

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

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Biotechnologie microbienne



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

MASTER

Thème

**Etude du potentiel antimicrobien et
antioxydant d'extraits bruts de souches
d'actinomycètes d'origine marine et
tellurique**

Présenté par :

OUARI Meryem & BOUDIAF Wafa

Soutenu le : 13 Juin 2016

Devant le jury composé de :

M^{me} BOUCHERBA Nawal

M^{elle} DJINNI Ibtissem

M^{me} YAHIAOUI Haoua

MCA

MCB

MAA

Présidente

Encadreur

Examinatrice

Année universitaire : 2015 / 2016

Remerciements

Remerciant tout d'abord Dieu tout puissant de nous avoir
donné la force de réaliser ce travail

Nos remerciements s'adressent également à M^{em} BOUCHARBA d'avoir
acceptée de présider le jury et M^{me} YAHIAOUI pour avoir acceptée d'examiner
Notre travail pendant notre soutenance

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et nos vifs
remerciement à : Notre promotrice M^{elle} DJINNI Ibtissem,
qui a accepté de nous accueillir dans le laboratoire de
microbiologie. Nous lui témoignons, nos gratitude et nos reconnaissance.

Nos remerciements s'adressent à M^{elle} Touati Naima
enseignante à l'université de A. Mira, qui nous a prodigé de précieux conseils
pour ses orientations.

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

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

Meryem et Wafa

Dédicaces

J'ai le plaisir de dédier ce modeste travail :

A ceux qui ont été mon exemple de la réussite, que j'aime et respecte, qui m'ont donné de l'amour; de la tendresse, du soutien et de la force, mes très chers parents, que Dieu vous protège et vous prête une longue et heureuse vie

A mes chers frères Adel, Bilel et Faïcel et ma sœur Loubna et ses filles Bouchra et Wafa qui m'ont soutenue sur tous les plans, auxquels je souhaite de réussite et tout le bonheur du monde

A mes enseignants particulièrement Mr Moussaoui Bilel, Mm Yahiaoui Haoua et M^{elle} Djinni Ibtissem

*Je ne peux oublier de remercier chaleureusement mes très chères copines de chambre : Samo, Loubna, Dehia, Nadjet, Sonia et Sabah
A mes meilleures amies : Ouarda, Sihem, Amira, Aïda, Lynda et à toutes mes autres amies.*

Aux familles Ouari, Boumaza et Bouah et surtout mon Bitou

A mon binôme Wafa avec qui j'ai partagé des moments forts Je lui souhaite bonne continuation et beaucoup de réussite.

Meryem

Dédicaces

J'ai le plaisir de dédier ce modeste travail:

A mes très chers parents pour leurs encouragements qui n'ont jamais cessés de me consentir durant les années d'études, je demande à Dieu de les protéger et leur réserver une longue vie.

*A mes sœurs : Djalila, Asma, Louiza, Meriem et leurs enfants :
Wassim, Islam, Khadija, Houssam, Adem et Yahia.*

A mon mari : Ammar

A toute ma belle famille

A mes très chères amies surtout : Asma, Samra, Hanane, Amira

A mon très chère binôme Meryem avec qui j'ai partagé des moments forts Je lui souhaite bonne continuation et beaucoup de réussite

Wafa

SOMMAIRE

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction 1

PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralités sur les actinomycètes	3
II. Ecologie, taxonomie et importance des actinomycètes.....	3
II.1. Ecologie des actinomycètes.....	3
II.2. Cycle de développement du genre <i>Streptomyces</i>	4
II.3. Taxonomie et critères d'identification des actinomycètes.....	4
II.3.1. Critères morphologiques.....	5
II.3.2. Critères chimiotaxonomiques.....	5
II.3.3. Critères physiologiques.....	5
II.3.4. Critères moléculaires.....	6
II.4. Importance des actinomycètes.....	6
II.4.1. En biotechnologie.....	6
II.4.2. En agriculture.....	6
II.4.3. Dans les domaines pharmaceutique, médical et vétérinaire.....	6
III. Métabolisme secondaire chez les actinomycètes.....	7
III.1. Métabolisme primaire.....	7
III.2. Métabolisme secondaire.....	7
III. 3. Activité antioxydante.....	8
III.3.1. Stress oxydatif.....	8
III.3.1.1. Définition.....	8
III.3.1.2. Radicaux libres.....	8
III.3.1.3. Les maladies liées au stress oxydatif.....	8
III.3.2. Les antioxydants.....	8
III.3.3. Type d'antioxydants.....	8
III.3.4. Mécanisme d'action des antioxydants.....	9

SOMMAIRE

PARTIE II : MATERIEL ET METHODES

I. Matériel analytique.....	10
II. Matériel biologique.....	10
II.1. Microorganismes utilisés : Actinomycètes.....	10
II.2. Germes cibles utilisés.....	10
II.3. Revivification et repiquage des souches.....	10
III. Méthodes.....	11
III.1. Etude morphologique des souches d'actinomycètes.....	11
III.1.1. Caractères macromorphologiques.....	11
III.1.2. Caractères micromorphologiques.....	11
III.2. Culture des souches et production des molécules actives par fermentation solide....	11
III.3. Extraction des molécules actives.....	11
III.4. Mise en évidence de l'activité antagoniste des extraits bruts des isolats.....	12
III.4.1. Standardisation de l'inoculum des germes cibles.....	12
III.4.2. Activité antimicrobienne des extraits bruts.....	12
IV. Etude de la stabilité des extraits bruts.....	13
IV.1. Mesure de la thermostabilité.....	13
IV.2. Effet des surfactants.....	14
V. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits bruts des isolats étudiés.....	14
V.1. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl- I -picrylhydrazyl).....	14
V.2. Evaluation du pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP).....	15

PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION

I. Etude des caractères morphologiques des souches d'actinobactéries.....	16
I.1. Caractères macromorphologiques.....	16
I.2. Caractères micromorphologiques.....	17
II. Production et extraction des molécules actives par fermentation solide.....	18
III. Etude de l'activité antagoniste des extraits bruts.....	19
IV. Etude de la thermostabilité des extraits bruts.....	22
IV.1. Effet du barème temps-température sur l'activité antagoniste des extraits bruts.....	22
IV.2. Effet des détergents sur l'activité antagoniste des extraits bruts.....	26
V. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits bruts.....	28

SOMMAIRE

V.I. Evaluation du pouvoir réducteur.....	32
Conclusion générale.....	36
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumé	
Abstract	

Liste des tableaux

Tableau I : Chimiotypes rencontrés chez les actinomycètes (Annexe I).....**I**

Tableau II : Caractéristiques macromorphologiques des souches SRC3, GSBNT10, GSBNT22, GSBNT4 et WR1L1S8 après 07 jours d'incubation sur les milieux SCA, Gausse, Czapeck et SCA 50% eau de mer à 28°C.....**15**

Tableau III : Concentration des extraits bruts des 5 isolats étudiés.....**19**

Liste des figures

Figure 1 : Cycle biologique du genre *Streptomyces*.....4

Figure 2 : Métabolites secondaires bioactifs produits par les actinomycètes.....7

Figure 3 : Rotavapor utilisé pour l'évaporation à sec des extraits bruts des isolats étudiés....12

Figure 4 : Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des isolats d'actinomycètes sur milieu Mueller-Hinton par la méthode des puits.....13

Figure 5 : Macromorphologie des souches : WR1L1S8, GSBNT10, SRC3, GSBNT22 et GSBNT4 sur les milieux de culture SCA50%, Czapeck, Gausse, SCA, après 7 jours d'incubation à 28°C17

Figure 6 : Observation au microscope optique des mycéliums aériens des souches d'actinomycètes : SRC3, GSBNT4, WR1L1S8, GSBNT22 et GSBNT10 cultivées pendant 14 jours à 28°C sur différents milieux de culture au grossissement (Gx10).....18

Figure 7 : Photographie présentant les extraits bruts des souches étudiées : GSBNT10, GSBNT22 AE, SRC3, WR1L1S8, GSBNT4 AE, GSBNT22 méthanol et GSBNT4 méthanol.....19

Figure 8 : Activité antagoniste des extraits bruts méthanoliques et à l'AE des isolats WR1L1S8, GSBNT10 et SRC3 à l'égard de 5 germes cibles.....20

Figure 9 : Activité antagoniste des extraits bruts méthanoliques et à l'AE des isolats GSBNT22 et GSBNT4 à l'égard de 5 germes cibles.....20

Figure 10 : photographie illustrant l'activité antagoniste des extraits bruts des isolats étudiés vis-à-vis des germes cibles.....22

Figure 11 : Effet des différents barèmes temps- températures sur l'activité antagoniste des extraits bruts des 5 isolats étudiés.....22

Figure 12 : Structure moléculaire de la streptazoline.....23

Figure 13 : Structure moléculaire de l'actinomycine D et du chromophore phenoxazinone24

Figure 14 : Effet de la durée de conservation sur l'activité antagoniste des extraits bruts des isolats WR1L1S8, GSBNT4, GSBNT22 et SRC3.....	25
Figure 15 : Photographie illustrant l' effet des barèmes temps-températures sur l' activité antagoniste des cinq extraits bruts testés	26
Figure 16 : Effet des surfactants (Tween 20 et tween 80) sur l'activité antagoniste des extraits bruts des 5 souches d'actinomycètes.....	27
Figure 17 : Photographie illustrant l'effet des surfactants (Tween 20 et Tween 80) sur l'activité antagoniste des extraits bruts testés.....	28
Figure 18 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par les extraits bruts des souches d'actinomycète.....	29
Figure 19 : Activité antioxydante de l'acide ascorbique (Annexe IV).....	IV
Figure 20 : Activité antioxydante de BHA (Annexe IV).....	IV
Figure 21 : Activité antioxydante de BHT (Annexe IV).....	IV
Figure 22 : Activité antioxydante de l'extrait brut méthanolique de l'isolat WR1L1S8.....	30
Figure 23 : Activité antioxydante de l'extrait brut méthanolique de l'isolat GSBNT10.....	30
Figure 24 : Concentrations des extraits bruts méthanoliques des isolats WR1L1S8 et GSBNT10 et des standards provoquant 50% d'inhibition (IC ₅₀) du radicale DPPH	31
Figure 25 : Activité réductrice des extraits bruts méthanoliques des isolats GSBNT10 et WR1L1S8 et du standard acide ascorbique.....	33
Figure 26 : Pouvoir réducteur des ions ferriques exprimé en EC ₅₀ du standard acide ascorbique et des extraits bruts des deux isolats WR1L1S8 et GSBNT10.....	34

Liste des abréviations

AE : Acétate d'éthyle

BHA : Hydroxyanisole butylé

BHT : Hydroxytoluène butylé

CCM : Chromatographie sur couche mince

CI₅₀ : Concentration inhibitrice à 50%.

DAB : Acide diaminobutyrique

DAP : Acide diaminopimelique

DO : Densité optique

DPPH : 2,2-diphényl- 1-picrylhydrazyl

FRAP : Pouvoir réducteur de l'ion ferrique

HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance

I% : Pourcentage d'inhibition

IR : Infra- rouge

MA : Mycélium aérien

MS : Mycélium de substrat

RMN : Résonance magnétique nucléaire

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthiciline

SCA : Starch Casein Agar

SM : Spectrométrie de masse

Introduction

Depuis des milliers d'années, les hommes utilisent des microorganismes (bactéries, levures et moisissures) pour fabriquer des produits comme le pain, la bière, le fromage, etc. Ces microorganismes, omniprésents dans notre environnement (le sol, l'air et les eaux) et dans quelques aliments que nous consommons, ne cessent d'occuper une place de plus en plus importante dans notre vie et sont actuellement à l'origine de l'essor du domaine de la biotechnologie (Smaoui, 2010).

Les actinomycètes, une famille de bactéries s'est particulièrement illustrée par la richesse de son métabolisme secondaire et par la remarquable diversité des métabolites produits (Overbye et Barret, 2005). Les actinobactéries sont connues pour leur grande faculté à produire des antibiotiques, avec plus de 70 % des substances actives d'origine microbienne (Omura, 1992). Le genre *Streptomyces* est connu comme étant le producteur du plus grand nombre d'antibiotiques, soit 80 % des antibiotiques sécrétés par les actinomycètes (Demain, 2006)

Depuis l'introduction des antibiotiques dans l'arsenal thérapeutique des maladies infectieuses, les microorganismes ont développé des moyens de défense leur conférant une insensibilité aux antibactériens. En effet la résistance aux antibiotiques a connu une augmentation fulgurante durant ces dernière décennie. Ce phénomène alarmant est d'autant plus problématique particulièrement dans les environnements hospitaliers où des bactéries multi-résistantes apparaissent telles que *Staphylococcus aureus*, mais également l'apparition de nouvelles pathologies et l'évolution des maladies infectieuses telles que le SIDA (Demain et Lancini, 2006). Selon Strub *et al.*, (2008), deux solutions essentielles peuvent être utilisées afin de venir à bout de ce problème :

Une meilleure utilisation des antibiotiques et la réduction de leur consommation d'une part, et l'identification de nouvelles molécules bioactives d'autre part.

Des études récentes ont montré que les radicaux libres d'oxygène possèdent un rôle critique dans divers maladies telles que le cancer, les maladies auto-immunes et cardiovasculaire (Lee *et al.*, 2014). Par ailleurs, l'utilisation des antioxydants synthétiques est un sujet très étudié du fait de leur impact négatif sur la santé humaine (Branen, 1975 ; Barlow, 1990). Ainsi plusieurs limites et restrictions ont été mises en place concernant leur utilisation, et leur substitution (Ragnarson, 1977 ; Frankel, 1993 ; Moure, 2001). Pour résoudre ces problèmes, les recherche actuelles s'intéressent aux antioxydants naturels issus de souche d'actinobactéries isolées à partir du sol, de sédiments de rivière et d'environnement marin (Lee *et al.*, 2014).

C'est dans ce contexte que s'inscrit la présente étude. Afin de contribuer à la valorisation de la diversité des souches actinomycetales Algériennes, nous nous sommes

intéressés à l'extraction des molécules bioactives de quelques isolats en mettant en évidence leur profil antimicrobien et antioxydant.

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

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

- L'étude des caractères macromorphologiques et micromorphologiques des souches d'actinomycètes ;
- La production et l'extraction des substances actives.
- La mise en évidence de l'activité antimicrobienne des isolats étudiés et l'étude de la stabilité des extraits bruts.
- La mise en évidence de l'activité antioxydante.

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

Partie I
Revue
bibliographique

I. Généralités sur les actinomycètes

Les actinomycètes sont des procaryotes à Gram positif (Williams et *al.*, 1993 ; Sanglier et Trujillo, 1997) à GC% supérieur à 55 % (Goodfellow, 1983). La plupart sont saprophytes et aérobies. Les actinomycètes sont généralement chimioorganotrophes, utilisant une grande variété de source d'énergie y compris les polymères complexes, d'autre espèces sont chimioautotrophes (Mariat et Sebald, 1990 ; Ensign et *al.*, 1993). Ils forment généralement des hyphes ramifiés et des spores asexuées pouvant survivre pendant de longues périodes sous des conditions hostiles (Panchanathan et *al.*, 2013). Leur temps de génération moyen est d'environ 2 à 3 heures (Larpen et Sanglier, 1989). Ils sont généralement mésophiles, préfèrent un pH neutre ou peu alcalin. Certains espèces sont thermophiles tolérant des températures avoisinant 50°C et peuvent aller jusqu'à 60°C (Omura, 1992).

Les actinomycètes sont les microorganismes les plus largement distribués dans la nature (Narayana et *al.*, 2008). C'est un groupe microbien qui manifeste une diversité considérable à mode de sporulation complexe, mais également grâce à leur capacité de produire un large éventail de métabolites secondaires (Bouix, 1993).

II. Ecologie, taxonomie et importance des actinomycètes

II.1. Ecologie des actinomycètes

Les actinomycètes sont des microorganismes ubiquitaires, que l'on rencontre sur presque tous les substrats naturels. Leur nombre dépend de nombreux facteurs : l'abondance de la matière organique, la profondeur, le pH, l'aération et l'humidité (Loucif, 2011). La grande capacité d'adaptation des actinomycètes aux différentes conditions environnementales ainsi que leur grande variabilité métabolique leur permet d'être répandus dans presque tous les écosystèmes avec, toutefois, une certaine préférence pour le sol qui demeure le réservoir le plus riche (Lechavalier, 1981 ; Goodfellow et Williams, 1983). Dans les sols sahariens, les actinomycètes constituent 15 à 60 % et parfois même jusqu'à 85 % de la microflore totale. Ce pourcentage augmente jusqu'à 91% dans les horizons situés entre 1 à 2 m de profondeur avec une prédominance des *Streptomyces* et parfois même des *Actinomadura*, des *Micromonospora* et des *Nocardioides* (Sabaou et *al.*, 1998). Les actinomycètes ont été également isolées à partir de nombreux environnements aquatiques y compris les eaux et sédiments marins (Jensen et *al.*, 1991).

II.2. Cycle de développement du genre *Streptomyces*

Tout comme les eucaryotes multicellulaires, les actinomycètes possèdent un cycle de vie qui est le résultat de trois processus physiologiques majeurs : la croissance végétative, la différenciation et la sénescence cellulaire puis la mort (Danilenko et *al.*, 2005). Sur un milieu solide, les spores d'actinomycètes produisent un ou plusieurs mycéliums de substrats (MS), ramifié et non fragmenté, suite à la germination d'une spore et se développe par croissance apicale (Figure 1). En réponse à certains signaux, le mycélium aérien (MA) émerge par la réutilisation de composés assimilés par le mycélium végétatif tels que l'ADN, les protéines ainsi que des composés stockés résultants de la lyse du MS (Ou et *al.*, 2008).

