

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار تليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie appliquée

THEME

Contribution à l'étude de l'activité antifongique et antioxydante des
métabolites secondaires produits par quelques bactéries du genre
Streptomyces isolées des sols forestiers de la région d'Oued el
Oukrif (Saida)

Présenté par :

BEN CHINE Khedidja

BENAROUS Zineb Islah

Devant le jury :

Président : Krantar Kamel

Université Amar Telidji-Laghouat

Rapporteur : Gacem Mohammed Amine

Université Amar Telidji-Laghouat

Co-Rapporteur : Boudjemaa Badreddine

Université Amar Telidji-Laghouat

Examineur : Zerouki Hocine

Université Amar Telidji-Laghouat

Soutenu publiquement le 20/06/2018.

Table des matières

Liste des abréviations	I
Liste des figures	II
Liste des photos	IV
Liste des tableaux	V
Résumé	VI
Abstract	VII
ملخص	VIII
Introduction	01

PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralité sur les Actinobactéries	3
I.1. Définition et caractéristiques généraux des Actinobactéries	3
I.2. Ecologie et distribution dans la nature	4
I.3. Classification des actinomycètes	5
I.4. Le cycle de vie	6
I.5. Rôle des actinomycètes dans le sol	7
I.6. Importance environnementale des actinomycètes.	7
I.6.1. Dans les domaines médical, vétérinaire et industriel I.6.2. Dans le domaine agronomique	8
I.7. Métabolites des actinomycètes	8
I.7.1. Les antibiotiques	9
I.7.1. Enzymes	11
II. Stress oxydant et les antioxydants	14
II.1. Le potentiel antioxydant	14
II.2. Stress oxydatif	14
II.2.1. Historique	14
II.2.2. Définition Stress oxydant	14
II.2.3. Les conséquences du stress oxydant	14
II.2.4. Les maladies liées au stress oxydant	15

II.3. Définition Radicaux libres	15
II.3.1. Nature des radicaux libres	16
a. Espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO)	16
a.1. Ion superoxyde O ⁻² .	16
a.2 Radical libre hydroxyle OH.	16
a.3 Oxygène singulet	16
b. Espèces libres non oxygénées :	16
II.3.2. Origine des radicaux libres	17
a. Origine endogène	17
b. Origine exogène	17
II.3.3. Cibles des radicaux libres	18
a. La membrane	19
b. L'ADN	19
c. Les protéines	19
II.4. L'activité antioxydante	19
II.4.1. Définition d'un antioxydant	19
II.4.2. Mécanismes d'action des antioxydants	20
II.4.3. Les sources d'antioxydants	20
a. Les médicaments	20
b. Les antioxydants naturels	20
b.1.1 La vitamine E	21
b.2 Le β-carotène	21
b.3 La vitamine C	22
b.4 Le sélénium	22
b.5 Le zinc	22
b.6 Les polyphénols	23
c. Les antioxydants de synthèses	23
II.4.4. Les molécules antioxydantes chez les actinobactéries	23

II.5. Utilisation des antioxydants	24
PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE	
I. Matériels et méthodes	25
I.1. Prélèvement des échantillons	25
I.1.2. Traitement des échantillo	25
I.1.3. Préparation des sols pour isolement des actinomycètes	25
I.1.4. Isolement et purification des actinomycètes	26
I.1.5. Purification et conservation des actinomycètes	26
I.2. Screening de l'activité antifongique	27
I.2.1 Choix des souches fongiques	27
I.2.2.Evaluation du pouvoir antifongique des actinomycetes par la méthode des cylindres	27
a. Préparation de la suspension fongique	27
b. Inoculation des boites	27
I.2.3.Identification génétique des souches	28
a.Extraction de l'ADN bactérien	29
a.1 Préparation de la biomasse	29
a.2 Filtration et séparation de l'ADN des autres débris cellulaire	29
a.3 Fixation de l'ADN sur la colonne	29
a.4 Nettoyage de l'ADN des impuretés	29
a.5 Elution de l'ADN de la colonne	30
a. 6 de la présence d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose	32
a.7 Amplification de l'ADN extrait	32
a.8 Purification de l'ADN amplifié	32
a.9 Préparation de l'ADN pour fixation	32
a.10 Fixation de l'ADN	32

a.11 Nettoyage de la membrane	33
a.12 Séchage de la membrane	33
a.13 Elution de l'ADN	33
a.14 Vérification de l'amplification d'ADN par électrophorèse	33
a.15 Le séquençage de l'ADN amplifié	33
I.2.4.Préparation et extraction des métabolites secondaire	33
a. Extraction des métabolites secondaires	33
I.3.Mesure de l'activité antioxydant	36
I.3.1.Mesure de l'activité antioxydant par DPPH	36
I.2.3.Mesure de l'activité antioxydant par ABTS	37
II. Résultats et discussion	39
II.1. Isolement, purification et identification des Actinobactéries	39
II.2. Diversité des souches d'Actinobactéries isolée	40
II.3. L'activité antifongique	41
II.3.1. Résultats de l'activité antifongiques	41
II.4. L'activité antioxydant.	43
II.4.1. Résultats de l'activité antioxydant	43
II.5 Discussion	48
II.5.1. L'activité antifongique	48
II.5 .2. L'activité antioxydant	48
Conclusion et perspectives	50
Références bibliographiques	51
Annexes	

REMERCIEMENTS



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

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

Nos remerciements s'adressent à Krantar Kamel d'avoir accepté de présider le jury et Zerouki Hocine pour avoir acceptée d'examiner notre travail pendant notre soutenance.

Ainsi nous adressons nos sincères remerciements à tous les enseignants du département de biologie de l'Université de Laghouat pour tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce mémoire d'une manière directe ou indirecte. sans oublier Mr Boudjema Bader eddin ,Mme Riche widad pour son aide .

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

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.

Merci 

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



بأنامل تحيط بقلم اعياء السهر والتعب يتكئ على قطرات حبر مملوءة بالحزن والفرح

حزن الفراق بعد اللقاء وفرح بزواج فجر حياتي يوم تخرجني

إلى من سعى وشقي لأنعم بالراحة والعناء الذي لم يبخل بشيء من اجل دفعي في طريق النجاح

إلى اعز وأعلى إنسان على قلبي زوجي العزيز محمد

إلى الشقيتين ابنتاي حفظهما الله لي نور اليقين وصبرين.

