±0.2

❖ Courbe d'étalonnage utilisée pour le dosage des polyphénols totaux

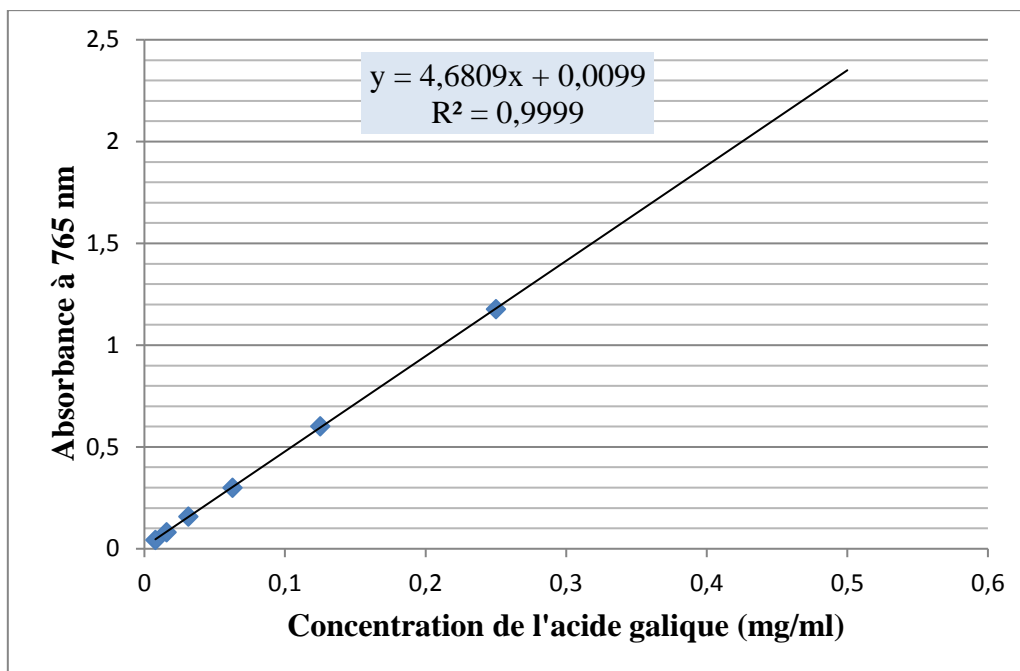


Figure 22 : Variation de l'absorbance en fonction des concentrations de l'acide galique.

❖ Courbe d'étalonnage utilisée pour l'activité antioxydante

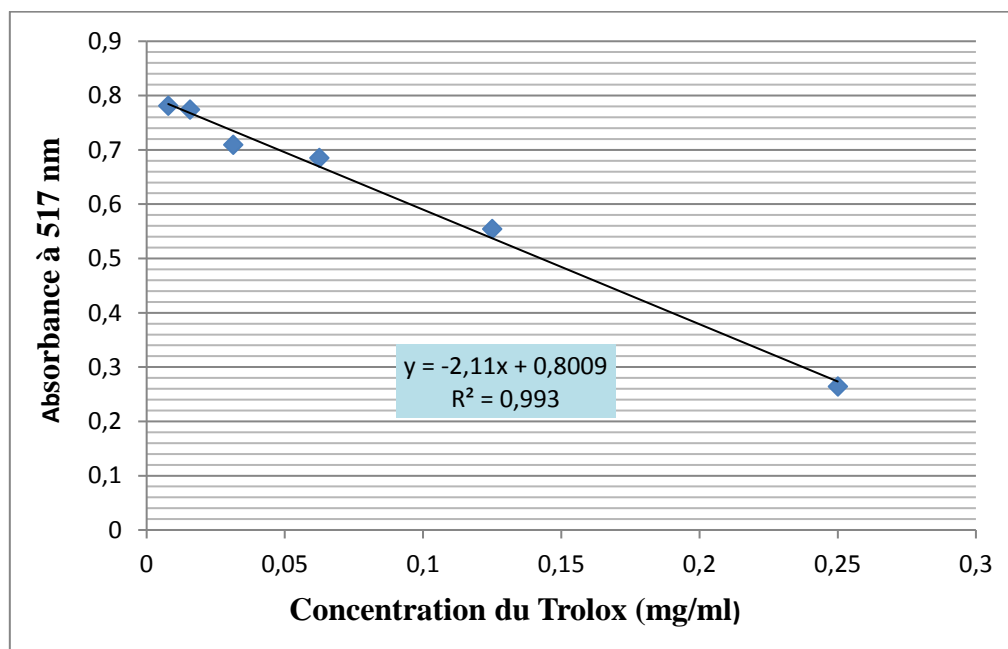


Figure 23 : Variation de l'absorbance en fonction des concentrations en Trolox.