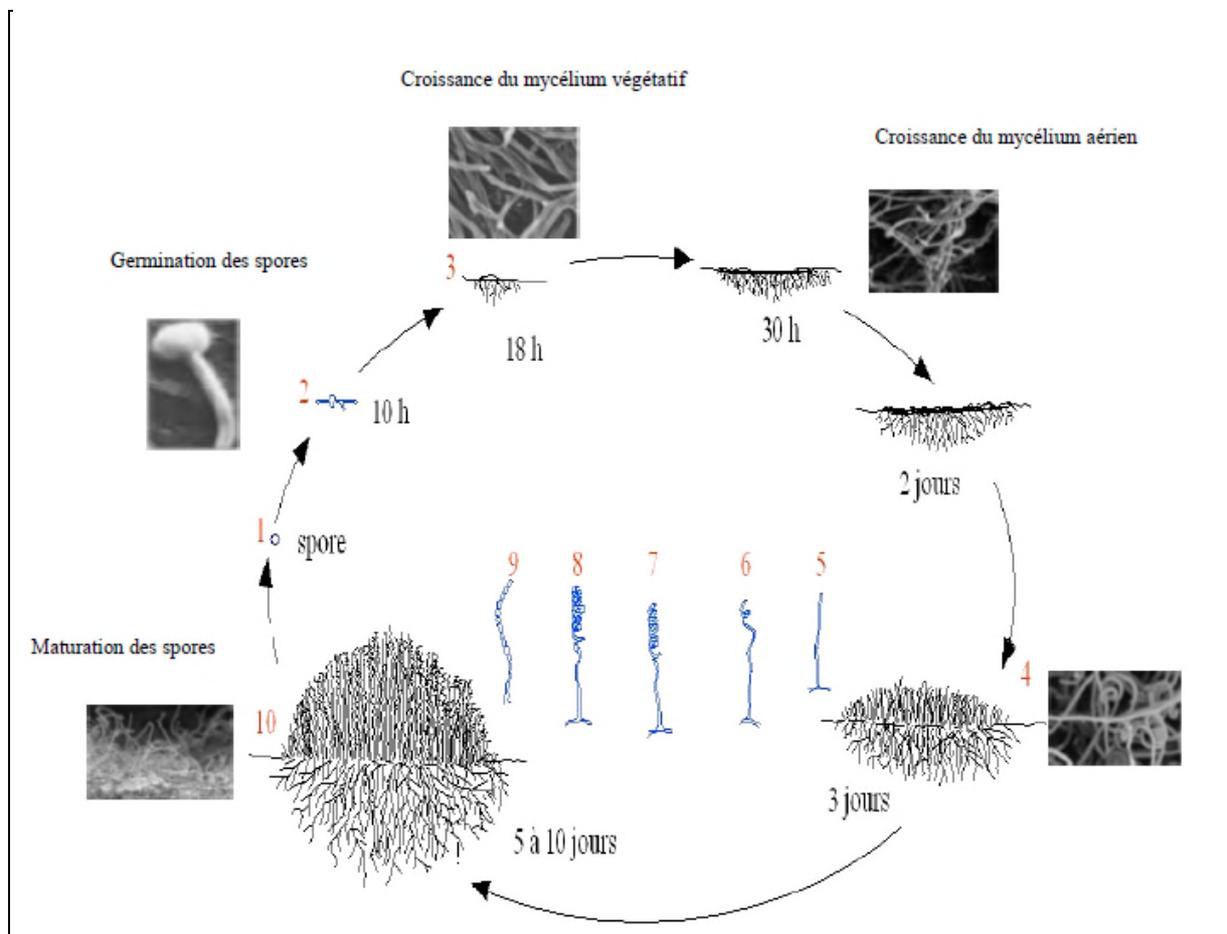


Figure 1: Cycle biologique du genre *Streptomyces* (Hopwood et *al.*, 1985)

II.3. Taxonomie et critères d'identification des actinomycètes

La taxonomie des actinomycètes 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).

II.3.1. Critères morphologiques

Les caractères morphologiques les plus importants chez les actinomycètes sont basés sur le type et la couleur du mycélium aérien (MA) et /ou du substrat (MS), la présence ou non de sporophores sur le mycélium, de sporanges, de sclérotés ou de synnemata, et la présence de spores (forme, mobilité, nombre, disposition sur les hyphes) et enfin, la production et la couleur des pigments solubles (PS) sécrétés (Badji, 2006).

II.3.2. Critères chimiotaxonomiques

La composition de la paroi cellulaire en acides aminés, glucides et lipides constituent le principal caractère utilisé en chimiotaxonomie. Les deux acides aminés pariétaux taxonomiquement importants sont l'acide diaminopimelique (DAP), et la glycine qui peut être présente ou absente (Lechevalier et Lechevalier, 1970). Le DAP peut être parfois remplacé par la lysine, l'ornithine et l'acide diaminobutyrique (DAB) (Becker et *al.*, 1965). Les sucres ayant une importance taxonomiques sont principalement les couples « arabinose-galactose », «xylose-arabinose», «rhamnose-galactose», ou encore le madurose. (Lechevalier et Gerber, 1970).

Les lipides cellulaires tels que les acides mycoliques pariétaux qui peuvent être présents ou absents, les phospholipides ainsi que les ménaquinones membranaires sont aussi importants pour l'identification des actinomycètes (Lechevalier et *al.*, 1977).

La détermination des genres d'actinomycètes est ainsi basée sur les critères morphologiques et chimiques. En effet, Becker et *al.*, (1965) et Lechevalier et Lechevalier (1970) divisèrent les actinomycètes en huit chimiotypes sur la base de l'analyse des acides aminés pariétaux et des sucres cellulaires (Tableau 1, annexe I).

II.3.3. Critères physiologiques

La détermination des espèces se base également sur les caractères physiologiques. Ceux-ci consistent en des tests de dégradation de différents composés glucidiques, lipidiques

protidiques, polymères complexes, etc. D'autres tests interviennent parfois dans la détermination des espèces, comme la résistance à certains antimicrobiens et tolérance à des conditions extrêmes (température, pH, salinité, etc.).

II.3.4. Critères moléculaires

Trois critères sont généralement recherchés :

- Le coefficient de Chargaff ou GC% (Stackebrandt et *al.*, 1981).
- Le taux d'hybridation ADN/ADN (Wayne et *al.*, 1987).
- Séquençage des ARN ribosomiaux 16 et 5S.

II.4. Importance des actinomycètes

II.4.1. En biotechnologie

Les actinomycètes ont été commercialement exploités pour la production de produits pharmaceutiques et nutritionnels. En effet, la production d'enzymes par le genre *Streptomyces* a révélé un potentiel biotechnologique intéressant (Hodgson, 2000). En plus de la production d'enzymes, les actinomycètes produisent d'autres métabolites secondaires dotés d'une large gamme d'activités, tels que les vitamines, les herbicides, les pesticides, les antibiotiques, les antiviraux ou encore les antiparasitaires (Oskay et *al.*, 2004).

II.4.2. En agriculture

Les actinomycètes jouent un rôle important dans le recyclage de la matière organique grâce à leur capacité à dégrader des substances très complexes non dégradées par les bactéries non mycéliennes et les champignons (Goodfellow et Williams, 1983). Ils participent activement à la fertilisation des sols et décomposent les déchets urbains à haute teneur en produits chimiques (Goodfellow et Williams, 1983). Certains genres comme *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Mycobactérium* et *Corynebactérium* se révèlent être d'une grande importance dans la dégradation des hydrocarbures, souvent à l'origine de pollution (Lacey, 1997).

II.4.3. Dans les domaines pharmaceutique, médical et vétérinaire

L'importance majeure des actinobactéries s'exprime dans les domaines pharmaceutique, médical et vétérinaire, aussi une analyse réalisée sur un nombre de substances médicamenteuses utilisées en chimiothérapie cancéreuse, a indiqué que plus de

60% des médicaments approuvés dérivent de composés naturels et la plupart a été extraite à partir d'actinomycètes, telle que l'actinomycine D (Demain et Leucini, 2006). En plus, les antibiotiques produits par les actinomycètes ont également trouvé une application dans les élevages industriels d'animaux (Khachatourians, 1998). En effet ils sont utilisés non seulement pour combattre les maladies, mais aussi dans l'alimentation pour accroître les rendements zootechniques (Schwarz et *al.*, 2001).

III. Métabolisme secondaire chez les actinomycètes

III.1. métabolisme primaire

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

III.2. métabolisme secondaire

Le métabolisme secondaire des actinomycètes est affecté par la nature et les taux des sources de carbone et d'azote ainsi que par la disponibilité du phosphore (Ou et *al.*, 2008 ; Tarkka et Hampp, 2008) et de molécules diffusibles telles que le γ -butyrolactone (Nedal, 2007). La biosynthèse des métabolites secondaires est régulée par divers mécanismes dont la répression par les sources nutritionnelles, l'induction, et l'inhibition d'enzymes des voies de biosynthèse par le métabolite final (Theilleux, 1993).

Outre la production d'antibiotiques, les actinomycètes produisent un large éventail de molécules à activités variées (**Figure 2**).

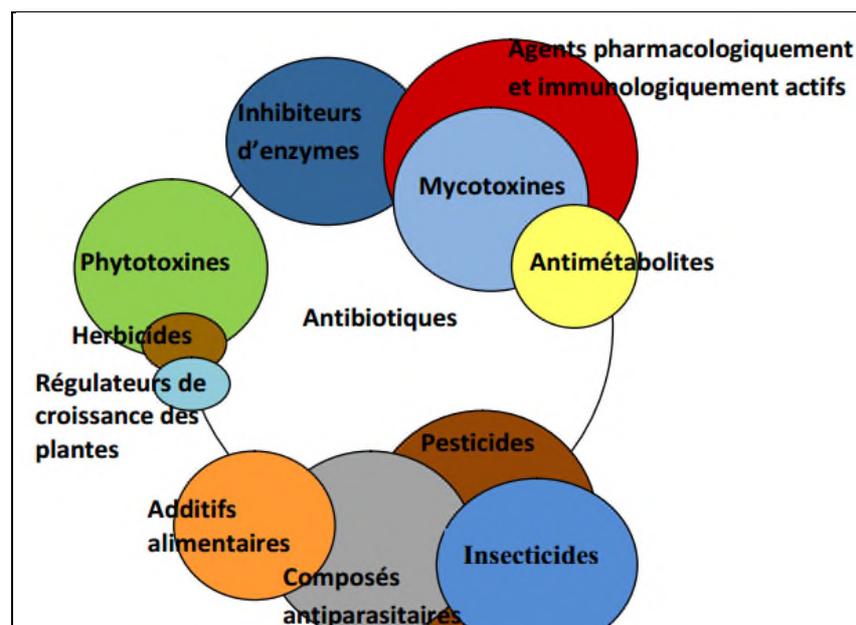


Figure 2: Métabolites secondaires bioactifs produits par les actinomycètes (Conn, 2005).

III. 3. Activité antioxydante

III.3.1. Stress oxydatif

III.3.1.1. Définition

Le stress oxydatif est défini comme étant le déséquilibre entre la génération des espèces réactives de l'oxygène et la capacité du corps à neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs (Boyd et *al.*, 2003).

III.3.1.2. Radicaux libres

Un radical libre est défini comme toute molécule possédant un ou plusieurs électrons non appariés (Jacques et André, 2004). Cette molécule est 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).

III.3.1.3. Les maladies liées au stress oxydatif

En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en surexprimant certains gènes, le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies: cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, oedème pulmonaire, vieillissement accéléré, Alzheimer, Parkinson, infections intestinales, rhumatisme, l'athérosclérose, le diabète (Atawodi, 2005).

III.3.2. Les antioxydants

Un antioxydant est toute substance capable d'inhiber ou retarder l'oxydation d'un substrat tout en étant présente à une faible concentration par rapport à la concentration du substrat oxydable (Rauha et *al.*, 2001 ; Sarma et *al.*, 2010).

III.3.3. Type d'antioxydants

Il existe deux catégories d'antioxydants :

Les séquestrants de métaux et les phagocytes de radical libre. Les séquestrants de métaux précipitent un métal ou suppriment sa réactivité en occupant tous les sites de coordination; les phagocytes de radical libre comprennent l'hydroxytoluène butylé (BHT), l'hydroxyanisole butylé (BHA), les tocophérols (vitamine E) et l'acide ascorbique (Amadou, 2005).

III.3.4. Mécanisme d'action des antioxydants

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulet, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la complexation d'ions et de métaux de transition.

Cet intérêt a plusieurs origines; en tant que constituants alimentaires, ces antioxydants naturels semblent contribuer de manière significative à la prévention des maladies telles que le cancer ou encore des maladies cardio-vasculaires (Amadou, 2005).

Partie II
Matériel et
Méthodes

I. Matériel analytique

Le matériel utilisé dans ce travail est résumé en annexe II

II. Matériel biologique

II.1. Les souches productrices : Actinomycètes

Cinq souches d'actinomycètes notées *Streptomyces sundarbansensis* WR1L1S8, *Streptomyces* sp. GSBNT10, *Streptomyces* sp. GSBNT4, *Streptomyces* sp. GSBNT22 et *Streptomyces* sp. SRC3 sont étudiées dans ce travail. Elles appartiennent à la collection du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA) de l'Université A. Mira de Bejaia conservées à 4°C.

Les souches *Streptomyces sundarbansensis* WR1L1S8, *Streptomyces* sp. GSBNT10 et *Streptomyces* sp. SRC3 ont fait objet d'études approfondies de leurs profils métaboliques et de leurs métabolites secondaires. Ces derniers ont été extraits et purifiés à l'aide de méthodes de séparation (CCM et HPLC analytiques et préparatives) et structurellement caractérisés par des techniques spectrales (spectroscopie UV-visible, infrarouges, résonance magnétique nucléaire (^1H RMN et ^{13}C RMN) et spectrométrie de masse (SM). Les résultats obtenus ont permis d'identifier et de rattacher les molécules produites comme appartenant à la famille des polykétides pour l'isolat WR1L1S8 (4 molécules) répondant au nom de phaeochromycines, à la famille des chromopeptides lactones connues sous le nom d'actinomycine D pour la souche GSBNT10, et à la famille des alcaloïdes répondant au nom de streptazoline pour l'isolat SRC3.

II.2. Germes cibles utilisés

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

Bactéries à Gram positif

- *Staphylococcus aureus* résistant à la méthiciline (SARM) ATCC 43300.
- *Listeria innocua* CLIP 74915.

Bactéries à Gram négatif

- *Salmonella Typhi* ATCC 14028.
- *Vibrio cholerae* ATCC 14035.

Levure : *Candida albicans* ATCC 1023.

II.3. Revivification et repiquage des souches

Les cinq isolats d'actinobactéries ont été revivifiés puis repiqués sur leurs milieux d'isolement respectifs : Amidon Caséine Agar (SCA) 50% eau de mer (Williams et Kuster, 1964) pour WR1L1S8, Gausse pour GSBNT4 et SCA pour GSBNT22 (Ivantiskaya et *al.*, 1978) et le milieu Czapeck pour GSBNT10 et SRC3 (Lawrence, 1956).

La composition des milieux de culture utilisés est donnée en Annexe III.

III. Méthodes

III.1. Etude morphologique des souches d'actinomycètes

III.1.1. Caractères macromorphologiques

Cette étude vise à apprécier la croissance, la couleur des mycéliums aériens et du substrat, l'aspect général des colonies ainsi que les pigments solubles produits par les différentes souches sur cinq milieux de culture différents : SCA 50% eau de mer, Czapeck optimisé, SCA, Gausse et le milieu Czapeck).

III.1.2. Caractères micromorphologiques

Les isolats obtenus sur les différents milieux cités précédemment sont observés à l'aide d'un microscope optique à un grossissement (x10) après 14 jours d'incubation. Ces observations sont réalisées directement sur boîtes de Petri afin d'étudier les mycéliums en place sans en altérer les structures. Elles consistent à voir la sporulation caractéristique ainsi que l'agencement des spores (Williams et *al.*, 1989).

III.2. Culture des souches et production des molécules actives par fermentation solide

Dans un but de production des molécules actives, la totalité des souches étudiées sont cultivées en stries serrées sur 10 boîtes de Petri chacune contenant leur milieu de culture correspondants. Les boîtes sont incubées pendant 7 jours à 28°C.

III.3. Extraction des molécules actives

L'extraction des composés actifs produits par chaque isolat a été réalisée par macération après 7 jours d'incubation. En effet, les mycéliums et les géloses sont découpés dans un contenant et un volume de 300 mL d'acétate d'éthyle est rajouté. Le mélange est par la suite laissé macérer pendant une nuit à température ambiante.

Les extraits bruts sont récupérés puis filtrés, à l'aide du papier Whatman N°1 puis évaporés à sec en utilisant un Rotavapor (Figure 4). Les extraits bruts ainsi obtenus sont récupérés dans un volume de 5 mL de méthanol ou d'acétate d'éthyle, selon la solubilité des composés produits dans l'un ou l'autre des solvants organiques (Pimentel-Elardo et *al.*)

Les concentrations massiques des cinq extraits bruts ont été déterminées et les flacons sont par la suite conservés à 4°C pour une utilisation ultérieure.



Figure 4 : Rotavapor utilisé pour l'évaporation à sec des extraits bruts des isolats étudiés.