❖ يا من أحمل اسمك بكل فخر

يا من أفتقدك ويرتعش قلبي لذكرك

يا من رحلت عني قبل ان تودعني، قبل ان أريك لحظات لطالما حلمت بها

يا من أودعتني لله اهديك هذا العمل

رحمك الله يا أبي

إلى الينبوع الذي لا يمل العطاء

إلى من حاكت سعادتي بخيوط منسوجة من قلبها

إهدائي اليك يا امي التي كنت عوناً ودفء بين أضلعي

شكراً يا احن والدة في الأمة

❖ إلى من حبهم بجري في عروقي ويلهج بذكراهم فؤادي إلى إخوتي مصطفى يوسف

❖ إلى حبيبتي الغالية وزهرتي الصغيرة عيشوش نسبية

إلى سندي في الحياة اختي امينة وزوجها فؤاد ادم المودة والرحمة بينهما.

❖ أبعث أرق تحية وأعذب سمفونية الى من تقاسمت معي عناء التعب الى رفيقة دربي واختي زينب.

❖ إلى الصديقتين نسرين وابتسام

❖ إلى من أعتبره أبي الثاني بعد أبي خالي العزيز حفظه الله.

❖ إلى من مد يد العون لي من بعيد أو من قريب وأخص منهم: ابي علي وأمي مسعودة وفاتي حفظهم الله

❖ إلى الذين كانوا عوناً لنا في عملنا هذا ونورا يضيء الظلمة التي كانت تقف احياناً في طريقنا.

❖ إلى من زرعو التفاهل في دربنا وقدموا لنا المساعدات والتسهيلات، ربما دون ان يشعروا بدورهم بذلك فلهم منا كل الشكر أساتذة البيولوجي.

❖ وكذلك نشكر من ساعد على إتمام هذا العمل وقدم لنا يد العون ومد لنا يد المساعدة وزودنا بالمعلومات اللازمة لإتمام هذا البحث

الدكتور الفاضل قاسم محمد الأمين



BENCHINE Khadidja



Dedicace

Je dédie ce modeste travail à :

Deux personnes les plus chers au monde que Je ne remerciais jamais assez pour leurs aides, encouragements, soutiens, sacrifices et leur patience pendant toute ma vie :

Mes chers parents : Amar et Farida

Mes chers frères : Mohammed Abdeslam et Acheraf.

A mon très cher mari Bouzid, en signe d'amour et de gratitude pour m'avoir supporté, soutenu et surtout compris en permanence, pour ces sacrifices, ces encouragements, sa fidélité et sa gentillesse. Sans lui, je ne saurais pu progresser et en arriver à l'achèvement de ce travail.

A tous les membranes de la famille Benarous et khenine et Djedou.

A ma sœur : Noura Adjallat.

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

Tous mes chers amis qui ont étaient toujours avec moi avec leurs aides et soutiens surtout mes sœurs Nessrin et Ibtissam.

Sans oublier mes braves Amies de la promotion Master II

Microbiologie applique 2017-2018

BENAROUS Zineb Islah



Liste des abréviations.

ADN	: Acide désoxyribonucléique
AGPI	: Auto-oxydation des acides gras poly-insaturés
BHA	: Butylhydroxyanizole.
BHT	: Butylhydroxytoluène
EAO	: Espèces réactives de l'oxygène
ERO	: Espèce réactive d'oxygène
LDL	: Low Density Lipoprotein
SOD	: Superoxyde dismutase
UV	: Ultra-violet
DPPH	:2,2-diphényl- 1 -picrylhydrazyl
ABTS	: sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique).
GYM	: Glucose -Levure –Malt
CSA	: StarchCasein Agar
Milieu PDA	: Milieu Potatoes Dextrose Agar
ARNr.	: Acide ribonucléique ribosomique
RL	: Les radicaux libres
RPM	: Rupture prématurée des membranes
%GC	: coefficient de Chargaff

Liste des figures.

	Page
Figure 01 : Différentes chaînes de spores chez les actinomycètes.	06
Figure 02 : Cycle de développement des actinomycètes sur milieu solide.	07
Figure 03 : Métabolites secondaires bioactifs produits par les actinomycètes.	09
Figure 04 : Secteur angulaire de la répartition de production des antibiotiques entre les microorganismes.	10
Figure 05 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie.	18
Figure 06 : Structure chimique de β -carotène.	22
Figure 07 : Site de prélèvement du sol de la forêt de la ville de Saïda (34.817947, 0.157382).	25
Figure 08 : Isolement et purification des actinomycètes	26
Figure 09 : Screening de l'activité antifongique.	28
Figure 10 : Extraction de l'ADN bactérien.	31
Figure 11 : Extraction des métabolites secondaires	35
Figure 12 : Mesure de l'activité antioxydant par DPPH.	37
Figure 13 : Mesure de l'activité antioxydant par ABTS.	38
Figure 14 : Résultat de l'activité antioxydant des métabolites secondaire obtenus de la souche S1 <i>Streptomyces lasiicapitis</i> .	43
Figure 15 : Résultat de l'activité antioxydant des métabolites secondaire obtenus de la souche S2 <i>Streptomyces spectabilis</i> .	43
Figure 16 : Résultat de l'activité antioxydant des métabolites secondaire obtenus de la souche S4 <i>Streptomyces intermedius</i> .	44
Figure 17: Résultat de l'activité antioxydant des métabolites secondaire obtenus de la souche S5 <i>Streptomyces gougerotii</i> .	44
Figure 18 : Résultat de l'activité antioxydant des métabolites secondaire obtenus de la souche S6 <i>Streptomyces rutgersensis</i> .	45

Figure19: Résultat de l'activité antioxydant des métabolites secondaire obtenus de la souche S7 <i>Streptomyces coelicoflavus</i> .	45
Figure20: Résultat de l'activité antioxydant des métabolites secondaire obtenus de la souche S9 <i>Streptomyces aureoverticillatus</i> .	46
Figure 21: Résultat de l'activité antioxydant des métabolites secondaire obtenus de la souche S11 <i>Streptomyces rubrogriseus</i> .	46
Figure 22: Résultat de l'activité antioxydant des métabolites secondaire obtenus de la souche S12 <i>Streptomyces ambofaciens</i> .	47

Liste des photos.