Tableau XIII : Table de student (Goupy, 1999 et Ozil 1997)

Unilatéral Bilatéral	0.01 0.20	0.05 0.10	0.025 0.05	0.01 0.02	0.005 0.01
1	3,08	6,31	12,7	31,8	63,7
2	1,89	2,92	4,30	6,97	9,92
3	1,64	2,35	3,18	4,54	5,84
4	1,53	2,13	2,78	3,75	4,60
5	1,48	2,02	2,57	3,37	4,03
6	1,44	1,94	2,45	3,14	3,71
7	1,42	1,90	2,37	3,00	3,50
8	1,40	1,86	2,31	2,90	3,36
9	1,38	1,83	2,26	2,82	3,25
10	1,37	1,81	2,23	2,76	3,17
11	1,36	1,80	2,20	2,72	3,10
12	1,36	1,78	2,18	2,68	3,06
13	1,35	1,77	2,16	2,65	3,01
14	1,35	1,76	2,15	2,62	2,98
15	1,34	1,75	2,13	2,60	2,95
16	1,34	1,75	2,12	2,58	2,92
17	1,33	1,74	2,11	2,57	2,90
18	1,33	1,73	2,10	2,55	2,88
19	1,33	1,73	2,09	2,54	2,86
20	1,33	1,73	2,09	2,53	2,85
21	1,32	1,72	2,08	2,52	2,83
22	1,32	1,72	2,07	2,51	2,82
23	1,32	1,71	2,07	2,50	2,81
24	1,32	1,71	2,06	2,49	2,80
25	1,32	1,71	2,06	2,49	2,79
26	1,32	1,71	2,06	2,48	2,78
27	1,31	1,70	2,05	2,47	2,77
28	1,31	1,70	2,05	2,47	2,76
29	1,31	1,70	2,05	2,46	2,76
30	1,31	1,70	2,04	2,46	2,75
40	1,30	1,68	2,02	2,42	2,70
∞	1,28	1,65	1,96	2,33	2,58

Tableau XIV : Table de Fisher valeurs des 95 nièmes centiles (niveaux 0.05)

v_1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	∞	
\rightarrow																	
$v_1 \downarrow$																	
1	161	200	216	225	230	234	237	239	241	242	244	246	248	249	250	254	
2	18.5	19.0	19.2	19.2	19.3	19.3	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.5	19.4	19.5	
3	10.1	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.74	8.7	8.66	8.64	8.62	8.53	
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.0	5.96	5.91	5.86	5.80	5.77	5.75	5.63	
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.68	4.62	4.56	4.53	4.50	4.37	
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.00	3.94	3.87	3.84	3.81	3.67	
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.57	3.51	3.44	3.41	3.38	3.23	
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.28	3.22	3.15	3.12	3.08	2.93	
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.07	3.01	2.94	2.90	2.86	2.71	
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.91	2.85	2.77	2.74	2.70	2.54	
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.79	2.72	2.65	2.61	2.57	2.40	
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.8	2.75	2.69	2.62	2.54	2.51	2.47	2.30	
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.60	2.53	2.46	2.42	2.38	2.21	
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.7	2.65	2.60	2.53	2.46	2.39	2.35	2.31	2.13	
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.48	2.40	2.33	2.29	2.25	2.07	
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.42	2.35	2.28	2.24	2.19	2.01	
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.38	2.31	2.23	2.19	2.15	1.96	
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.34	2.27	2.19	2.15	2.11	1.92	
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.31	2.23	2.16	2.11	2.07	1.88	
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.28	2.20	2.12	2.08	2.04	1.84	
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32	2.25	2.18	2.10	2.05	2.01	1.81	
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30	2.23	2.15	2.07	2.03	1.98	1.78	
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27	2.20	2.13	2.05	2.01	1.96	1.76	
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25	2.18	2.11	2.03	1.98	1.94	1.73	
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24	2.16	2.09	2.01	1.96	1.92	1.71	
26	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27	2.22	2.15	2.07	1.99	1.95	1.9	1.69	
27	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25	2.2	2.13	2.06	1.97	1.93	1.88	1.67	
28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24	2.19	2.12	2.04	1.96	1.91	1.87	1.65	
29	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22	2.18	2.10	2.03	1.94	1.90	1.85	1.64	
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.09	2.01	1.93	1.89	1.84	1.62	
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08	2.00	1.92	1.84	1.79	1.74	1.51	
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04	1.99	1.92	1.84	1.75	1.70	1.65	1.39	
120	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.18	2.09	2.02	1.96	1.91	1.83	1.75	1.66	1.61	1.55	1.25	
∞	3.84	3.00	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.88	1.83	1.75	1.67	1.57	1.52	1.46	1.0	