III.4. Mise en évidence de l'activité antagoniste des extraits bruts des isolats

III.4.1. Standardisation de l'inoculum des germes cibles

La méthode de standardisation des germes cibles utilisée est celle des suspensions dilutions, accompagnée d'une mesure de la densité optique, à différentes longueurs d'ondes suivant le germe étudié, (DO = 0,5) de la solution mère suivie par un dénombrement sur boîte. La charge de l'inoculum utilisé est de 10^7 UFC/mL (Billerbeck *et al.*, 2002)

III.4.2. Activité antimicrobienne des extraits bruts

Les cinq extraits méthanoliques et d'acétate d'éthyle bruts obtenus ont fait l'objet d'un test d'antagonisme visant à tester leur activité antimicrobienne vis-à-vis de germes pathogènes préalablement ensemencés sur milieu Mueller Hinton à raison de 10^7 UFC/mL en utilisant la méthode des puits. Brièvement : des puits de 6mm de diamètre sont formés à l'aide d'un emporte-pièce puis un volume de 100 μ L de chaque extrait est introduit dans les puits et les deux solvant, méthanol et l'acétate d'éthyle considérés comme témoin (Figure 5). Les boîtes sont mise à 4°C pendant 2 h pour permettre la diffusion des substances actives puis incubées à 37°C pendant 24 h. La lecture des résultats se fait en mesurant le diamètre des zones d'inhibition exprimées en millimètre autour des puits à l'aide d'un pied à coulisse.

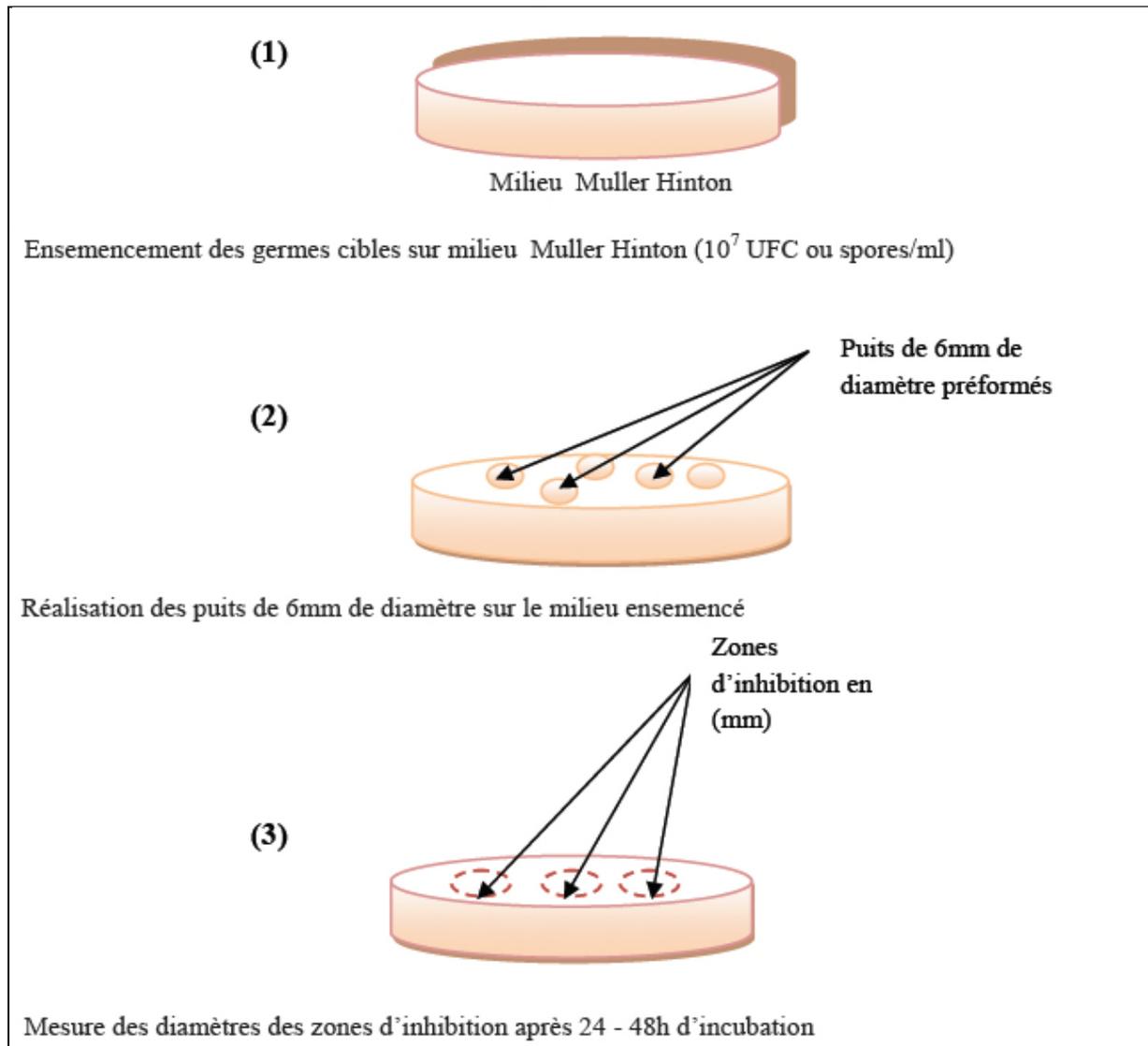


Figure 5 : Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des isolats d'actinomycètes sur milieu Mueller-Hinton par la méthode des puits (Djinni, 2009).

IV. Etude de la stabilité des extraits bruts

Après extraction des extraits méthanoliques et d'acétate d'éthyle des souches, il est indispensable d'étudier la stabilité de ces derniers en fonction de certains critères physicochimiques. Après chaque test, l'activité est testée par la méthode des puits préalablement citée. Les résultats obtenus sont comparés à ceux des témoins.

IV.1. Mesure de la thermostabilité

Les cinq extraits bruts ont subi différents traitements thermiques : 60 min à 60°C, 45min à 80°C et 30min à 100°C. Les activités antagonistes sont évaluées à l'encontre du germe cible le plus sensible. Les boîtes sont ensuite mises à incuber à 37°C pendant 24 h. Les

diamètres des zones d'inhibitions sont mesurés (Badji et *al.*, 2006). Les extraits non traités thermiquement (4°C) sont utilisés comme témoin.

L'effet de la durée de conservation sur l'activité des extraits bruts est déterminé par la conservation de ces derniers à 4°C pendant 52 jours pour WR1L1S8, GSBNT22 et GSBNT4 et 15 jours pour SRC3. Après conservation, l'activité antagoniste est évaluée (Augustine, 2005).

Toutefois, il y'a lieu de signaler que ce test n'a pas été effectué pour la souche GSBNT10 en raison de la quantité insuffisante de l'extrait brut.

IV.2. Effet des surfactants

L'effet du Tween 20 et du Tween 80 sur l'activité antagoniste des différents extraits bruts est testé. 100 µL d'extrait brut sont mélangés avec 100 µL des solutions de détergents puis incubées pendant 6 h à 30°C. Les solutions des différents détergents seuls sont utilisées comme témoins afin de vérifier l'effet de chaque détergent sur les extraits bruts (Augustine, 2005). L'activité antagoniste des solutions préparées est par la suite réalisée et les boites sont mises à incuber à 37°C pendant 24 h.

V. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits bruts

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

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH. L'effet de chaque extrait brut sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par Sanchez-Moreno et *al.*, (1998). Un volume de 500 µL de différentes concentrations de chaque extrait est ajouté à 500 µL de la solution méthanolique de DPPH. Le contrôle négatif est préparé en parallèle en mélangeant 1000 µL de méthanol avec 1000 µL d'une solution méthanolique de DPPH à la même concentration utilisée. Après incubation à l'obscurité pendant 30min et à température ambiante, la lecture des absorbances est effectuée à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Les résultats sont exprimés en terme pourcentages d'inhibition en utilisant la formule suivante:

$$I \% = (A_b - A_t) / A_b * 100$$

A_b : Absorbance du blanc ; A_t : Absorbance du test effectué

V.2. Evaluation du pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP)

Cette méthode est basée sur l'aptitude des extraits à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}). Le mécanisme est connu comme étant un indicateur de l'activité donatrice d'électrons, caractéristiques de l'action antioxydante des polyphénols (Yildirim *et al.*, 2001). Elle consiste à mélanger 1 mL de l'extrait à différentes concentrations avec 2,5 mL de tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 2,5 mL d'une solution de ferricyanure de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) à 1% (m/v). Le mélange obtenu est incubé à 50°C pendant 20 min, puis 2,5 mL d'acide trichloroacétique (CCl_3COOH) à 10% (0,1 g/mL) sont ajoutés pour stopper la réaction. Le mélange est centrifugé à 3000 g pendant 10 min à température ambiante. 1,25 mL du surnageant sont additionnés 1,25 mL d'eau distillée et 0,25 mL de chlorure de fer (FeCl_3) à 0.1% (0,001 g/mL).

L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm (Oyaizu, 1986). L'augmentation de l'absorbance dans le milieu réactionnel indique une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Hubert, 2006). L'activité de l'extrait est enfin comparée à celle des antioxydants synthétiques (l'acide ascorbique).

Partie III
Résultats et
discussion

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Microbiologie générale de l'université A. Mira de Bejaia durant la période allant du 01/02/2016 au 15/04/2016.

Dans ce qui suit, seront abordés les résultats et la discussion des principales parties de ce travail relatives à l'étude des caractères morphologiques des souches d'actinomycètes, la mise en évidence des activités antagoniste et antioxydante des extraits bruts ainsi que l'étude de la stabilité de ces derniers vis à vis d'agents physico-chimiques.

I. Etude des caractères morphologiques des souches d'actinobactéries

Cette étude consiste en la détermination des critères macromorphologiques et micromorphologiques des isolats. Pour cela, cinq souches d'actinomycètes notées *Streptomyces sundarbansensis* WR1L1S8, *Streptomyces* sp.GSBNT10, *Streptomyces* sp. GSBNT4, *Streptomyces* sp. GSBNT22 et *Streptomyces* sp. SRC3 sont étudiées dans ce travail

I.1. Caractères macromorphologiques

Les propriétés culturales des isolats d'actinomycètes ont été étudiés sur quatre milieux de culture SCA, Gausse, Czapeck et SCA 50% eau de mer. Les souches sont incubées à 28°C pendant 7 jours, les résultats sont présentés dans le tableau II.

Tableau II : Caractéristiques macromorphologiques des souches d'actinomycètes après 7 jours d'incubation sur les milieux SCA, Gausse, Czapeck et SCA 50% eau de mer à 28°C.

Caractères Souche	Croissance	Couleur du mycélium aérien (MA)	Couleur du mycélium du substrat(MS)	Production de pigments diffusibles	Aspect des colonies
SRC3 (Czapeck)	+	Blanc	Jaune clair	-	Petites colonies d'aspect rugueux
GSBNT10 (Czapeck)	+	Gris clair	Jaune clair	-	Petites colonies bombées
GSBNT22 (SCA)	+	Blanc	Jaune foncé	-	Colonies des différentes tailles, plates
GSBNT4 (Gausse)	+	Blanc	Jaune foncé	-	Petites colonies bombées
WR1L1S8 (SCA 50% eau de mer)	+	Marron à contour blanc	Marron à contour jaune	-	Colonies de taille moyenne, plates

+ Très bonne croissance ; - Absence de production de pigments

Les isolats SRC3 et GSBNT10 présentent une très bonne croissance sur le milieu Czapeck après 7 jours d'incubation où les colonies de l'isolat SRC3 présentent un aspect

rugueux, avec un mycélium de substrat (MS) de couleur jaune clair et un mycélium aérien (MA) qui se manifeste par une couleur blanche. Les colonies de l'isolat GSBNT10 sont bombées et le mycélium du substrat (MS) présente une couleur jaune clair alors que le mycélium aérien (MA) manifeste plutôt une couleur gris clair.

Les deux souches GSBNT22 et GSBNT4 présentent une excellente croissance sur les milieux SCA et Gausse respectivement. Leurs mycéliums aériens sont caractérisés par une couleur blanche, et un mycélium de substrat de couleur jaune foncé, avec des colonies plates pour GSBNT22 et bombées pour GSBNT4. D'autre part, la croissance de la souche WR1L1S8 est très bonne sur le milieu SCA 50% eau de mer qui a donné un MA de couleur marron avec un contour blanc, d'aspect poudreux, alors que le MS présente une couleur marron.

La figure 5 ci-dessous illustre les mycéliums aériens des cinq isolats étudiés.

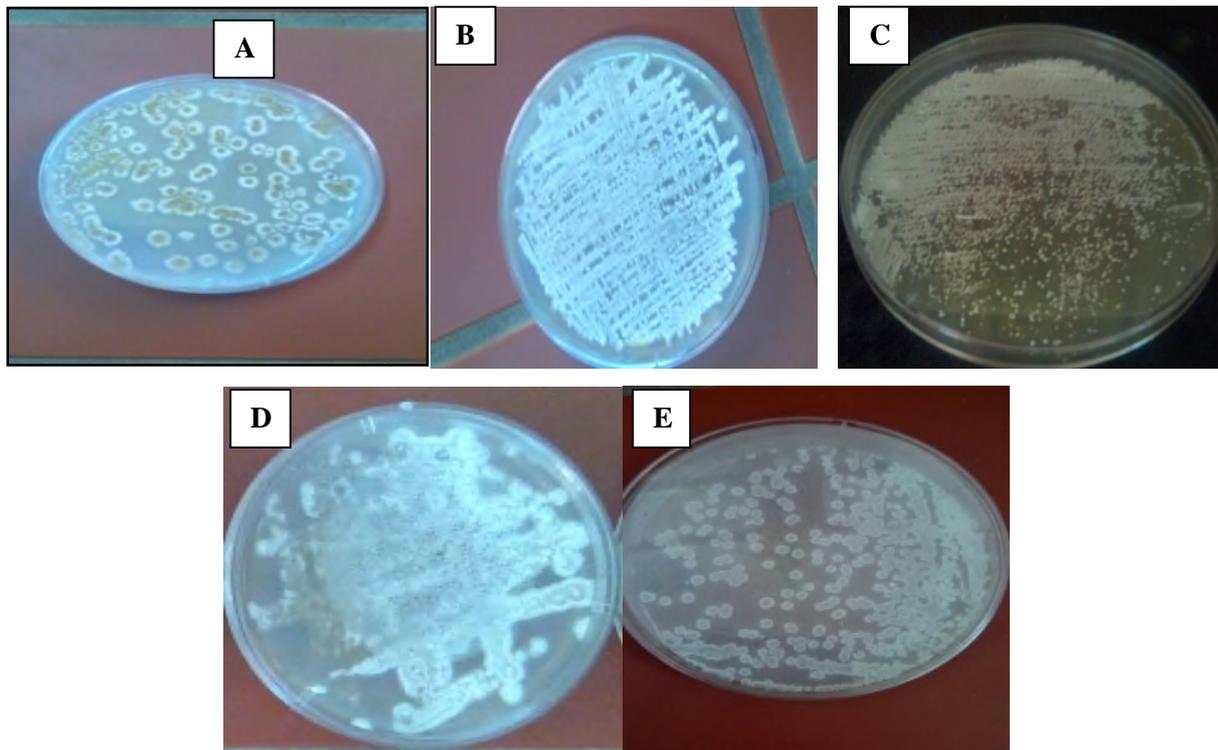


Figure 5 : Macromorphologie des souches : A) WR1L1S8, B) GSBNT10, C) SRC3, D) GSBNT22, E) GSBNT4 sur les milieux de culture SCA50%, Czapeck, Gausse, SCA, après 7 jours d'incubation à 28°C.

I.2. Caractères micromorphologiques

Les observations au microscope optique effectuées au grossissement (Gx10) des cinq isolats après 14 jours d'incubation sont présentées dans la Figure 6.

Les filaments des mycéliums aériens de tous les isolats sont non cloisonnés et fins, l'isolat SRC3 présentant des chaînes de spores immobiles de forme spiralée qui se fragmentent en spores sphériques et celles de GSBNT10, GSBNT4 et GSBNT22 se caractérisent par une longue chaîne de spores sphériques et/ou en bâtonnets. D'autre part les filaments du mycélium aérien de l'isolat WR1L1S8 sont ramifiés, ils sont droits avec des surfaces lisses présentant des chaînes de spores immobiles.

Les sporophores, les sporanges, les spores mobiles, les synnemata et les sclérotés sont absents chez tous les isolats.