	Page
Photo 01 : Les souches des Actinomycètes isolé à partir du sol	39
Photo 02 : Aspect des colonies d'Actinobactéries après purification sur milieu GYM	40
Photo 03 : Résultat de l'activité antifongique de la souche S2, S4, S9 contre les souches fongiques sélectionnées.	41

Liste des tableaux

	Page
Tableau 01 : Fréquence des divers genres d'actinomycètes dans le sol.	04
Tableau 02 : Répartition des actinomycètes dans la nature	05
Tableau 03 : Classe d'antibiotiques produits par les actinomycetes	11
Tableau 04 : Principaux antioxydants non enzymatique et sources alimentaires associées	12
Tableau 05 : Principaux antioxydants non enzymatique et sources alimentaires associées	21
Tableau 06 : Quelques exemples de molécules antioxydants produites par différentes souches d'Actinobactéries	24
Tableau 07 : Souches fongiques utilisées pour tester l'activité biologique des extraits	27
Tableau 08 : Nom de souches bactériennes après identification moléculaire.	40
Tableau 09 : Le résultat de l'activité antifongique.	42

Résumé

Contribution à l'étude de l'activité antifongique et l'activité antioxydant des métabolites secondaires produits par quelques bactéries du genre *Streptomyces* isolées des sols de la région d'Oued el Oukrif (Saida).

Ce travail porte sur l'étude de la production, et la mise en évidence de l'activité antifongique et antioxydant de neuf souches d'actinomycètes isolées du sol de la région de Saida. Nous avons isolé 30 souches et nous avons choisis seulement neuf souches qui ont été ensuite identifiées génétiquement par séquençage d'ADNr 16S. Les résultats de l'identification ont montré que les neuf isolats appartiennent au genre *Streptomyces*. Les souches (*Streptomyces spectabilis*, *Streptomyces intermedius* et *Streptomyces aureoverticillatus*) ont enregistré une très bonne activité antifongique contre la totalité des souches fongiques testées (*Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium graminearum*, *Penicillium expansum*) avec des pourcentages d'inhibition de 11.87% pour la souche *Streptomyces spectabilis* avec la souche fongique FG), et de 23.92% pour la souche *Streptomyces intermedius* avec la souche fongique AO et de 14.70% pour la souche *Streptomyces aureoverticillatus* avec la souche fongique AO. Par contre, les autres souches (*S. rutgersensis*, *S. rubrogriseus*, *S. ambofaciens*) ne présentent aucune activité antifongique contre les souches fongiques sélectionnées. Les résultats du test d'activité antioxydant ont indiqués que l'extrait de l'isolat *Streptomyces gougerotii*, est doté d'une bonne activité antioxydante vis-à-vis le DPPH et l'ABTS elle est de 99.50 % et 92.82 % respectivement. On conclue que les actinobactéries précisément les *Streptomyces* possèdent une activité antifongique et antioxydant.

Mots clés : Actinobactéries, Streptomyces, activité antifongique, métabolites secondaires, activité antioxydante.

Abstract

Contribution to the study of the antifungal activity and antioxidant activity of secondary metabolites produced by some bacteria of the genus *Streptomyces* isolated from the soils of Saïda ,Oued el Oukrif region .

This work deals with the study of production and highlighting the antifungal and antioxidant activity of nine strains of actinomycetes isolated from the soil of the Saida region.

We isolated 30 strains and chose only nine strains that were subsequently genetically identified by sequencing of 16S rDNA. The results of the identification showed that the nine isolates belong to the genus *Streptomyces*. The Strains (*Streptomyces spectabilis* ,*Streptomyces intermedius* et *Streptomyces aureovercillatus*) recorded a very good antifungal activity against all the fungal strains tested(*Aspergillus ochraceus*,*Aspergillus parasiticus*,*Fusarium graminearum*,*Penicillium expansum*) with inhibition percentages of 11.87% for the strain *Streptomyces spectabilis* with the fungal strain FG), and 23.92% for the strain *Streptomyces intermedius* with the fungal strain AO and 14.70% for the strain *Streptomyces aureovercillatus* with the fungal strain AO . On the other hand, the other strains (*S. rutgersensis*, *S. rubrogriseus*, *S. ambofaciens*) show no antifungal activity against the selected fungal strains.

The results of the antioxidant activity test indicated that the extract of the isolate *Streptomyces gougerotii* has good antioxidant activity against DPPH and ABTS with inhibition percentage of 99.50 % for ABTS and DPPH the percentage inhibition is 92.82%.

While the other isolates show low activity of DPPH radical scavenging and ABTS.

It is concluded that actinobacteria specifically *Streptomyces* having antifungal activity and antioxidant activity.

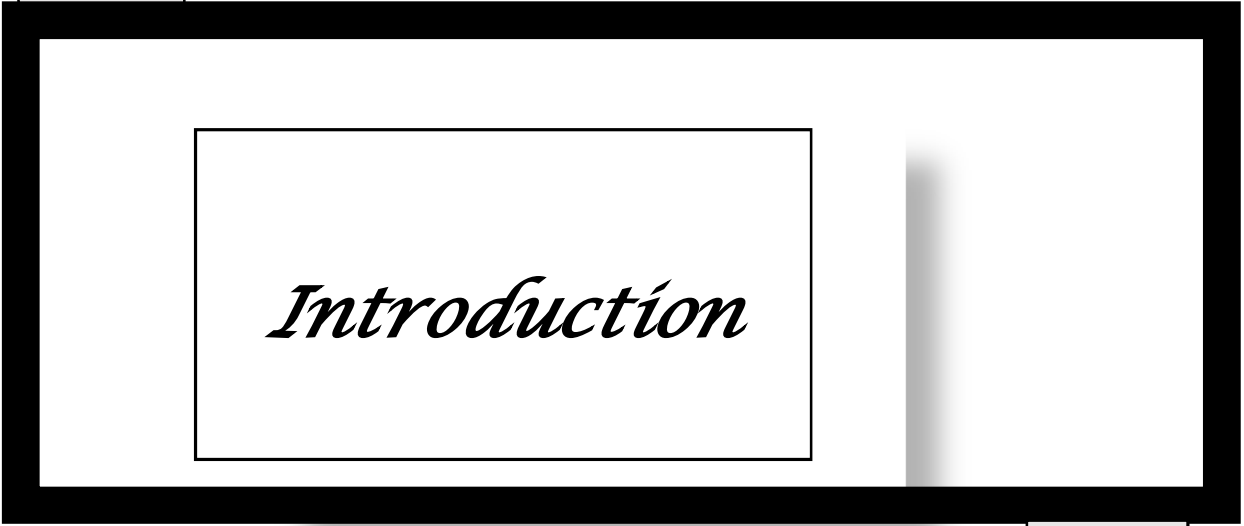
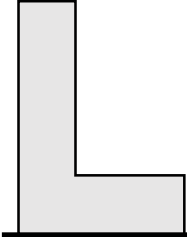
Keywords: Actinobacteria, Streptomyces, antifungal activity, secondary metabolites, antioxidant activity.