v_1 degrés de liberté au numérateur

v_2 degrés de liberté au dénominateur

Figure 25 : Table de Fisher valeurs des 95 nièmes centiles (niveaux 0.05) (Goupy, 1991 et Ozil, 1997)

Résumé

L'évaluation, la modélisation et l'optimisation du potentiel antioxydant de l'extrait brut d'une souche d'actinobactérie d'origine marine ont été étudiées. Sur la base des caractéristiques morphologiques, la souche MM1 a été rattachée au genre *Streptomyces*. Les conditions d'extraction optimales pour la récupération des composés phénoliques totaux et l'activité antioxydante mesurée par le radical DPPH de l'extrait brut de *Streptomyces* sp. MM1 ont été déterminées en utilisant la méthodologie de surface de réponse. Pour ce faire, le pourcentage en eau de mer, le solvant d'extraction et la température d'extraction ont été étudiés. L'analyse de surface de réponse en utilisant le modèle composite centré a permis de déterminer les paramètres influençant et maximisant les deux réponses qui sont : i) l'acétate d'éthyle comme solvant d'extraction, le pourcentage en eau de mer : 41% et la température d'extraction : 38,2°C pour la teneur en polyphénols totaux ; ii) l'extrait méthanolique, 0% en eau de mer et une température d'extraction de 5°C pour l'activité antioxydante. Les valeurs optimales atteintes sont, respectivement, de 109,47 µg EQ AG/ml et 355,36 µg EQ TLX/ml pour la teneur en polyphénols totaux et l'activité antioxydante en comparaison aux valeurs avant optimisation: 52,78 µg EQ AG/ml et 92,89 µg EQ TLX/ml, respectivement.

Mots-clés : Actinobactérie, Activité antioxydante, Méthodologie de la surface de réponse, Optimisation, Plan composite centré, Polyphénols totaux, *Streptomyces*.

Abstract

Evaluation, modeling and optimization of the antioxidant potential an actinobacetrrium crude extract of a marine origin were studied. On the basis of morphological features, strain MM1 was attached to the genus *Streptomyces*. Optimum extraction conditions for recovery of total phenol compounds and antioxidant activity measured by the DPPH radical of the crude extract of *Streptomyces* sp. MM1 were determined using a statistical approach response surface methodology (RSM). To do this, the percentage of seawater, the extraction solvent and the extraction temperature were studied. The response surface analysis using the central composite design made it possible to determine the parameters influencing and maximizing the two responses, which are: i) ethyl acetate as extraction solvent, the percentage in seawater: 41% and extraction temperature: 38.2 °C for total polyphenol content; ii) the methanolic extract, 0% in seawater and an extraction temperature of 5 °C for antioxidant actiety. The optimal values achieved are, respectively, 109.47 µg EQ AG / ml and 355.36 µg EQ TLX / ml for the total polyphenol content and the antioxidant activity in comparison with the values before optimization: 52.78 µg EQ AG / ml and 92.89 µg EQ TLX / ml, respectively.

Keywords: Actinobacteria, Antioxidant activity, Central Composite design, Optimization, Phenolic compounds, Response surface methodology, *Streptomyces*.