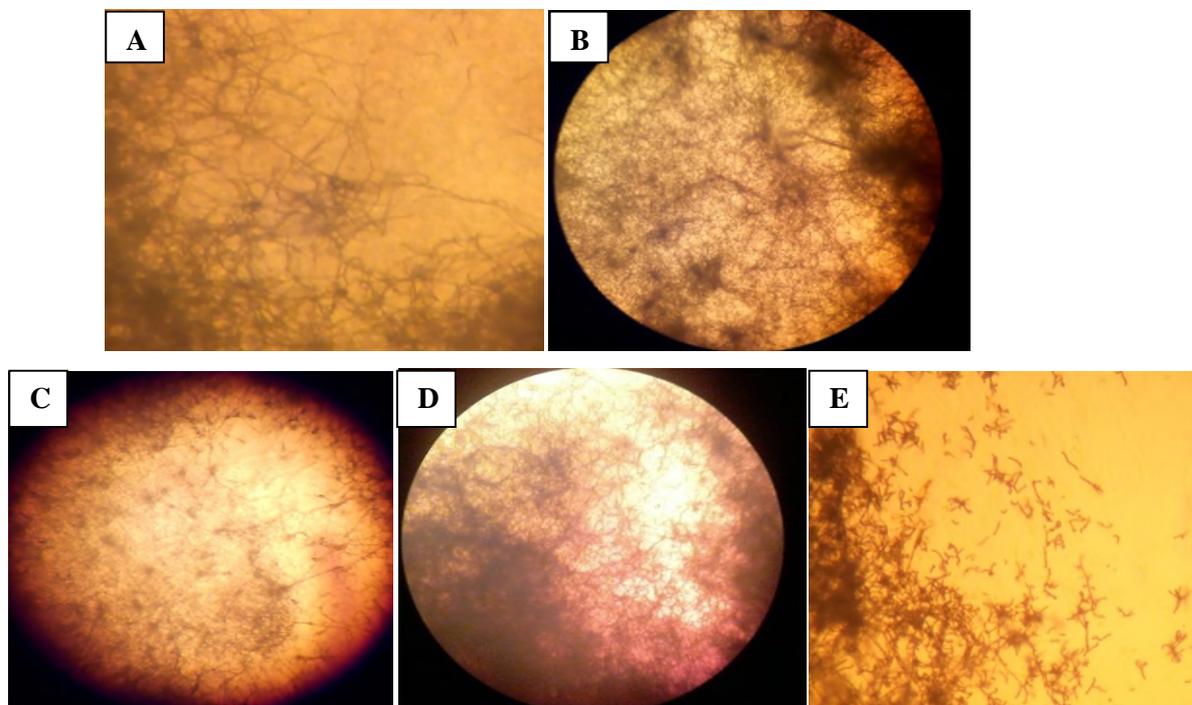


Figure 6 : Observation au microscope optique des mycéliums aériens des souches d'actinomycètes : A) SRC3, B) GSBNT4, C) WR1L1S8, D) GSBNT22, E) GSBNT10 cultivées pendant 14 jours à 28°C sur différents milieux de culture au grossissement (Gx10)

II. Production et extraction des molécules actives par fermentation solide

Les extraits bruts ont été obtenus par macération des cultures solides des isolats d'actinomycètes dans de l'acétate d'éthyle.

L'extraction des molécules actives produites par les 5 isolats a permis l'obtention de 7 extraits bruts, comme précisé dans le tableau III, en fonction de la solubilité des molécules produites dans le méthanol ou l'acétate d'éthyle.

Tableau III : Concentrations des extraits bruts des 5 isolats étudiés obtenus après macération

Extrait	Solvant	Couleur	Concentration (mg/mL)
WR1L1S8	Méthanol	Marron	21,5
GSBNT10		Jaune foncé	8,25
GSBNT4		Marron	3,6
GSBNT22		Marron clair	25
GSBNT4	Acétate d'éthyle	Rose	19,33
GSBNT22		Rose	10,66
SRC3		Translucide	10

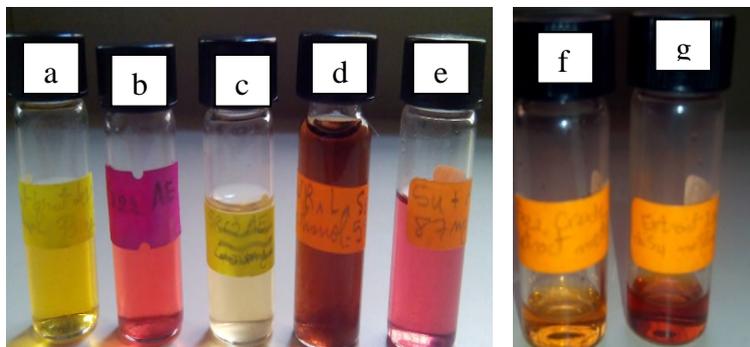


Figure 7: Photographie présentant les extraits bruts des souches étudiées : a) GSBNT10, b) GSBNT22 AE, c) SRC3, d) WR1L1S8, e) GSBNT4 AE, f) GSBNT22 méthanol, g) GSBNT4 méthanol.

III. Etude de l'activité antagoniste des extraits bruts

Dans le but d'étudier la capacité des extraits bruts à inhiber la croissance de germes cibles, un test d'antagonisme basé sur la méthode des puits a été réalisé. Les résultats obtenus sont illustrés dans les figures 8 et 9.

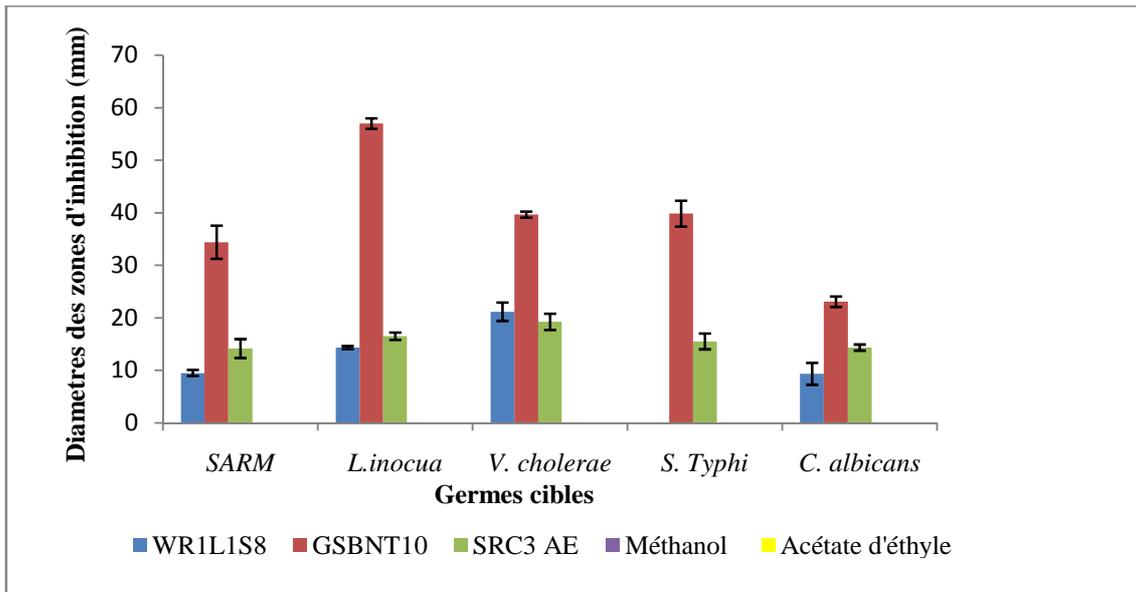


Figure 8 : Activité antagoniste des extraits bruts méthanoliques et à l'acétate d'éthyle des isolats WR1L1S8, GSBNT10 et SRC3 à l'égard de 5 germes cibles.

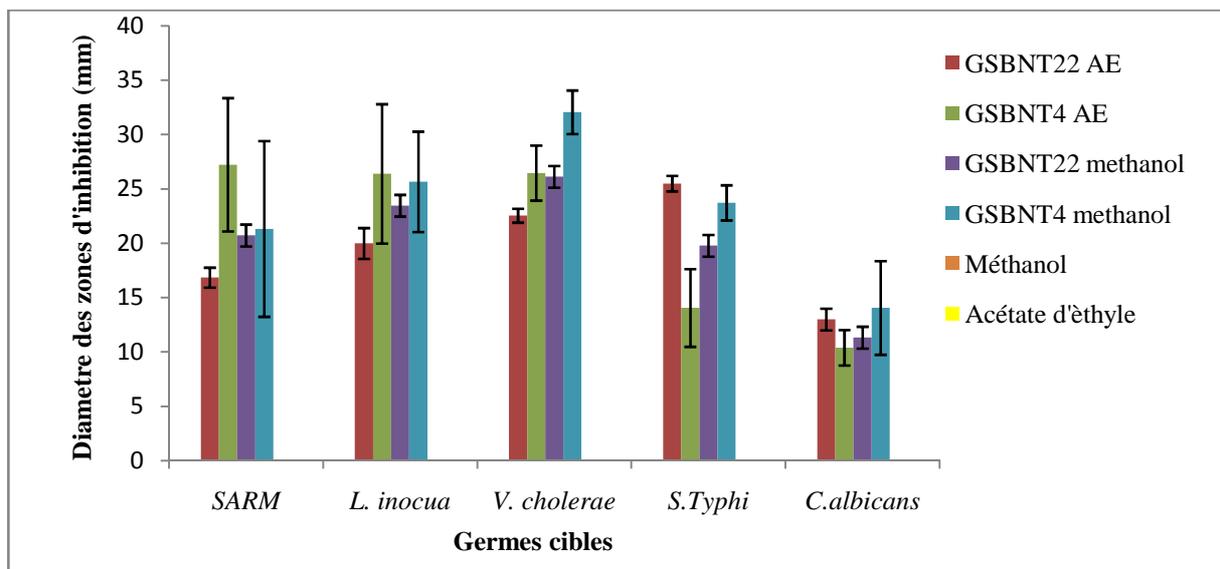


Figure 9 : Activité antagoniste des extraits bruts méthanoliques et à l'acétate d'éthyle des isolats GSBNT22 et GSBNT4 à l'égard de 5 germes cibles.

Les résultats montrent clairement que le diamètre des zones d'inhibitions des extraits bruts repris dans du méthanol ou de l'acétate d'éthyle des souches d'actinomycètes diffère d'un germe cible à un autre et d'un extrait à un autre.

En effet, les sept extraits bruts présentent un bon antagonisme vis-à-vis des cinq souches microbiennes testées à l'exception de l'extrait de l'isolat WR1L1S8 qui ne manifeste aucun effet vis-à-vis *Salmonella Typhi*. Par ailleurs, un spectre d'activité plus au moins faible

vis-à-vis des autres souches mais il se révèle plus efficace à l'encontre de *Vibrio cholerae* où le diamètre des zones d'inhibition atteint 21 mm.

L'isolat GSBNT10 présente un effet antagoniste important aussi bien vis-à-vis de bactéries que de la levure *Candida albicans*. *Listeria innocua* est le germe le plus sensible pour cet extrait avec un diamètre avoisinant 57 mm.

Par ailleurs, l'extrait méthanolique de l'isolat GSBNT4 a présenté des zones d'inhibition plus importantes que celles de l'extrait repris dans de l'acétate d'éthyle, *Candida albicans* se révèle être plus résistante pour ces deux extraits que les quatre bactéries testées donnant des zones d'inhibition de 14 mm de diamètre. *Vibrio cholerae* a montré une sensibilité à l'égard de l'extrait méthanolique et le SARM pour la fraction d'acétate d'éthyle avec des diamètres supérieurs à 32 et 27 mm respectivement.

La souche SRC3 présente également des antagonismes importants vis-à-vis des 4 souches bactériennes notamment *V. cholerae* et *L. innocua* où les zones d'inhibition sont respectivement de 19 et 16 mm. Par ailleurs, l'activité antilevurienne de l'extrait est intéressante et atteint 14,5 mm de diamètre.

L'extrait brut de l'isolat GSBNT22 a donné des résultats plutôt similaires pour les deux solvants utilisés. En effet, l'extrait méthanolique présente une activité antagoniste importante vis-à-vis de *V. cholerae* où le diamètre des zones d'inhibitions est de 26mm, alors que l'extrait à l'acétate d'éthyle a présenté une activité à l'encontre de *S. Typhi* avec un diamètre supérieur à 25 mm.

D'après les résultats obtenus, les diamètres des zones d'inhibitions diffèrent d'une bactérie à une autre et d'un extrait à un autre. La variation de l'activité antimicrobienne des extraits explique la variation de la composition chimique des molécules produites par les actinobactéries. (Boudjouref, 2011).

En effet, Boughachiche et *al.*, (2005) et Boudemagh et *al.*, (2005) expliquèrent cette différence au niveau des zones d'inhibitions par le fait qu'une souche d'actinomycète peut produire plusieurs molécules antimicrobiennes (différents spectres d'action).

La figure 10 suivante présente quelques activités antibiotiques des 5 isolats vis-à-vis de différents germes cibles par la méthode des puits.

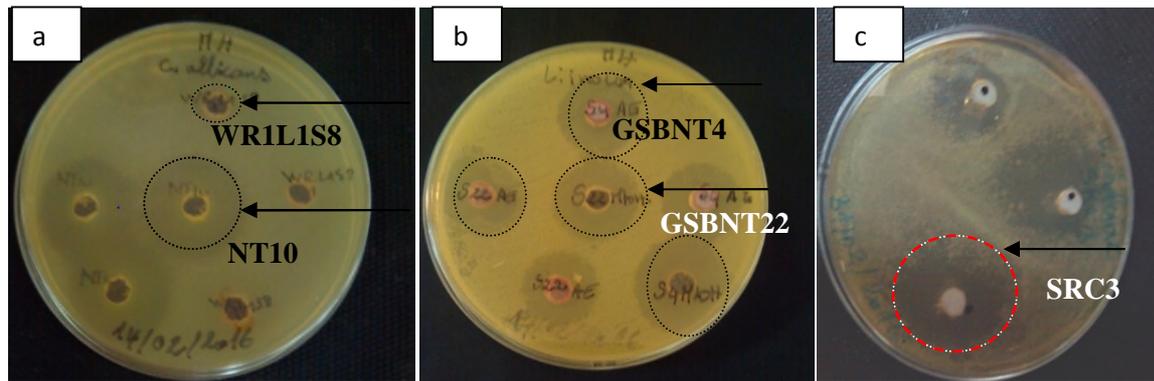


Figure 10 : Photographie illustrant l'activité antagoniste des extraits bruts des isolats étudiés vis-à-vis des germes cibles : a) *C.albicans*, b) *L.innocua*, c) *V.cholerae*.

IV. Etude de la thermostabilité des extraits bruts

Afin de déterminer le degré de stabilité des cinq extraits bruts étudiés à des conditions stressantes, les effets de quelques paramètres ont été testés. Ces paramètres sont les effets du barème temps- température et des détergents.

IV.1. Effet du barème temps-température sur l'activité antagoniste des extraits bruts

Afin d'étudier l'effet de la température sur les extraits actifs, ces derniers sont incubés à différents barèmes temps-température : 4°C, 60°C, 80°C et 100°C, puis testés à l'encontre de germes cibles les plus sensibles. Les résultats de ce test sont présentés dans la figure 11 ci après.

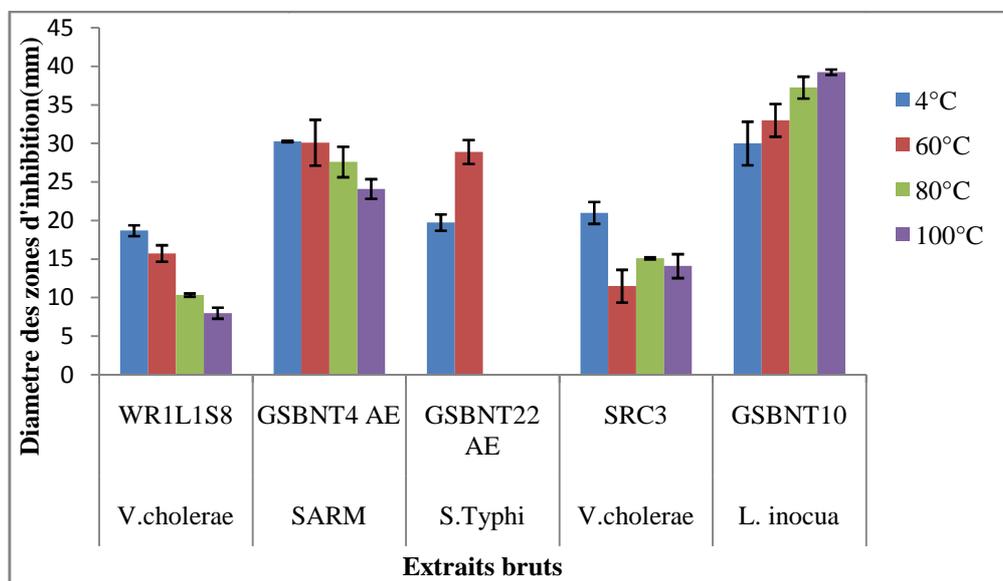


Figure 11 : Effet des différents barèmes temps-températures sur l'activité antagoniste des extraits bruts des cinq isolats étudiés.

D'après les résultats obtenus, nous remarquons une diminution progressive de l'activité antagoniste de l'extrait brut de la souche WR1L1S8 avec l'augmentation de la

température. Il est clair que les molécules produites par cette souche sont sensibles à la chaleur.

D'autre part, l'extrait brut de la souche GSBNT22 parvient à résister aussi bien à un chauffage de 60°C pendant une heure et une inhibition totale de l'activité à 80°C pendant 45 min et 100°C pendant 30 min, a été constaté. Ceci suggère que la stabilité des molécules produites par cette souche à différentes températures est limitée.

Par ailleurs, une stabilité des activités antagonistes des extraits bruts des deux isolats SRC3 et GSBNT4 a été observée après traitement thermique allant de 60°C à 100°C. La thermostabilité de l'extrait brut de la souche SRC3 pouvant être due à la structure chimique atypique de la molécule antibiotique produite qui est la streptazoline. En effet, une caractéristique structurelle importante pour l'activité biologique, elle a tendance à se polymériser en solution concentrée, elle est toutefois stable dans une solution diluée à température ambiante (Drautz et *al.*, 1981). Le squelette tricyclique avec un fragment d'uréthane présent dans sa structure est un système cyclique inhabituel rarement rencontré dans la nature et n'a été retrouvé que chez la streptazoline et ses analogues (Puder et *al.*, 2001 ; Nomura et Mukai 2002 ; Zheng et *al.*, 2012). Sa biosynthèse avait été discuté par Mayer et Thiericke, (1993) et plusieurs synthèses ont également été rapportées (Kozikovski et Park, 1985 ; Kozikovski et Park, 1990 ; Nomura et Mukai, 2004) (Figure 12).