المساهمة في دراسة النشاط المضاد للفطريات والمضاد للأكسدة للمستقلبات الثانوية التي تنتجها بعض البكتيريا من جنس (*Streptomyces*) المعزولة من التربة في منطقة واد الكريف ولاية سعيدة.

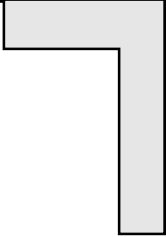
يتناول هذا البحث دراسة الإنتاج ومظاهر النشاط المضاد للأكسدة ومضاد للفطريات لتسع سلالات من الأكتينوبكتيريا المعزولة من تربة منطقة سعيدة. عزلنا 30 سلالة واخترنا تسعة سلالات فقط تم تحديدها عن طريق تحليل الحمض النووي الريبي الريبوزومي S16.

وأظهرت نتائج التحديد أن السلالات التسع تنتمي إلى جنس *Streptomyces*. السلالات (*Streptomyces spectabilis*) (*Streptomyces intermedius et Streptomyces aureoverticillatus*) سجلت نشاطاً مضاداً جيداً جداً ضد جميع السلالات الفطرية المختبرة (*Aspergillus ochraceus, Aspergillus parasiticus, Fusarium*) (*graminearum, Penicillium expansum*) مع حساب معدل التثبيط الذي كانت نتائجه 11.87٪ بالنسبة للسلالة *Streptomyces spectabilis* مع السلالة الفطرية FG و 23.92٪ بالنسبة للسلالة *Streptomyces intermedius* مع السلالة الفطرية AO و 14.70٪ بالنسبة لـ *Streptomyces aureoverticillatus* مع AO. و من ناحية أخرى، لم يلاحظ وجود أي نشاط للسلالات الأخرى كـ (*S. rutgersensis, S. rubrogriseus, S. ambofaciens*). أشارت نتائج اختبار نشاط مضادات الأكسدة إلى أن مستخلص العزلة (*Streptomyces gougerotii*) لديها نشاط مضاد للأكسدة جيد ضد DPPH بنسبة 99.50٪ بالنسبة لـ ABTS و DPPH نسبته المثوية هي 92.82٪.

الكلمات المفتاحية : أكتينوبكتيريا ,النشاط المضاد للأكسدة ,النشاط المضاد للفطريات ,المستقلبات الثانوية ,
Streptomyces.



Introduction



Introduction

Les voies de recherche du futur en matière de chimiothérapie anti-infectieuse sont difficiles à définir. En effet, les problèmes actuels seront-ils ceux de demain ? Il y a quelques décennies, le monde croyait que la science avait triomphé des maladies infectieuses et que tout était sous contrôle. Les vaccins et les antibiotiques ont effectivement permis de vaincre ou contrôler certains fléaux comme la variole ou la tuberculose. On a même cru, un bref instant, que les menaces bactériennes et virales appartenaient au passé. Mais certains événements nous rappellent que nous devrions toujours faire face à de nouveaux défis infectieux : 8400 patients dans plus de 30 pays ont été atteints du syndrome respiratoire aigu (SRAS) en 2003, la grippe aviaire s'est transmise aux humains, le SIDA (grand fléau du siècle passé) continue de faire des victimes, les épidémies de fièvres hémorragiques font des ravages en Afrique et de nombreuses questions restent ouvertes sur la maladie de Creutzfeldt-Jakob.

L'émergence de nouveaux microbes et la transmission de ceux-ci ont été favorisées, entre autres, par la mobilité croissante des gens, l'exportation d'animaux et de nourriture, une population plus âgée avec des co-morbidités plus importantes (HIV, patients transplantés, patients immunodéprimés) ainsi que par des attitudes thérapeutiques parfois plus agressives, en particulier dans le contexte des soins intensifs. L'apparition de nouvelles maladies et la réémergence d'anciennes ne sont finalement que des signes d'une impressionnante adaptabilité des microorganismes à notre environnement changeant et à nos moyens de défense.

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. Ces résistances aux antibiotiques aux doses thérapeutiques apparaissent plus ou moins rapidement selon la complexité chimique des antibiotiques et du patrimoine génétique de la bactérie. Actuellement quel que soit l'antibiotique utilisé, il existe des souches de différentes espèces bactériennes qui leur sont résistantes. Il existe pour l'instant quelques exceptions comme l'absence de souches de *Streptococcus pyogenes* résistante à la pénicilline G. (**Genné et Siegrist, 2003**) Le mécanisme de résistance peut avoir comme support génétique un gène d'origine plasmidique ou chromosomique. La réponse de la bactérie est souvent complexe, il peut s'agir d'empêcher l'antibiotique de pénétrer à l'intérieur de la cellule bactérienne, d'inactiver le xénobiotique par des enzymes ou modifier le site d'action de l'antibiotique, voir de synthétiser des systèmes additionnels qui permettent de contourner l'action de l'antibiotique, voir de le refouler activement à l'extérieur (efflux).

Toutes les espèces ou genres bactériens sont concernés par le phénomène de la résistance aux antibactériens posant parfois de véritables problèmes thérapeutiques. La résistance aux antibactériens est un phénomène universel, qui semble plus aigu dans certains pays en voie de développement du fait de la monotonie des antibiotiques utilisables. Dans les pays industrialisés, le même phénomène peut être décrit du fait de pression sélective dans un hôpital donné, ceci a été bien démontré avec l'usage intensif en monothérapie de la ceftazidime ou l'usage excessif de l'imipénème dans les unités de soins intensifs qui a permis l'émergence de *Stenotrophomonas maltophilia* (Bryskier, 1999).

Devant cette émergence de l'antibiorésistance, la découverte de nouvelles molécules représente donc un besoin qui ne peut être comblé que soit par :

- l'extraction de nouveaux dérivés chez des mutants de souches répertoriés,
- la réalisation de nouvelles molécules semisynthétiques à partir de structures connues ou la synthèse de nouveaux dérivés,
- l'analyse des produits de fermentation de nouvelles espèces bactérienne ou fongiques isolées d'écosystèmes peu ou pas explorés.