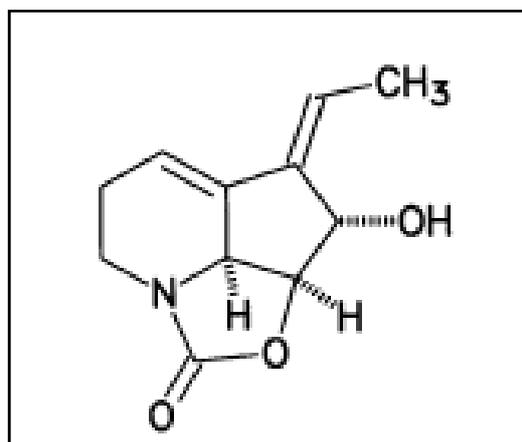


Figure 12 : Structure moléculaire de la streptazoline (Kratzel et Weigl, 1998).

Pour la souche GSBNT10, une augmentation de l'activité antimicrobienne proportionnelle à l'augmentation de la température a été remarquée. Il semblerait que l'extrait brut méthanolique de la souche GSBNT10 est résistant à des températures allant de 60°C jusqu'à 100°C. Cette stabilité est probablement liée à la structure chimique de la molécule antibiotique et antitumorale produite par cette souche qui est l'actinomycine D, donné en figure 13 ci- dessous.

L'actinomycine D est un antibiotique lactone chromopeptidique (Hamza *et al.*, 2013)

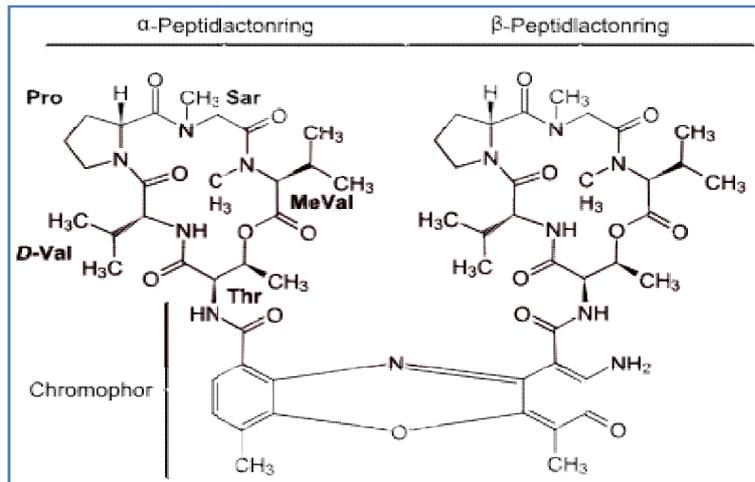


Figure 13 : Structure moléculaire de l'actinomycine D et du chromophore : phenoxazinone.

Ce résultat a également été rapporté par Nythia *et al.*, (2010) qui ont expliqué que la thermostabilité peut être due à la présence d'un noyau aromatique ainsi que des groupements carboxyles dans le squelette des molécules antibiotiques.

Par ailleurs l'effet de la durée de conservation des extraits bruts est également déterminée par la conservation de ces derniers à 4°C pendant 52 jours pour WR1L1S8, GSBNT22 et GSBNT4 et 15 jours pour SRC3. Après cette période, l'activité antagoniste des extraits bruts est testée.

La figure 14 présente l'effet de la durée de conservation sur les extraits bruts des isolats étudiés.

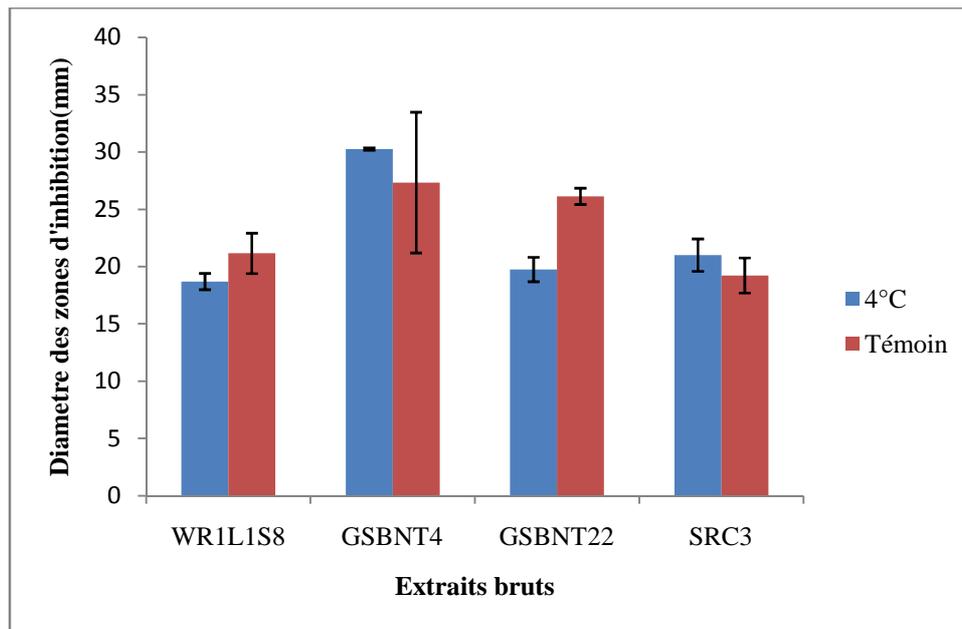


Figure 14 : Effet de la durée de conservation sur l'activité antagoniste des extraits bruts des isolats WR1L1S8, GSBNT4, GSBNT22 et SRC3.

Les résultats obtenus montrent que les diamètres des zones d'inhibition des témoins des quatre extraits bruts WR1L1S8, SRC3, GSBNT4 et GSBNT22 qui sont aux alentours de 21, 19, 27 et 25 mm respectivement, alors que ceux des extraits conservés à 4°C sont au voisinage de 19, 21, 30 et 20 mm.

Les activités antagonistes enregistrées après les périodes de conservation sont légèrement différentes à celles obtenues au tout début des expérimentations (avant conservation), ce qui suggère que la conservation à 4°C pour une longue durée n'altère pas les propriétés inhibitrices des extraits bruts étudiés.

Des études similaires ont été menées par Augustine, (2005) qui ont montré que l'antibiotique antifongique non-polyènique de la souche *Streptomyces albidoflavus* PU 23 est stable à une conservation de 12 mois à 4°C.

Tous ceci conforte l'hypothèse selon laquelle le stockage à 4°C n'as pas d'impact concret sur l'activité antibiotique de nos extraits bruts.

La figure 15 suivante présente l'effet des différents barèmes temps-température sur les activités antagonistes des extraits bruts testés.

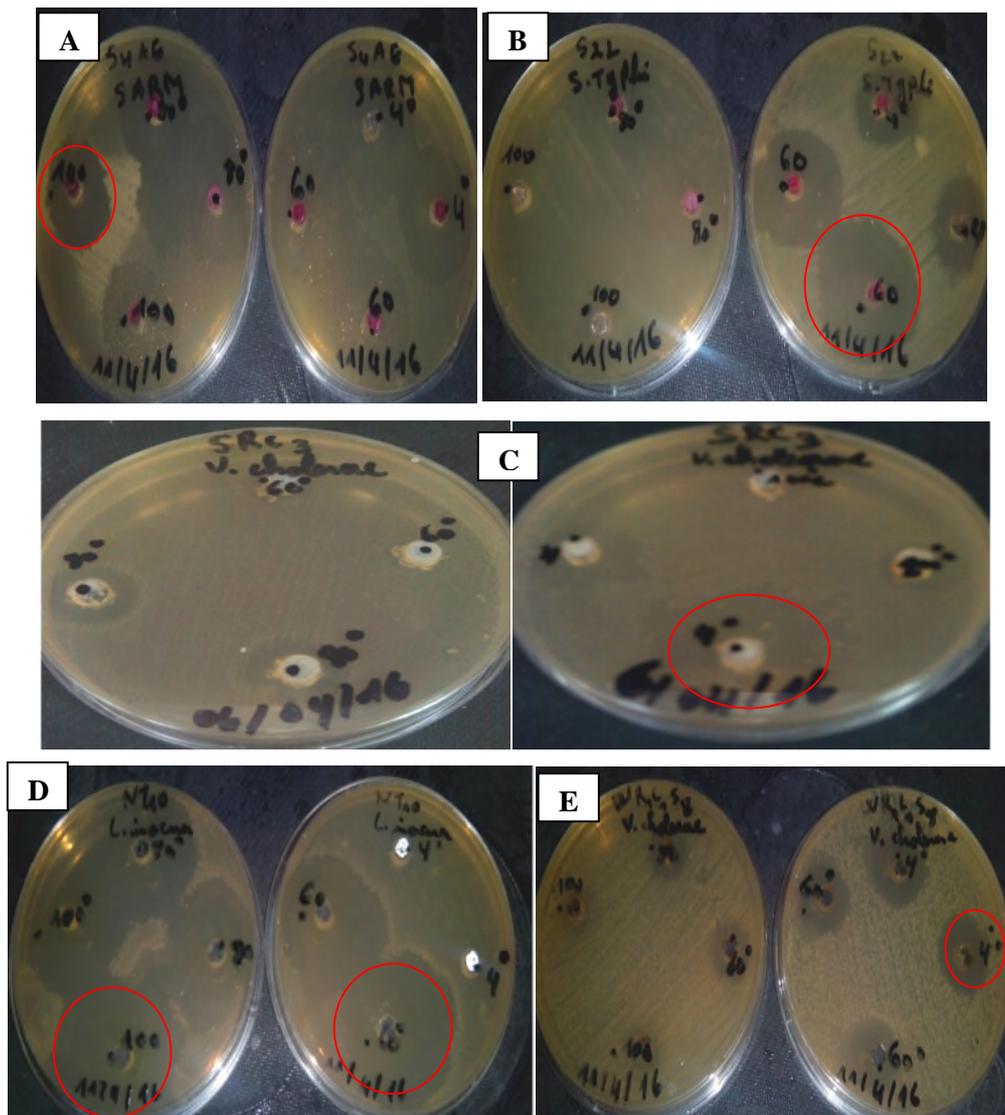


Figure 15 : Photographie illustrant l'effet des barèmes temps-température sur l'activité antagoniste des cinq extraits bruts testés : **A)** GSBNT4 AE, **B)** GSBNT22 AE, **C)** SRC3, **D)** GSBNT10, **E)** WR1L1S8.

IV.2. Effet des détergents sur l'activité antagoniste des extraits bruts

Les tensioactifs ou agents de surface sont des composés qui modifient la tension superficielle entre deux surfaces. Ils comprennent une large gamme de composés : les détergents, les agents moussants, mouillants, dispersants, et les émulsifiants (Boucheffa, 2010).

La sensibilité des extraits à l'effet dénaturant des détergents est vérifiée par l'ajout des agents suivants : Tween 20 et Tween 80. Ces agents sont mélangés avec les extraits bruts, après incubation à 30°C pendant 6 heures et les activités antimicrobiennes résiduelles sont testées.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans la figure 16 ci après.

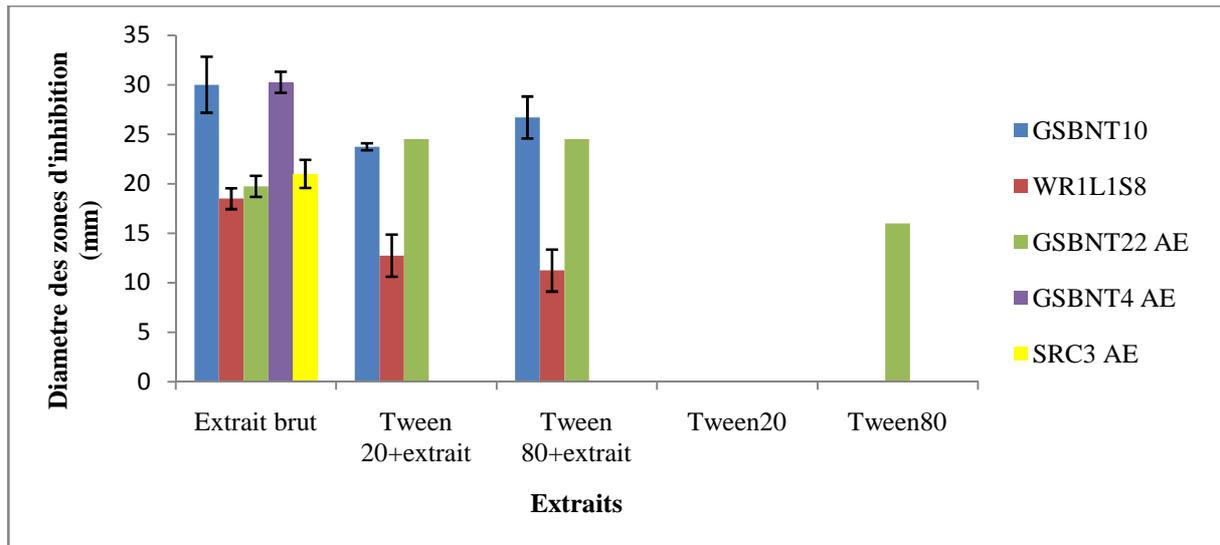


Figure 16 : Effet des surfactants (Tween 20 et Tween 80) sur l'activité antagoniste des extraits bruts des 5 souches d'actinomycètes.

Les extraits bruts méthanoliques des souches GSBNT10 et WR1L1S8 expriment une activité antibactérienne des zones d'inhibitions de 30 mm et 18,5 mm à l'égard de *L. innocua* et *V. cholerae* respectivement, alors que celles obtenues avec les extraits additionnés de détergents Tween 20 et Tween 80 sont de 23,75 et 26,7 mm pour GSBNT10 et de 11,25 et 12,75 mm pour WR1L1S8 respectivement. La diminution du diamètre de ces zones d'inhibition est due à l'effet additionnel de chaque détergent, sur les molécules bioactives contenues dans les extraits bruts. Il est alors évident que ces détergents affectent les molécules produites par les deux souches.

Pour les deux isolats SRC3 et GSBNT4, une absence d'activité a été remarquée pour les extraits additionnés de détergents et même pour les détergents seuls.

Les résultats de ce test indiquent que ces extraits combinés à l'action des différents surfactants diminuent ou éliminent l'activité antimicrobienne.

Pour l'extrait brut de la souche GSBNT22, une augmentation de l'activité antagoniste a été obtenue avec des zones d'inhibition de 24 mm de diamètre comparées avec celles du témoin (l'extrait brut seul) qui est de 19,75 mm. Cela suppose que les agents de tensions utilisés n'ont pas d'effet sur les molécules actives produites, mais il semblerait qu'ils contribuent à faciliter l'action de ces molécules sur les germes cibles en abaissant la tension superficielle de l'eau, ou bien en dégradant la membrane cytoplasmique (Tween 80) (Boucheffa, 2010).

La figure 17 expose quelques unes des activités antagonistes des extraits bruts après traitement par les surfactants.

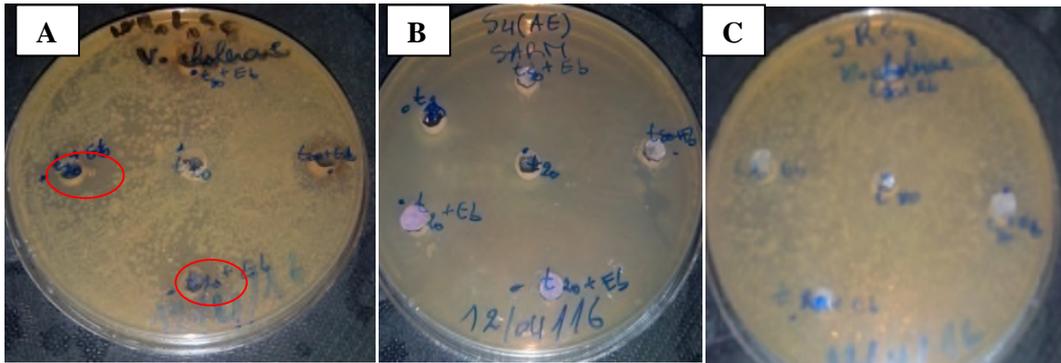
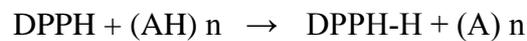


Figure 17 : Photographie illustrant l'effet des surfactants (Tween 20 et Tween 80) sur l'activité antagoniste des extraits bruts testés : **A)** WR1L1S8, **B)** GSBNT4 AE, **C)** SRC3.

V. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits bruts

Le DPPH est un radical libre stable violet en solution. Il présente une absorbance caractéristique dans un intervalle compris entre 512 et 517 nm, cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphényle picryl hydrazine (DPPH-H) par un composé à propriété antiradicalaire, entraînant ainsi une décoloration. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Moreno, 2002). Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH, qui est proportionnel au pouvoir antiradicalair de l'échantillon (Parejo et *al.*, 2002). la réaction est représentée comme suit :



Où : (AH) représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en diphényle picryl hydrazine (jaune) (Williams et *al.*, 1995).

Les résultats obtenus rapportés en figure 18 présentent le pourcentage d'inhibition des différents extraits bruts étudiés.

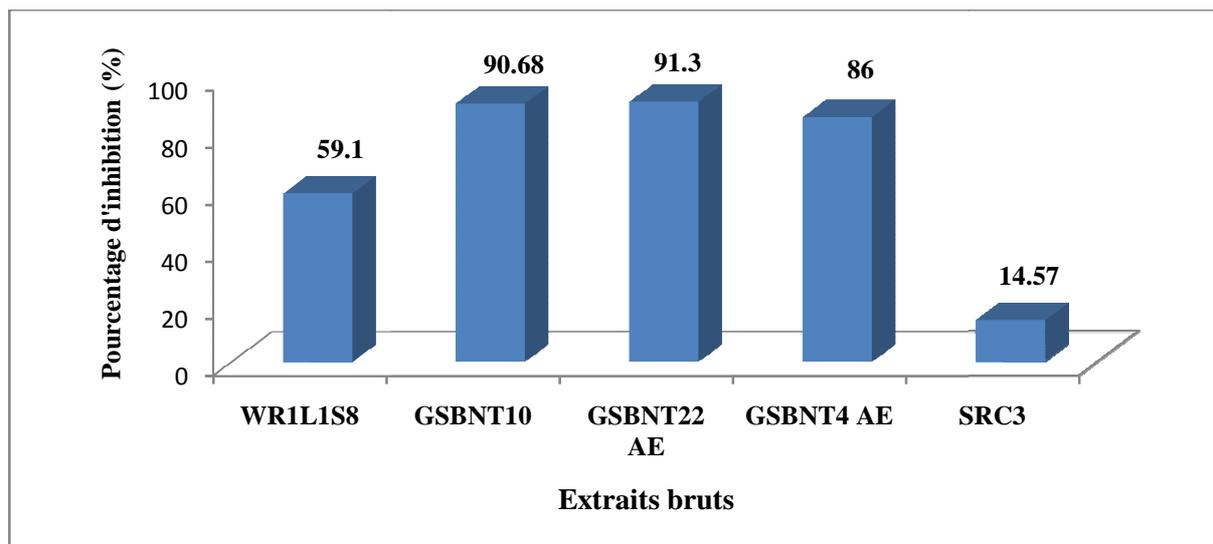


Figure 18 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par les extraits bruts de souches d'actinomycètes.

L'ensemble des résultats obtenus est illustré en figure 18 confirme que le pourcentage d'inhibition du DPPH diffère d'un extrait à un autre qui ont des concentrations différentes. La majeure partie des extraits bruts testés présente un pourcentage d'inhibition du DPPH supérieur à 50% à l'exception de l'isolat SRC3 qui possède un pourcentage d'inhibition faible (14%).

Suite aux résultats de ce test, seuls les extraits bruts de WR1L1S8 et GSBNT10 ont été utilisés pour la suite du travail du fait que les extraits bruts de GSBNT22 et GSBNT4 ont présenté certaines difficultés lors de leur préparation avant les essais pour le test.

L'activité antioxydante des extraits bruts des souches WR1L1S8 et GSBNT10 est évaluée par le biais de deux tests qui sont le piégeage du radical libre DPPH et la réduction de l'ion ferrique.

Les figures 22 et 23 présentent les activités antioxydantes des extraits bruts.

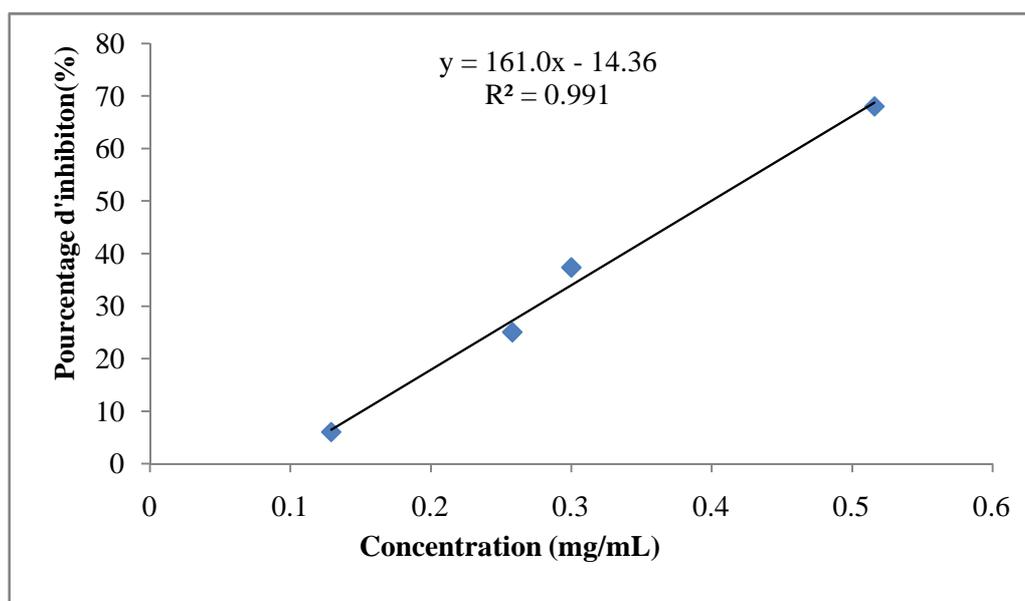


Figure 22 : Activité antioxydante de l'extrait brut méthanolique de l'isolat WR1L1S8.

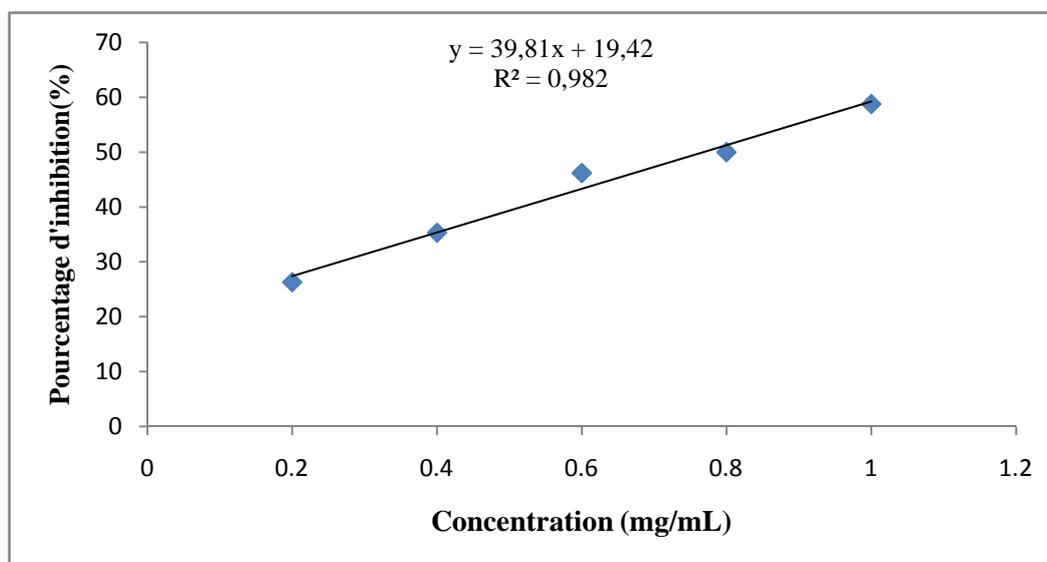


Figure 23 : Activité antioxydante de l'extrait brut méthanolique de l'isolat GSBNT10.

Les résultats obtenus montrent clairement que tous les extraits bruts étudiés ainsi que les standards, BHA, BHT et acide ascorbique (Annexe IV) réduisent d'une manière dose-dépendante le radical DPPH, c'est-à-dire le pourcentage de réduction (ou d'inhibition) du DPPH augmente avec l'augmentation de la concentration des extraits.

La concentration d'un extrait ou d'un standard provoquant 50% d'inhibition ou de

réduction du DPPH (IC_{50}) est calculée à partir de la partie linéaire des courbes de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de cet extrait (ou standard), avec un coefficient de régression supérieur à 0,95 ($R^2 > 0,95$).

L'extrait de la souche WR1L1S8 semble avoir l'effet inhibiteur le plus puissant sur le radical DPPH, avec une IC_{50} de 399 $\mu\text{g/mL}$ par rapport à l'extrait de la souche GSBNT10, avec une IC_{50} de 760 $\mu\text{g/mL}$ comme présentée en figure 24.

En comparaison avec l'acide ascorbique, le BHA et le BHT comme control positif, ayant des IC_{50} de 2,67 $\mu\text{g/mL}$, 115 $\mu\text{g/mL}$ et 247 $\mu\text{g/mL}$ respectivement. L'effet inhibiteur des extraits des deux souches est moins important que l'effet puissant des trois standards. Il est ainsi possible de noter :

IC_{50} acide ascorbique > IC_{50} BHA > IC_{50} BHT > IC_{50} WR1L1S8 > IC_{50} GSBNT10.

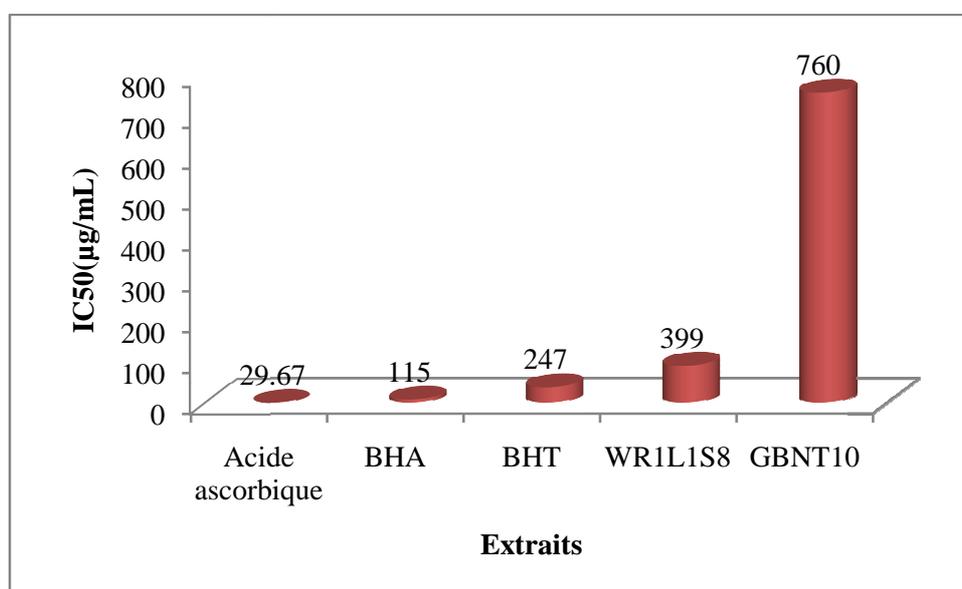


Figure 24 : Concentrations des extraits bruts méthanoliques des isolats WR1L1S8, GSBNT10 et des standards provoquant 50% d'inhibition (IC_{50}) du radical DPPH.

Actuellement, un grand intérêt est accordé aux composés naturels issus des actinomycètes et possédant des propriétés antioxydantes .

En effet, plusieurs études ont été menées dans ce sens par plusieurs auteurs. Thenmozhi et Kannabiran, (2012), ont évalué l'activité antioxydante d'une souche de *Streptomyces* sp.VITSTK7 qui a présenté un pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH de 43,2% à une concentration de 10mg/mL. Par ailleurs la valeur de l' IC_{50} est de 0,6464 $\mu\text{g/mL}$ qui est largement inférieurs à nos résultats avec des IC_{50} de 399 et 760 $\mu\text{g/mL}$ des deux isolats WR1L1S8 et GSBNT10 respectivement.

D'autres travaux allant dans le même sens ont été réalisés, Devi *et al.*, (2013) ont également évalué l'activité antioxydante d'extrait brut à l'acétate d'éthyle de la souche *Streptomyces* sp VITJS3, il révèle une inhibition de 60% à une concentration allant de [0,1 $\mu\text{g/mL}$ – 5 $\mu\text{g/mL}$] contre 68% à une 516 $\mu\text{g/mL}$ pour la souche WR1L1S8 et 58.76% à une concentration de 1000 $\mu\text{g/mL}$.

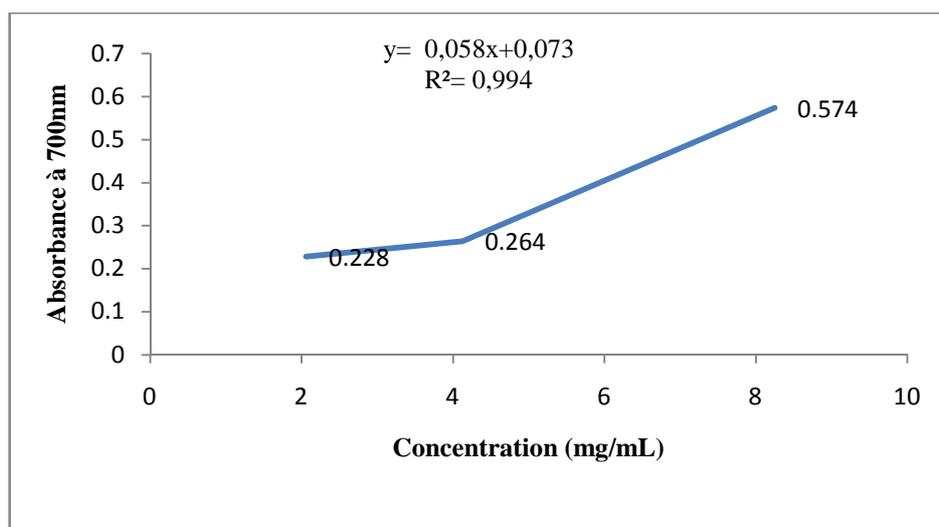
Une comparaison similaire concernant l'activité antioxydante peut également être faite sur d'autres souches de *streptomyces*, Lee *et al.*, (2014) ont déterminé l'activité antioxydante sur l'extrait brut d'acétate d'éthyle de l'isolat *Streptomyces* sp.MJM 10778 et ont rapporté que l'extrait brut d'acétate d'éthyle de cet isolat pourrait être considéré comme une source potentielle de médicaments pour les maladies qui sont causés par les radicaux libres grâce à ces activités anti-oxydantes et à sa faible cytotoxicité.

Il faut toutefois être très prudent lors de la comparaison des données issues de la littérature car il faut tenir compte non seulement du procédé d'extraction des biomolécules mais également de la polarité du solvant utilisé

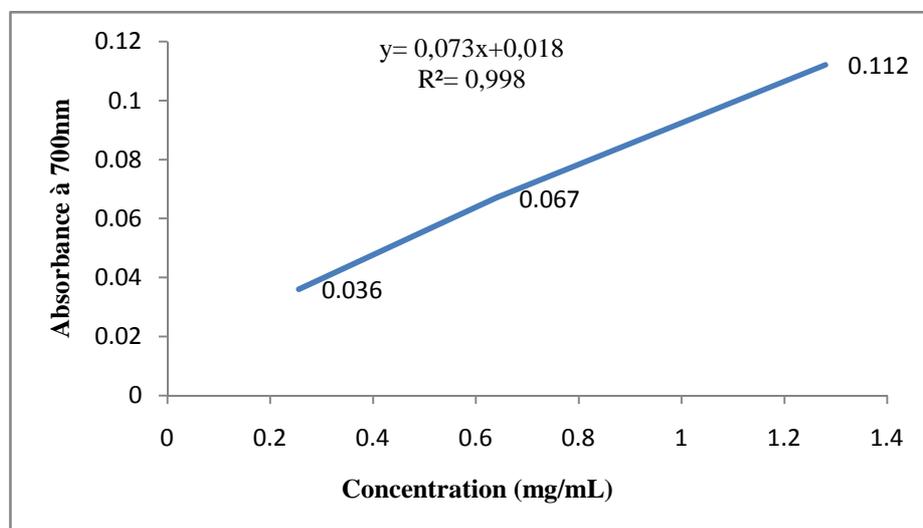
V.I. Evaluation du pouvoir réducteur

Cette méthode est basée sur l'aptitude des extraits à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}). Le mécanisme est connu comme étant un indicateur de l'activité donatrice d'électrons, caractéristique de l'action des antioxydants (Yildirim *et al.*, 2001).

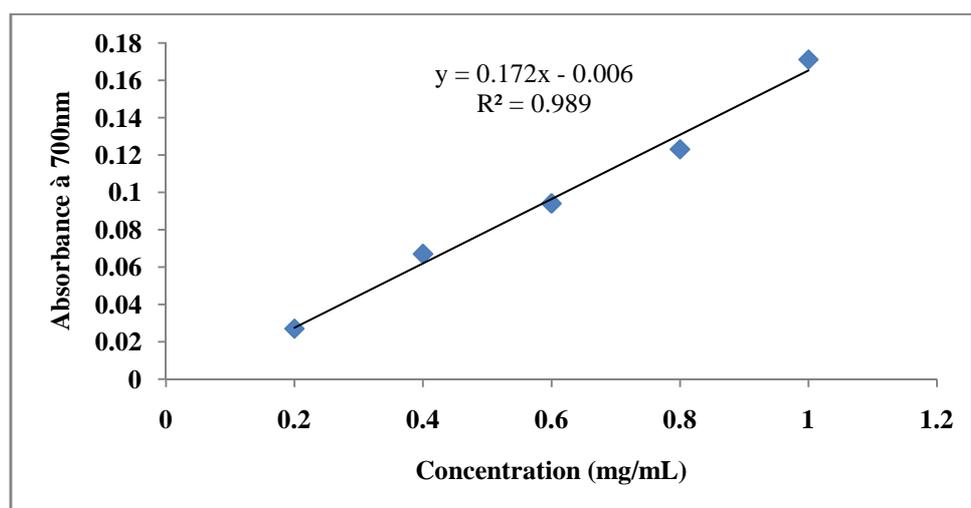
Les valeurs obtenues de ce test ont permis de tracer des courbes pour chaque extrait brut testé. Les résultats présentés en figure 26 nous exposent que la capacité de réduction est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de nos échantillons. Cette observation a été constatée et rapportée par plusieurs auteurs (Su *et al.*, 2008; Liuk *et al.*, 2009).