C'est cette dernière voie que nous avons adoptée lors de notre étude. De nombreux organismes capables d'élaborer des molécules à activité antimicrobienne peuvent être exploités parmi lesquels nous citerons : les microorganismes, les plantes, les lichens, les insectes et les mollusques (Berdy, 1974).

Dans cette étude, nous évaluons l'activité antifongique et antioxydant des métabolites secondaires produits par quelques souches d'actinobactéries isolées des sols forestiers de la forêt de la ville de Saïda. Pour se faire, une synthèse bibliographique représentant la première partie de notre travail est établie, dans laquelle, nous illustrons les notions de base concernant l'abondance, la diversité, la distribution, et l'importance des actinobactéries. Cette partie est achevée par une vue générale sur le stress oxydatif et leur impact sur l'organisme vivant ainsi que les antioxydants et leur importance.

La partie expérimentale représente la seconde partie de notre travail, elle dévoile la méthodologie et les techniques utilisées pour la réalisation de cette étude. Cette partie est accomplie par les principaux résultats obtenus et leurs discussions. L'étude est achevée par une conclusion générale et des perspectives.



*Première partie :
Étude
bibliographique*





*Généralité sur les
actinobactéries*

I. Généralité sur les Actinobactéries

I.1. Définition et caractéristiques généraux des Actinobactéries

Les actinomycètes appartiennent à la classe des *Actinobacteria*, bactéries à Gram positif de haut coefficient de Chargaff (%GC) : généralement compris entre 60 et 75 %. Le phylum des *Actinobacteria* est grand et complexe (**Riche et Mehenni, 2017**). La famille des Actinobacteries comprend un groupe de microorganismes unicellulaires, leur croissance est lente avec un temps de génération de 2 à 3 heures, ils croissent en l'espace de quelques jours à quelques semaines. Ils sont abondamment distribués dans la nature (tableau 1). Il représente l'une des unités taxonomiques les plus importantes parmi les 18 lignées principales actuellement reconnues dans le domaine des bactéries (**Ventura et al., 2007**). Les actinomycètes ont été considérés comme un groupe intermédiaire entre bactérie et champignons (**Andriambololona, 2010**). Cela explique leurs dénominations en grec « Champignons à rayons » ou « Champignons rayonnants », expression utilisée pour les désigner en Anglais (*Ray fungi*) (**Belaidi et Sahour, 2015**). Il existe des formes de transition, mycéliennes typiques et unicellulaires, présentant une aptitude peu marquée à former un mycélium ramifié. Le diamètre des filaments des formes mycéliennes est toutefois environ deux fois plus faible (0,5 à 1,2 μm) que celui des mycélia de champignons. Maintenant, ils sont reconnus comme des procaryotes (**Souhila, 2012**). Il regroupe 6 ordres, 13 sous-ordres, et plus de 200 genres bactériens. Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses dont la croissance donne lieu à des colonies constituées d'hyphes, qui irradient par croissance centrifuge tout autour du germe qui leur a donné naissance. Sur les milieux solides, ils forment des colonies souvent pigmentées pendant une semaine, ces colonies peuvent être de couleurs (gris, vert, rouge...) provenant de l'accumulation d'hyphes ramifiés à contour lisse ou échancré à aspect compact, poudreux ou en chou-fleur (**Kitouni, 2007**)

Tableau 01 : Fréquence des divers genres d'actinomycètes dans le sol. (Belaidi et Sahour,2015).

Genres	Fréquence (%)
<i>Streptomyces</i>	95,34
<i>Nocardia</i>	1,94
<i>Micromonospora</i>	1,40
<i>Thermomonospor</i>	0,22
<i>Actinoplanes</i>	0.20
<i>Microbispora</i>	0.18
<i>Mycobacterium</i>	0.14
<i>Streptosporangium</i>	0.10
<i>Actinomadura</i>	0.10
<i>Micropolyspora</i>	0.10
<i>Pseudonocardia</i>	0.06

I.2. Ecologie et distribution dans la nature

D'après (Belyagoubi, 2014), les actinomycètes colonisent une large variété d'habitat, comme le démontre le tableau 02, ils sont saprophytes dans le sol, et participent à la dégradation de la matière organique et à la formation de l'humus, tout comme les champignons. Les actinomycètes du sol sont surtout présents en surface, entre 0 et 2 m de profondeur. Ils produisent des substances spécifiques telles que la géosmine et le 2-méthyl isobornéol qui sont responsable de l'odeur caractéristique des sols. Leurs proportions par rapport aux autres microorganismes oscillent entre 10 et 50 %. Le rapport microorganisme totaux/actinomycètes, diminue au fur et à mesure que la profondeur augmente. Selon (Kitouni, 2007), la couche superficielle contient au moins 80% de bactéries actinomycétales par rapport au nombre total des microorganismes, tandis que la couche située à une profondeur de 80 cm n'en contient plus que 16 à 40%. Les actinomycètes sont généralement plus nombreux que les champignons, mais moins abondants que les autres bactéries.

Tableau 02 : Répartition des actinomycètes dans la nature. (Kitouni, 2007).

Genre	Habitat
<i>Actinomadura</i>	Sol
<i>Actinoplanes</i>	Sol, eau, litière
<i>Frankia</i>	Nodule de racine
<i>Microbispora</i>	Sol
<i>Micromonospora</i>	Sol, eau
<i>Nocardia</i>	Sol, eau
<i>Rhodococcus</i>	Sol, eau, fumier, litière
<i>Sacharomonospora</i>	Matière en décomposition
<i>Stéptomyces</i>	Sol, eau, litière
<i>Stréptosporangium</i>	Sol
<i>Thermomonospora</i>	Matière en décomposition et fermentation

I.3. Classification des actinomycètes

Le phylum Actinomycètes tel qu'il figure dans le **Bergey's Manual (2004)** renferme une seule classe : Actinomycètes, cette classe est subdivisée en 5 sous classe, 6 ordres 13 sous ordre (dont 9 appartiennent à l'ordre des Actinomycétales), 41 familles, 193 genres et près de 1711 espèces. Tous les membres de cet ordre sont caractérisés par leur grande teneur en G+C %, et présentent une grande différenciation quant au développement de leur cycle de vie. L'ordre des *Actinomycétales* comprend des genres d'une grande variabilité morphologique, allant de la forme cocci (***Micrococcus***) à un cycle bâtonnet-cocci (***Arthrobacter***) en passant par ceux formant des hyphes qui se fragmentent (***Nocardia***, ***Rhodococcus***) et ceux qui possèdent un mycélium persistant et bien différencié. La famille des *Streptomycetaceae* comprend 10 genres : *Streptoverticillium*, *Streptacidiphilus*, *Microellobosporia*, *Kitasatospora*, *Kitasatoa*, *Elytrosporangium*, *Chainia*, *Actinosporangium*, *Actinopycnidium* et *Streptomyces* et plus d'une centaine d'espèces. Les différentes formes de spores qui caractérisent cette classe est illustré dans la figure 01.