(1)



(2)



(3)

Figure 26 : Activité réductrice des extraits bruts méthanoliques et du standard : **1)** GSBNT10, **2)** WR1L1S8, **3)** Acide ascorbique.

Les résultats obtenus montrent que le pouvoir réducteur du standard (acide ascorbique) et des deux extraits bruts testés GSBNT10 et WR1L1S8 possèdent des densités optiques maximales de 0,17, 0,574 et 0,112, respectivement, à des concentrations de 1mg/mL, 8,25 mg/mL et 1,28 mg/mL.

Afin de comparer le pouvoir réducteur des extraits bruts des deux souches par cette méthode, la concentration EC_{50} qui est définie comme la concentration nécessaire pour réduire 50 % du ferricyanure de potassium a été calculée. Cette concentration est déterminée à une densité optique égale à 0,5.

Le résultat obtenu est illustré dans la figure 27

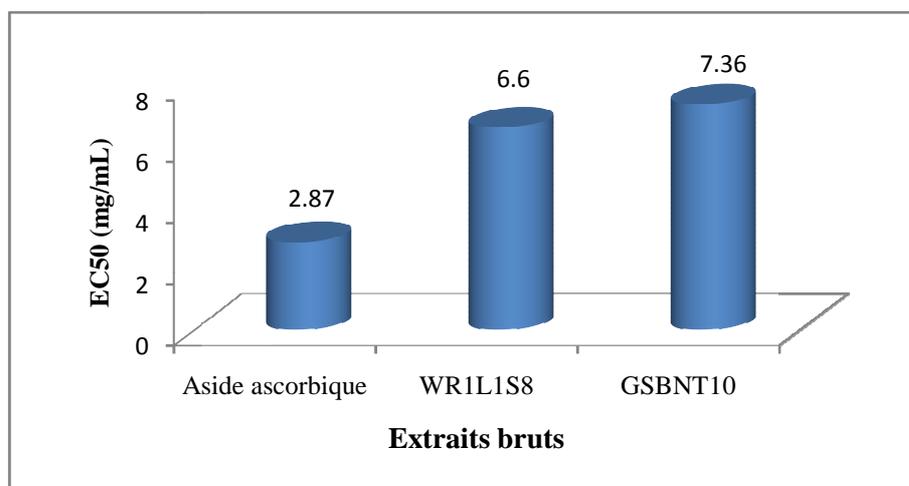


Figure 27 : Pouvoir réducteur des ions ferriques exprimé en EC_{50} du standard acide ascorbique et des extraits bruts des deux isolats WR1L1S8 et GSBNT10.

A la lumière des résultats obtenus, il est évident que les valeurs des EC_{50} qui sont de l'ordre de 7,36 mg/mL pour GSBNT10 et de 6,60 mg/mL pour WR1L1S8 sont faibles par rapport à celle de l'acide ascorbique qui est estimée à 2,87 mg/mL. Cette conclusion nous permet de noter :

$$EC_{50} \text{ acide ascorbique} > EC_{50} \text{ WR1L1S8} > EC_{50} \text{ GSBNT10}$$

Par ailleurs, il a été constaté que le pouvoir réducteur de l'acide ascorbique ainsi que celui des extraits bruts testés augmente avec l'augmentation de leurs concentrations, et la réduction de l'ion ferrique de ces extraits est inférieure à celui du standard. Des observations similaires ont été faites par différents auteurs Kekuda et al., (2010) sur la souche *Streptomyces* SRDP-H03, Manasa et al., (2012) sur *Streptomyces* sp. RAMPP-065, Thenmazhi et Kannabiran (2012) sur *Streptomyces* sp VITSVK5 et Gautam et al., (2013) sur l'isolat *Streptomyces fradiae* GOS1.

La capacité de réduction de ces composés peut servir d'indicateur notable du potentiel d'activité antioxydante des extraits bruts des souches actinomycétales (Kitada et al., 1979).

Conclusion

La résistance microbienne aux molécules constitue un problème important lorsqu'elle concerne des microorganismes pathogènes. Cette résistance se traduit par la capacité acquise d'un microorganisme à résister aux effets d'un agent chimiothérapeutique pour lequel il est normalement sensible; la propagation de ses bactéries est devenue une préoccupation sanitaire majeure.

La recherche de nouvelles substances antimicrobiennes dont le spectre d'activité serait plus large tout en étant moins agressif pour l'hôte semble toujours indispensable.

Les actinomycètes sont d'importants producteurs d'antibiotiques (75% par *Streptomyces*) et autres métabolites secondaires. Les deux tiers des quelque six mille antibiotiques isolés sont produits par les actinomycètes.

Les objectifs visés par ce travail sont : l'étude de l'aspect morphologique des souches d'actinomycètes d'origine marine et tellurique, l'extraction des molécules bioactives synthétisées et la mise en évidence de leur activité antimicrobienne et antioxydante.

L'étude morphologique met en relief différents caractères macro et micromorphologiques intéressants des cinq isolats.

La production et l'extraction des molécules bioactives a permis d'obtenir des extraits bruts à différentes concentrations, c'est une étape cruciale qui nous a permis de réaliser les différents tests.

L'activité antagoniste a été évaluée à l'égard de cinq souches microbiennes (*L.inocua*, SARM, *S.Typhi*, *V.cholerae* et *Candida albicans*) selon la méthode des puits. Les résultats indiquent que tous les extraits bruts testés possèdent une activité antimicrobienne vis-à-vis toutes les souches cibles à l'exception de l'extrait brut de l'isolat WR1L1S8 où le spectre d'action est plutôt restreint et non actif uniquement contre *Salmonella Typhi*.

L'étude de la stabilité des extraits bruts à différents barèmes de température, des détergents et la durée de conservation a été réalisée et les résultats obtenus ont permis de constater que les agents physico-chimique présentent un effet sur l'activité antagoniste des extraits bruts. Par contre la durée de conservation n'affecte pas cette dernière.

L'étude de l'activité antioxydante des extraits bruts des isolats GSBNT10 et WR1L1S8 par la méthode de la réduction du fer et celle du piégeage du radical libre DPPH a montré que les deux extraits méthanoliques possèdent une activité antioxydante modérée. Cette activité reste néanmoins inférieure à celle des standards, mais il s'agit d'extraits bruts

contenant un grand nombre de composés différents. Il est donc très probable qu'ils contiennent des composés qui, une fois purifiés, peuvent présenter une activité comparable à celle des standards.

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

Toutefois, il ressort de l'intérêt de poursuivre les investigations au tour des axes suivants:

- Compléter ces résultats par des tests indispensables, notamment l'obtention de substances purifiées (CCM, HPLC) et une caractérisation plus poussée avec des techniques performantes tels l'IR, la RMN, la spectroscopie de masse...etc, .notamment pour les extraits bruts des isolats GSBNT22 et GSBNT4.
- Elargir la gamme de germes cibles pour les isolats étudiés.
- Faire une étude complète sur les extraits pour pouvoir déterminer les conditions permettant une meilleure conservation de leurs activité et une meilleure action in-situ (tels que le pH , élargir à d'autres détergents....etc
- Identifier les antioxydants des extraits des isolats d'actinomycètes par des techniques plus performantes telles que l'HPLC.

*Références
Bibliographiques*

A

- Abdelhalem A. Hamza¹, Hiba A. Ali¹, Benjamin R. Clark, Cormac D. Murphy et Elsheit A. Elobied. (2013). Optimization of fermentation conditions for actinomycin D production by a newly isolated *Streptomyces* sp. AH 11.4. *E3 Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research*. **4**(2), 29-34
- Atawodi S. E. (2005). Antioxidant potential of African plants. *African Journal of Biotechnology*. **4** 2, 128-133.
- Augustine S.K, Bhavsar S.P et Kapadnis B.P. (2005). A non-polyene antifungal antibiotic from *Streptomyces albidoflavus* PU 23. *Journal of Bioscience*. **30**, 201–21.
- Avissar N, Whitin J.C, et Allen P.Z. (1989). Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase. *Journal of Biology Chemistry*. **2**, 15850-15855.

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. 226 p
- Badji. B, Zitouni. A, Mathieu. F, Lebrihi. A et Sabaou. S. (2006). Antimicrobial compound produced by *Actinomadura* sp. AC104 isolated from an Algerian Saharan soil. *Can. Journal of Microbiology*. **52**, 373–382.
- Barlow .S.M. (1990). Toxicological aspects of antioxydants used as food addives. *In: Food antioxydants*, Hudson B.J.F. (ed.), Elseveir, Amsterdam. 253-307.
- Becker. B, Lechevalier. M. P et Lechevalier. H. A. (1965). Chemical Composition of Cell-Wall Preparations from Strains of Various Form-Genera of Aerobic Actinomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*. **13**, 236-243.
- Billerbeck. V.G, Roques. C, Vanière. P et Marquier. P. (2002). Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. Laboratoire de Bactériologie, virologie et microbiologie industrielle. *Médecine et Hygiène Revue* N°3.
- Boucheffa. K. (2010). Criblage de souches d'actinomycètes productrices d'antifongiques non polyèniques : Identification des souches productrices et essai de caractérisation des antifongiques produits. Thèse de magister. Université A. Mira, Bejaia.

- Boudemagh. A, Kitouni. M, Boughachiche. F, Hamdiken. H, Oulmi. L, Reghioua. S, Zerizer. H, Couble. A, Mouniee. D, Boulahrouf. A et Boiron. P. (2005). Isolation and molecular identification of actinomycete microflora, of some saharian soils of south east Algeria (Biskra, EL-Oued and Ourgla) study of antifungal activity of isolated strains. *Journal of Medical Microbiology*. **15**, 39–44.
- Boudjouref. M. (2011). Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L. Thèse de magister. Université Ferhat Abbes, Sétif.
- Boughachiche F, Reghioua S, Oulmi I, Zerizer H, Kitouni M, Boudemagh A et Boulahrouf A. (2005). Isolement d'actinomycetales productrices de substances antimicrobiennes à partir de la sebkhia de Ain Mlila. *Science and Technology of Advance Materials*. N °**23**. 5-10.
- Bouix M et Leveau J-Y. (1993). Microbiologie industrielle, les micro-organismes d'intérêt industriel. Technique et documentation. Lavoisier, Paris.
- Boyd B, Ford C, Koepke M.C, Gary K, Horn E, McAnalley S et McAnalley B. (2003). Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose sur des personnes en bonne santé. *Glycoscience et Nutrition*. **4**, 7.
- Brand-Williams W, Cuvelier M.E et Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie/Food Science and Technology*. **28**, 25-30.
- Branen AL et J Am Oil Chem Soc. (1975). Toxicology and biochemistry of butylatedhydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **52**, 59-63.

C

- Conn. V.M. (2005). Molecular Interactions of endophytic Actinobacteria in Wheat and Arabidopsis. Thèse de Doctorat. Flinders University. Adelaide, South Australia. pp 297.

D

- Danilenko. V.N, Mironov. V.A et Elizarov. S.M. (2005). Calcium as a Regulator of Intracellular Processes in Actinomycetes. *Applied Biochemistry and Microbiology*. **41**319–329.
- Demain A.L. (2000). Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **52**, 455-63

- Demain. A.L et Lancini. G. (2006). Bacterial Pharmaceutical Products. *Prokaryotes*. **1**, 812– 833.
- Djinni. I. (2009). Etude taxonomique de souches d'actinomycètes halophiles modérées productrices de substances antimicrobiennes isolées dans la région de Béjaia. Thèse de Magister. Université A. Mira, Bejaia.
- Dong-Ryung Lee, Sung-Kwon Lee, Bong-Keun Choi, Jinhua Cheng, Young-Sil Lee, Seung Hwan Yang et Joo-Won Suh. (2014). Antioxidant activity and free radical scavenging activities of *Streptomyces* sp. strain MJM 10778. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. **14**, 962-967
- Drautz H, achner Z, Kupfer E et Keller W. (1981). Benzoanalogous Congeners of Streptazolin. Schierlein. *Helvetica Chemica Acta*. **64**, 17-52

E

- Enghusen H. (1956). Electron microscopy of spores and their shell in *Streptomyces*. *Review Microbiology*. **21(3)**, 329-34
- Ensign J. C, Normand p, Burden J. P et Yallop C. A. (1993). Physiology of some actinomycetes genera. *Review Microbiology*. **144**, 657-660.

F

- Frankel E. N. (1993). In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in foods lipids. *Trends in Foods Sci. technol*. **4**, 220-225.

G

- Gardès-Albert M, Dominique Bonnefont-Rousselot, Zohreh Abedinzadeh Z et Daniel Jore D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène: Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'actualité chimique*. pp: 91-96.
- Gautham SA et Onkarappa R. (2013). *In vitro* antioxidant activity of metabolite from *Streptomyces fradiae* strain GOS1. *International Journal of Drug Development and Research*. **5**, 235-244.
- Goodfellow M. and Williams S.T. (1983). Ecology of Actinomycetes. *Annual Review of Microbiology*. **37**, 139-216.
- Goodfellow M, Williams S.T. et Mordarski M. (1984). Introduction to and importance of the actinomycetes. *In: « The biology of the actinomycetes »*. Goodfellow M., Williams S. and Mordarski M. (Eds.). London: Academic Press, pp. 1-6.

H

- **Hodgson D. A.** (2000). Primary metabolism and its control in streptomycetes: A most unusual group of bacteria. *Advance. Microbial Physiology*. **42**, 47- 238.
- **Hubert. A. J.** (2006). Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja. Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaine. Thèse de doctorat. Toulouse : INPT.

I

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

J

- **Jacque B et André R.** (2004). biochimie métabolique. Ellipse Edition marketing S.A. Paris. pp. 220-230.
- **Jensen P.R, Dwight R et Fenical W.** (1991). Distribution of actinomycetes in near shore tropical marine sediments. *Appl. Enviro. Microbiol.* **57**, 1102-1108.

K

- **Khachatourians. G.G.** (1998). Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. *Canadian Medical Association* **159**, 1129-1136.
- **Kekuda PTR, Shobha KS et Onkarappa R.** (2010). Studies on antioxidant and anthelmintic activity of two *Streptomyces* species isolated from Western Ghat soil of Agumbe, Karnataka. *Journal of Pharmacy Research* **3**, 26-29.
- **Kieser T, Bibb M.J, Chater K.F et Hopwood D.A.** (2000). Pratical *Streptomyces* Genetics, John Innes Foundation, Norwich Research Park, Colney, Norwich NR4 7UH, England.
- **Kitada M, Igarashi K, Hirose S et Kitagawa H.** (1979) Inhibition by polyamines of lipid peroxide formation in rat liver microsomes. *Biochememical and Biophysical Research Communications*. **87**, 388–394.
- **Kovács.K, Antal.I, Stampf.G, Klebovich.I et Ludányi.K.** (2010). Composition Optimization and Stability Testing of a Parenteral Antifungal Solution based on a Ternary Solvent System. *AAPS Pharmceutical and Science Technology*. **11**, 285-293.
- **Kozikowski. AP et Park.P.**(1985). Total synthesis of (+/-) streptazolin. *Jornal of the American Chemical Society*. **107**, 1763.

- Kozikowski. AP et Park.P. (1990). Total synthesis of (+)-streptazolin. *Journal of Organic Chemistry*. **55**, 4668.
- Kratzel et Weigl. (1998) Benzoanalogous Congeners of Streptazolin Institute of Pharmaceutical Chemistry, University of Vienna, A-1090 Vienna, Austria *monatshefte für chemie* **129**, 967.

L

- Lacey. J. (1997). Actinomycetes in composts. *Ann Agric Environ Med*. **4**, 113–121.
- Larpent. JP et Sanglier JJ. (1989). Biotechnologie des antibiotiques. (Ed.), Masson. Paris, 48.
- Lawrence C.H. (1956). A method for isolating actinomycetes from scabby potato tissue and soil with minimal contamination. *Canadian Journal of Botany*. **34**, 44-47.
- Lechevalier M.P. and Lechevalier H.A. (1970). Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **20**, 435-443.
- Lechevalier M.P, De Bievre C. et Lechvair H.A. (1977). Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes : Phospholipid composition. *Biochemical Systematics and Ecology*. **5**, 249-260.
- Lechevalier M.P. (1981). Ecological associations involving actinomycetes. In: Actinomycetes. Shaal and pulverer (Eds.). Zbl. Bakt. Suppl. **11**, 159-166.
- Liuk L, Sun Y, Laura T, Liang X, Ye H et Zeng X. (2009). Determination of polyphenolic content and antioxydant activity of Kudingcha made from Ilex Kudingcha C.J. Tseng. *Food chemistry*. **112**, 35-4.
- Loucif. K. (2011). Recherche de substances antibactériennes à partir d'une collection de souches d'actinomycètes. Caractérisation préliminaire de molécules bioactives. Thèse de Magistère en Microbiologie appliquée et biotechnologie microbienne. Université de Mentouri, Constantine.

M

- Manasa .M, Poornima. G, Abhipsa. V, Rekha. C, Kekuda. PTR, Onkarappa. R et Mukunda. S. (2012). Antimicrobial and antioxidant potential of Streptomyces sp. RAMPP-065 isolated from Kudremukh soil, Karnataka, India, *Science, Technology and Arts Research Journal*. **1**, 39-44.

- Mariat. F et Sebald. M. (1990). Actinomycètes In: Bactériologie Médicale. Le Minor L. et Véron M. (Eds.), 2ème édition, Flammarion. Paris. 935-949.
- Martinez-Cayuela. M. (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochemical.* **77**, 147-161.
- Mayer M et Thiericke R. (1993). Biosynthesis of Streptazolin. *Journal of Organic Chemical.* **58**, 3486–3489
- Moure A , Cruz J. M, Franco D, Manuel Dominguez. J, Sineiro. J, dominguez H, Nunez M. J et Carlos Parajo J. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry.* **72**, 145-171.

N

- Narayana. KJP, Prabhakar. P, Vijayalakshmi. M, Venkateswarlu. Y et Krishna PSJ. (2008). Study on bioactive compounds from *Streptomyces* sp. ANU 6277 *Pol Journal of Microbiology.* **57**, 35 – 39.
- Nedal. A. (2007). Post-PKS modifications in the biosynthesis of the antifungal antibiotic nystatin. Thèse de Doctorat. Norwegian University. Norvège.
- Nithya S et Pandian S.K. (2010). Isolation of heterotrophic bacteria from Palk Bay sediments showing heavy metal tolerance and antibiotic production. *Microbiological Research.* **165**, 578-593.
- Nomura. I et Mukai. C. (2002). Total synthesis of (+/-) 8 α - hydroxystreptazolone. *Organic Letters.* **4**, 4301-4304
- Nomura. I et Mukai. C. (2004). Studies on the Total synthesis of streptazolin and its related natural products : first total synthesis of (+/-) 8 α - hydroxystreptazolone. *Journal Organic chemistry.* **69**, 1803-1812

O

- Omura S. (1992). The search for bioactive compounds from microorganisms. Springer Verlag, New York. Inc. **281**–303.
- .Ou. X, Zhang. B, Zhang. L, Dong. K, Liu. C, Zhao. G et Ding. X. (2008). SarA influences the sporulation and secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* M145. *Acta. Biochimica et. Biophysica Sinica.* **40**, 877-882.
- Overbye K.M et Barrett J.F. (2005). Antibiotics : where did we go wrong ?. *Drug Discovery Today.* **10**, 45–52.

- Oyaizu. M. (1986). Studies on products of the browning reaction : antioxidatives of products of browning prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, **44**, 307-316.

P

- Panchanathan M, Jayachandran V et Se-Kwon Kim. (2013). Brown seaweed fucoidan: Biological activity and apoptosis, growth signaling mechanism in cancer. *International Journal of Biological Macromolecule*. 60, 366–374.
- Parejo I, Valadomat F, Bastida j, Rossa – Remero A, Ferlage N, Burillo j et Codina C (2002). Comparison between the radical scavenging activities and antioxidant activity of six distilled and non-distilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **50**, 6882 - 6890.
- Pimentel-Elardo, S.M., Kozytska, S., Bugni, T.S., Ireland, C.M., Moll, H., Hentschel, U. (2010). Anti-Parasitic compounds from *Streptomyces* sp. strains isolated from Mediterranean sponges. *Mar. Drugs*. **8**, 373–380.
- Puder C, Loya S, Hizi A et Zeeck A. (2001). New co-metabolites of the streptazolinpathway. *Journal Natural Products*. **64**, 42–45

R

- Ragnarsson, J.O, Leick D et Labuza T.P. (1977). Accelerated temperature study of antioxidants. *Journal of Food Science*. **42**, 1536-1544.
- Rauha JP, JL. Wolfender, JP. Salminen, K. Pihlaja, K. Hostettmann et H. Vourela. (2001). Characterization of the polyphenolic composition of purple loosestrife (*Lythrum Salicaria*). *Z.Naturforsch.* **56**, 13-20.

S

- Sabaou. N, Boudjella. H, Bennadji. A, Mostefaoui. A, Zitouni. A, Lamari. L, Bennadji. H, Levevre. G et Germain. P. (1998). Les sols des oasis du Sahara, algérien, source d'actinomycètes, rares producteurs d'antibiotiques. *Sécheresse*. **9**, 147-153.
- Sanchez-Moreno C, Larrauri Jose A et Saura-Calixto F. (1998). A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **76**, 270-276.

- Sanchez-Moreno C. (2002). Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*. **8**, 121-137.
- Sanglier J.J et Turjillo M. (1997). Substance bioactives produites par les actinomycètes et stratégie de selection des souches. *Bulltin de société Française et Microbiologie*. **12**.
- Sarma A D, Mallick A R et Ghosh A K. (2010). Free Radicals and Their Role in Different Clinical Conditions: An Overview. *International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR)*. **1**, 185-192.
- Schwarz. S, Kehrenberg. C et Walsh. T.R. (2001). Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **17**, 431–437.
- Srivibool R et Sukchotiratana M. (2006). Bioperspective of actinomycetes isolates from coastal soils : A new source of antimicrobial producers. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. **28**, 493-499.
- Stackebrandt E. et Woese C.R. (1981b). The evolution of prokaryotes. *Synposium Society General Microbiology*. **32**, 1-31.
- Strub. C, Brandam. C, Meyer. X et Lebrihi. A. (2008). Investigations of *Saccharothrix algeriensis* Growth on Synthetic Media. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **106**, 148-153.
- Su M.S, Shyu Y. T et Chien P.J. (2008). Antioxydant activities of citrus herbal product extracts. *Food chemistry*. **111**, 892-896.
- Subathra Devi. C, Amrita Kumari, Nitin Jain, Jemimah Naine.S et Mohanasrinivasan.V (2013). Screening of actinomycetes isolated from soil samples for antibacterial and antioxidant activity. *international journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*. **4**, 483-489.

T

- Tarkka. M; and Hampp. R. (2008). Secondary Metabolites of Soil Streptomycetes in Biotic Interactions in Secondary Metabolites in Soil Ecology. *Soil Biology*, P. Karlovsky (ed.), 14, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Theilleux J. (1993). Les actinomycètes in *Microbiologie Industrielle, les microorganismes d'intérêt industriel*. Lavoisier , Tech et Doc, Apria, V 612p, pp 425.

- Thenmozhi M ; Kannabiran K. (2012). Cytotoxicity and antioxidant activity of 5-(2,4-dimethylbenzyl) pyrrolidin-2-one extracted from marine *Streptomyces* VITSVK5 spp. *Saudi Journal of Biological Sciences* **19**, 81–86.
- Thenmozhi M; Kannabiran K. (2012). Antimicrobial and antioxidant properties of marine actinomycetes *Streptomyces* sp VITSTK7. *Oxidants and Antioxidants in Medical Science*. **1**, 51-57.

W

- Wayne L.G, Brenner D.J, Colwell R.R, Grimont P.A.D, Kandler O, Krichevsky M.I, Moore L.H, Moore W.E.C, Murry R.G.E, Starr M.P et Trüper H.G. (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematic. *International Journal Systematic Bacteriology*. **37**, 463-464.
- 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 et West M. (1993). Detection and identification of novel actinomycetes. *Microbiology*. **144**: 653–656.

Y

- Yildirim. A, Mavi. A et Kara. A. (2001). Determination of antioxydant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, pp.4083-4089.

Z

- Zheng D, Han L, Li Y, Li J, Rong H, Leng Q, Jiang Y, Zhao L et Huang X. (2012). Isostreptazolin and sannaphenol, two new metabolites from *Streptomyces sannanensis* Molecules. **17**, 836-842.
- Zili.Z, Sfar.S et Fessi.H. (2005). Preparation and characterization of polycaprolactone nanoparticles containing griseofulvin. *International Journal Pharmaceutics* **294**, 261–267.

Annexes

Annexe I

Tableau I : Chimiotypes rencontrés chez les actinomycètes (Becker *et al.* 1965).

Chimiotype	DAP		Gly	Lys	Orn	DAB	Sucres			
	LL	DL					Ara +Gal	Xyl +Ara	Rha +Gal	Mad
I C	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
II D	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
III B	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
IIIC	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
III E	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
IV A	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
V	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
VI	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
VII	-	-	+	v	-	+	-	-	-	-

Note : I, II, III, ..., VIII : définis par Becker *et al.*, (1965) et Lechevalier et Lechevalier (1970) en se basant sur la forme LL ou DL de l'acide diaminopimélique (DAP), la présence ou non de glycine (Gly.), de lysine (Lys.), de l'ornithine (Orn.) ou de l'acide diaminobutyrique (DAB). A, B, C, D et E : définis par Lechevalier et Lechevalier (1970) en se basant sur les sucres taxonomiquement importants : l'arabinose (Ara.), le galactose (Gal.), le xylose (Xyl.), le madurose (Mad.) et le rhamnose (Rha.). + : présent. - : absent. v : variable suivant les espèces d'un même genre.

Annexe II

Matériel utilisé

- Autoclave (BIOBASE)
- Bain-Marie (GFL)
- Balance analytique (RADWAG référence : PS210/C/2)
- Ballons
- Bec Bunsen
- Bechers
- Boîtes de pétri
- Ecouvillons
- Entonnoir
- Eprouvette
- Erlenmeyers
- Etuves à 28 °C et à 37°C (memmert)
- Flacons
- Micropipette de 10-100µL
- Microscope optique (ZEISS)
- Pied à coulisse (STINLESS HARDEND)
- Pipettes Pasteur
- Plaque agitatrice (Raypa AG-5)
- Rotavapor (Bûchi Rotavapor R-114)
- Spectrophotomètre (RAYLEIGH)
- Tube à essais
- Vortex (VELP scientifica)

Annexe VI

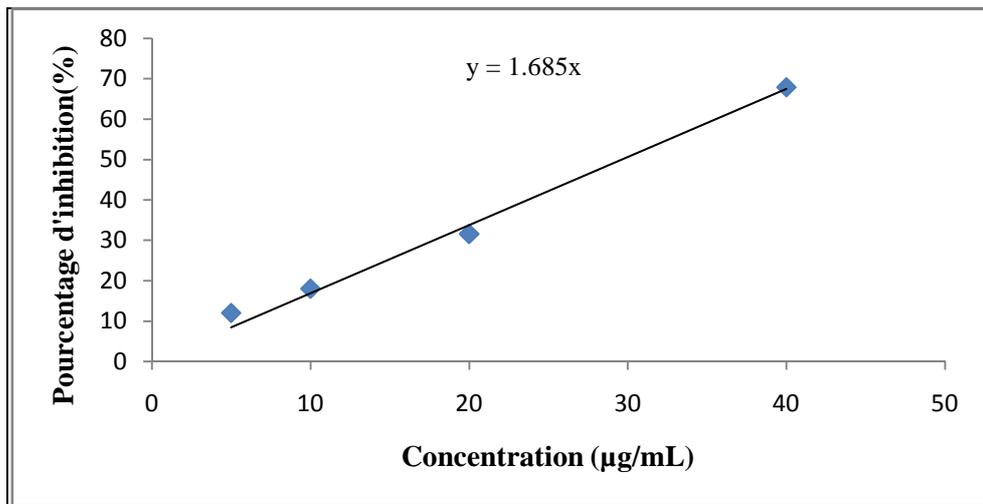


Figure 18 : Activité antioxydante de l'acide ascorbique

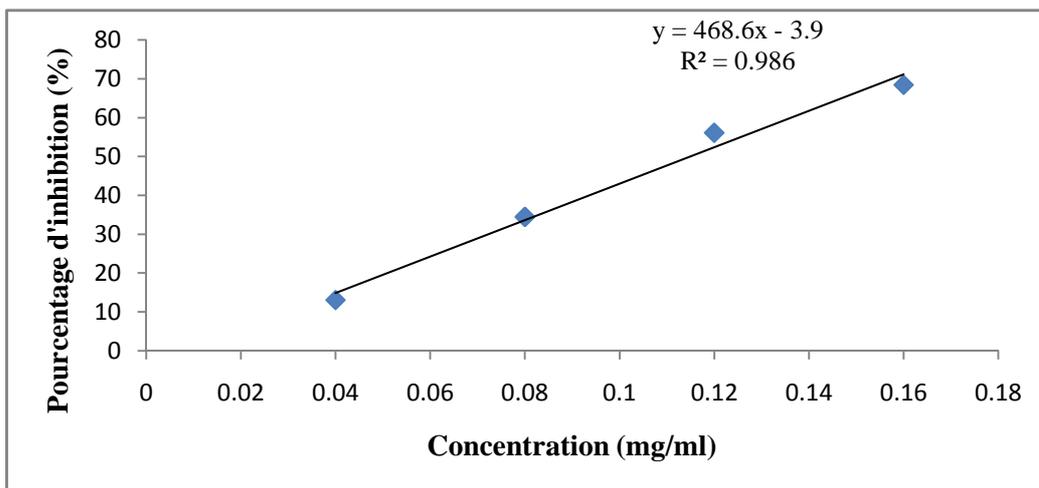


Figure 19 : Activité antioxydante du Butylated hydroxyanisole (BHA)

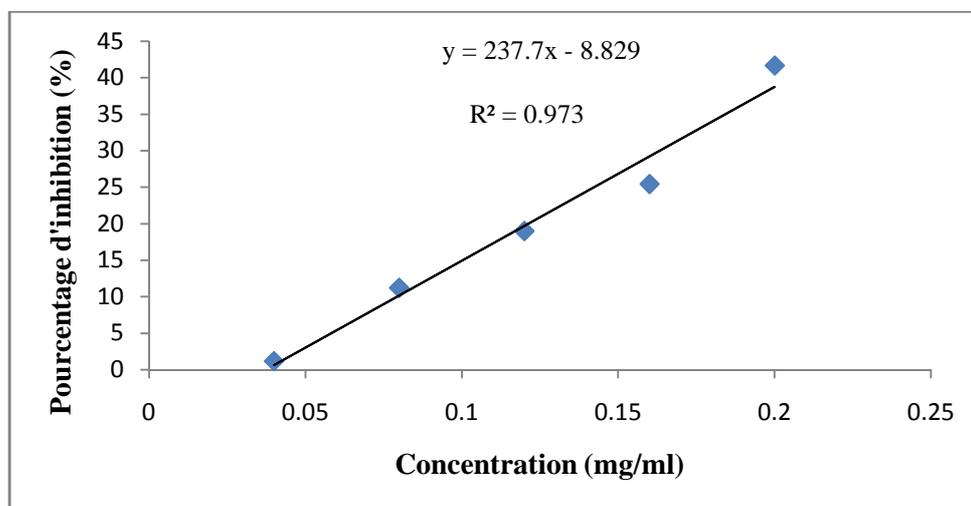


Figure 20 : Activité antioxydante du Butylated hydroxytoluene (BHT)

Résumé

Les activités antimicrobiennes et antioxydantes de cinq extraits bruts d'acétate d'éthyle et de méthanol de souches d'actinomycètes, d'origines tellurique et marine, ont été mises en évidence. Les caractères phénotypiques incluant les critères macro et micromorphologiques des 5 isolats ont été de ce fait étudiés. Le pouvoir antagoniste des extraits bruts a été estimé à l'égard de *L.inocua*, SARM, *S.Typhi*, *V.cholerae* et *Candida albicans* par la méthode des puits. Sur les 5 extraits bruts testés, la totalité a présenté un effet bactéricide non négligeable, particulièrement l'extrait brut de la souche GSBNT10 avec des antagonismes avoisinant les 57mm. L'évaluation de la stabilité de l'activité antimicrobienne à l'action de plusieurs agents physico-chimiques (barème temps-température et détergents) a également été déterminée.

L'activité antioxydante des extraits bruts a été évaluée à travers le piégeage du radical libre DPPH et de la réduction de l'ion ferrique. Pour le premier test, le pourcentage d'inhibition du DPPH a été estimé à 14%, 59.1%, 86%, 90.68%, 91.3% pour les extraits des isolats SRC3, WR1L1S8, GSBNT4, GSBNT10, et GSBNT22, respectivement. L'effet inhibiteur des extraits des isolats WR1L1S8 et GSBNT10 est moins important que l'effet puissant des standards : acide ascorbique, BHT et BHA. L'activité antioxydante des deux isolats est représentée par une IC₅₀ de 399µg/mL et 760µg/mL respectivement. Pour le second test l'EC₅₀ a été estimée à 6.60 mg/mL pour WR1L1S8 et 7.36 mg/mL pour GSBNT10.

Mots clés : Actinomycètes, *Streptomyces*, Extrait brut, Activité antimicrobienne, Activité antioxydante, Pourcentage d'inhibition.

Abstract

The antimicrobial and antioxidant activities of five ethyl acetate and methanol crude extracts of actinomycete strains, from terrestrial and marine origin, have been investigated. Phenotypic characteristics including macro and micromorphological features of the 5 strains were there for carried out. The antagonist activities against 4 pathogenic bacteria *L.inocua*, SARM, *S.Typhi*, *V.cholerae* et *Candida albicans* by the well method. All the 5 crude extracts tested presented a significant bactericidal effect in particular the GSBNT10 crude extract with against adjacent 57mm.

The study of the stability of the antimicrobial activity to the action of various physico-chemical agents was also determined.

The antioxidant activity of the crude extracts was assessed through trapping of free radical DPPH and the reduction of ferric ion. For the first test, the inhibition percentage of DPPH was estimated at 14%, 59.1%, 86%, 90.68%, 91.3% for the crude extracts of SRC3 isolates WR1L1S8, GSBNT4, GSBNT10 and GSBNT22 respectively. The inhibitory effect of WR1L1S8 and GSBNT10 crude extracts is less important than the of ascorbic acid, BHT and BHA standards. The antioxidant activity of both isolates is represented by IC₅₀ estimated at 399µg/mL and 760µg/mL respectively. For the EC₅₀ were values they estimated at 6,60 mg/mL for WR1L1S8 and 7.36mg/mL for GSBNT10.

Keywords : Actinomycetes, *Streptomyces*, Crude extract, Antimicrobial activity, Antioxidant activity, Inhibition percentage.