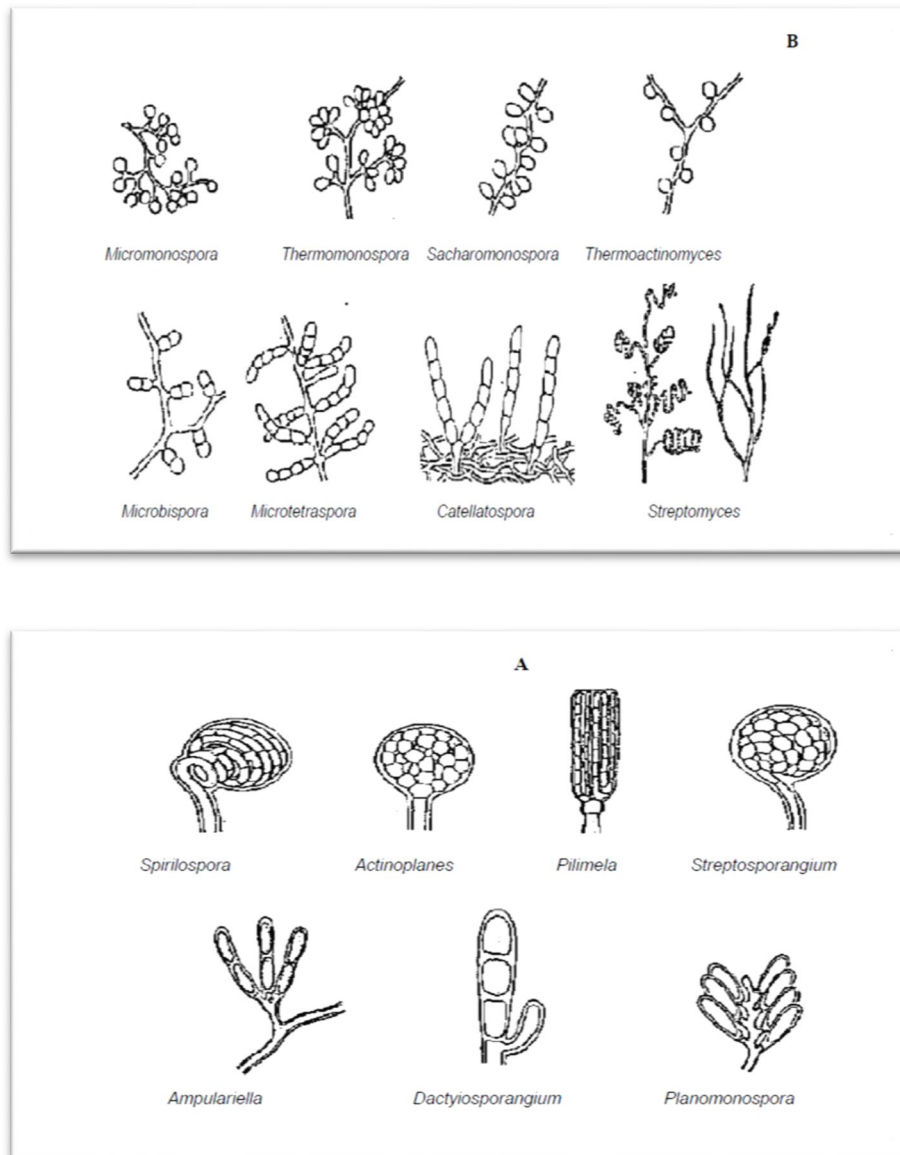


Figure 01. Différentes chaînes de spores chez les actinomycètes. (Saci et Safane,2015).

I.4. Le cycle de vie

Le cycle de vie de nombreux actinomycètes commence par la germination des spores (Figure 2), processus qui nécessite la présence des ions de calcium. Cette germination donne naissance à un mycélium primaire ramifié (O'Gara et al., 2008). Un mycélium aérien vient de se dresser au-dessus du mycélium de substrat. En effet ce dernier s'autolyse et les produits de la lyse sont utilisés par le mycélium aérien, c'est à ce moment-là que les composés médicalement utiles sont synthétisés, et on les appelle métabolites secondaires (Smaoui, 2010).

A l'extrémité du mycélium aérien se forme des spores asexuées à paroi fine appelées conidies ou conidiospores, ces spores naissent par séparation du mycélium primaire habituellement en réponse à un stress d'environnement (manque de nutriment). Si les spores

sont localisées dans des sponges, on les appelle des sporangiospores. Généralement ces spores ne sont pas résistantes à la chaleur, mais résistent bien à la dessiccation et ont de ce fait une importante valeur adaptative, (Prescott *et al.*, 2010).

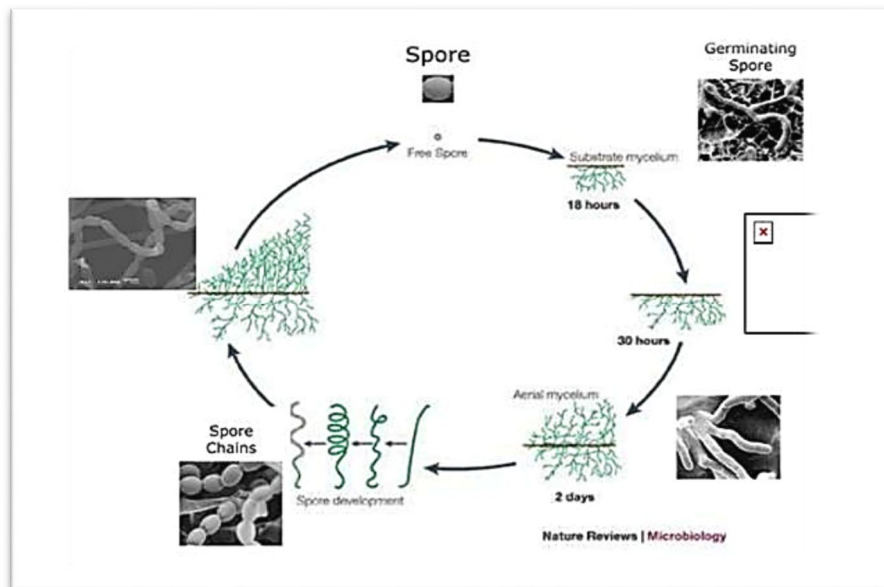


Figure 02 : Cycle de développement des actinomycètes sur milieu solide. (Riche et Mehenni, 2017).

I.5. Rôle des actinomycètes dans le sol

Dans le sol, la densité des actinomycètes, essentiellement représentés par les genres *Nocardia* et *Streptomyces*, est en général 3 à 15 fois plus faible que celle des bactéries et varie entre 10^5 et 10^8 unités/g de sol. Leur densité augmente dans les sols alcalins et décroît dans les sols submergés. Leur rôle dans le sol est important en raison de leur aptitude à dégrader les substances organiques non biodégradables par les champignons et les bactéries, et à produire des substances probiotiques et antibiotiques (Kieser *et al.*, 2000). Les premiers stades de la dégradation de la matière organique sont le fait des bactéries et des champignons, les actinomycètes ne se développent pas durant ces premiers stades en raison de leur inaptitude à la compétition, par contre, ils se développent relativement bien sur une matière organique partiellement dégradée et inapte à porter une microflore fongique et bactérienne (Souhila, 2012).

I.6. Importance environnementale des actinomycètes.

D'après Saci et Safane (2015), les actinomycètes ont un rôle important dans les processus de recyclage et de biodégradation de la matière organique et contribuent ainsi à la fertilisation des sols. Ils ont un grand pouvoir de transformation des substances organiques complexes difficilement ou non dégradables par les autres microorganismes, tels que les

polymères complexes, les polysaccharides, les lignocelluloses, la chitine...etc. Ils sont aussi capables de dégrader certaines toxines produites par des champignons toxinogènes et réduire aussi leur teneur dans les produits finaux en agro-alimentaire. Leur pouvoir antagoniste prononcé leur confère un rôle dans la distribution écologique des microorganismes et dans la lutte biologique contre certains agents phytopathogènes du sol.

I.6.1. Dans les domaines médical, vétérinaire et industriel

D'après **(Belaidi et Sahour, 2015)**, les actinomycètes ont fourni un nombre considérable de composés bioactifs de haute valeur commerciale, et sont recherchés de façon routinière dans le but de découvrir de nouvelles substances bioactives. Les antibiotiques ont aussi trouvé une application dans les élevages industriels d'animaux. Ils sont utilisés non seulement pour combattre les maladies des animaux et des plantes, mais aussi dans l'alimentation pour augmenter les rendements zootechniques.

I.6.2. Dans le domaine agronomique

En plus de la production d'un grand nombre de métabolites d'importance commerciale, les actinomycètes possèdent d'autres potentiels intéressants tels que leur implication dans le processus de recyclage. En effet, ils sont vitaux pour le recyclage des nutriments et comptent parmi un nombre réduit d'organismes utilisés en bio remédiation, capable de dégrader des composés organiques complexes tels que la chitine et grâce à un potentiel enzymatique riche ainsi que des spores résistantes à la dessiccation. Ils ont la possibilité de s'adhérer aux interfaces non miscibles à l'eau en raison de l'hydrophobicité de leur paroi cellulaire. Ils sont aussi capables de dégrader des hydrocarbures chlorés ainsi que des composés organiques complexes. Le genre *Frankia* est également très important pour un bon nombre de plantes, provoquant des nodulations aux racines permettant ainsi la fixation de l'azote par la plante hôte. **(Belaidi et Sahour, 2015)**.

I.7. Métabolites des actinomycètes

D'après **(Benbara et Lalali, 2017)**, les actinomycètes ont des métabolites dits « primaires » qui s'impliquent essentiellement dans la formation de la structure cellulaire et permettent le bon fonctionnement du métabolisme général. Les métabolites secondaires concernent ceux qui ne s'impliquent pas directement dans la vie et la croissance de l'organisme. Les actinomycètes ont prouvé leur capacité à produire divers métabolites secondaires présentant des activités biologiques très variées telle que : antifongiques, antitumorales, antibactériennes, immunosuppressives, insecticides et inhibitrices d'enzymes. La figure 3 résume les différentes classes de molécules bioactives produites par les actinomycètes.

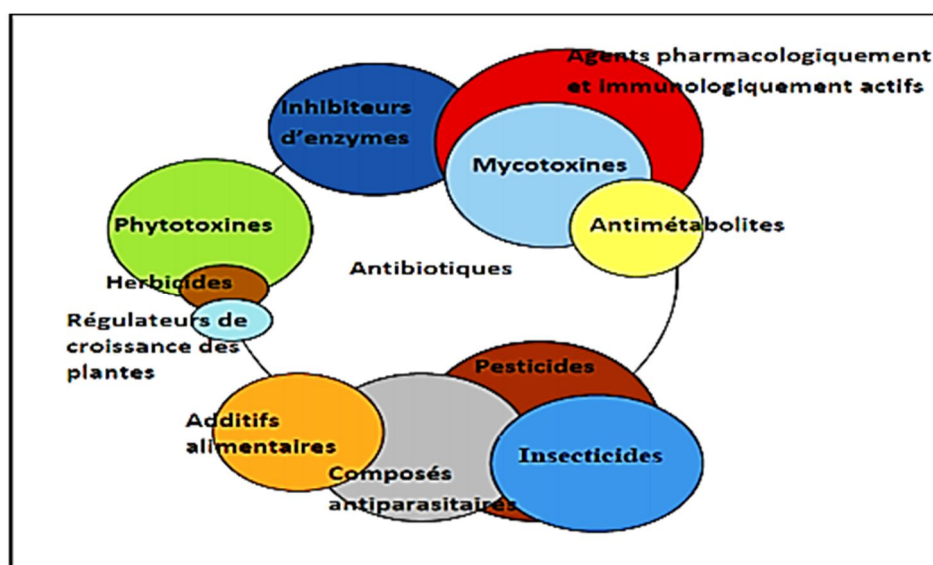


Figure 03 : Métabolites secondaires bioactifs produits par les actinomycètes. (Conn, 2005).

I.7.1. Les antibiotiques

Après la découverte de la Pénicilline par Alexander Fleming en 1928, le début de la production industrielle des premiers médicaments à base de cette molécule a eu lieu pendant la deuxième guerre mondiale. Ces molécules ont été étudiées particulièrement pour leurs valeurs et importances en thérapie humaine et vétérinaire suite à leur effet majeur sur la santé, la nutrition et même l'économie de la société (Coates et Hu, 2007). Les antibiotiques sont des métabolites secondaires dont la synthèse, dans la majorité des cas, débute à la fin de la phase exponentielle de la croissance microbienne (Benbara et Lalali, 2017). Ils sont produits par un large éventail de microorganismes fongiques et bactériens, et inhibent ou tuent à faibles concentrations spécifiquement d'autres microorganismes. Un grand nombre d'antibiotiques a été identifié en milieu naturel, mais moins de 1% sont utiles. Ces molécules peuvent être synthétisées par plusieurs microorganismes tels que les bactéries non mycéliennes qui couvrent près de 12 % puis les champignons avec un pourcentage de 22 % et la grande proportion est prise par les actinomycètes avec un pourcentage de 66% (chez lesquelles le genre *Streptomyces* domine avec 55 %) (Figure 4) (Berdey, 2005). Un microorganisme peut produire plusieurs antibiotiques et divers microorganismes taxonomiquement éloignés peuvent produire le même antibiotique.

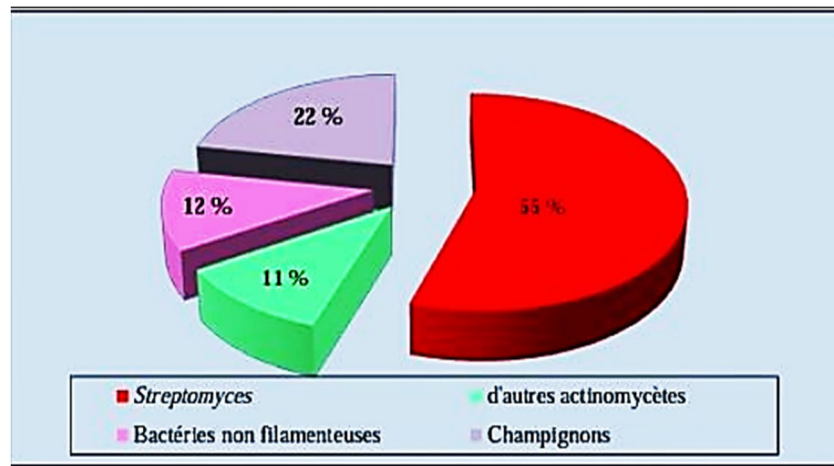


Figure 04 : Secteur angulaire de la répartition de production des antibiotiques entre les microorganismes. (Berdy, 2005).

Les antimicrobiens utilisés à l'heure actuelle peuvent être classés selon divers critères (l'origine, la nature chimique, le mécanisme d'action et le spectre d'action), pour qu'ils soient toxiques pour les bactéries, mais inoffensifs pour l'hôte à qui on administre le traitement. Les antibiotiques utilisés ont pour cibles principales les constituants moléculaires proprement bactériens ou fongiques et actuellement, les molécules disponibles agissent en priorité au niveau de la biosynthèse et le maintien de la paroi cellulaire, des protéines, et l'ADN bactériens (Benbara et Lalali, 2017). Plusieurs d'antibiotiques naturels ont été structuralement modifiés au laboratoire pour augmenter leur efficacité formant la classe des antibiotiques semi-synthétiques (Madigan et Martinko, 2007). Le tableau 3 illustre les différentes classes d'antibiotiques produits par les actinomycètes.

Tableau 03 : Classe d'antibiotiques produits par les actinomycetes (**Berdy, 2005**).

Classe d'antibiotique	Antibiotique
Les aminoglycosides	streptomycine, néomycine, kanamycine, gentamicine
Les macrolides	érythromycine
Les ansamycines	rifamycine
Les bêta-lactames	thiénamycine
Les peptides	viomycine, thiostrepton, actinomycine, pristinamycine
Les tétracyclines	chlortétracycline, oxytétracycline
Les nucléosides	puromycine
Les polyènes	nystatine, candicidine, amphotéricine
Les polyéthers	monensine

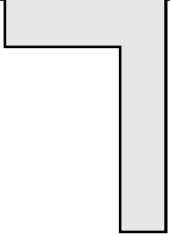
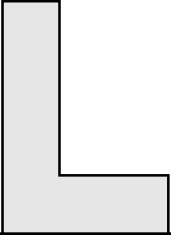
I.7.1. Enzymes

Les Actinobactéries ont une gamme variée d'activités enzymatiques (Tableau 5) et sont Capables de catalyser diverses réactions biochimiques (**Das et al., 2006**).

Tableau 04 : Les principaux enzymes produits par les Actinobactéries

Enzyme	Caractères généraux	Mécanisme	L'utilisation	Les organismes producteurs
Amylases	<p>- Ceci a été suivi de plusieurs rapports d'amylases digestives et d'amylases de malt sous forme de -αet β-amylases.</p> <p>- Les amylases peuvent être divisées en deux catégories endoamylases et exoamylases</p>	<p>Hydrolysent les molécules d'amidon pour donner divers produits, y compris les dextrines et des polymères progressivement plus petits composés d'unités de glucose</p> <p>(Windish et Mhatre, 1965)</p>	<p>Grande importance dans la biotechnologie actuelle avec des applications allant de l'alimentation, de la fermentation,</p> <p>(Pandey et al., 2005)</p>	<p>Le genre <i>Streptomyces</i> est considéré Comme source potentielle d'enzymes amylolytiques</p> <p>(Stamford et al., 2001)</p>
Chitinase	<p>Un polymère linéaire insoluble en B-1,4 de <i>N</i>-acetylglucosamine (GlcNAc) est le second polymère le plus abondant de la nature</p> <p>- Ce polysaccharide se trouve dans les parois cellulaires des champignons et de l'exosquelette des insectes et des coquilles des</p>	<p>Les chitinases hydrolysent les liaisons β-1,4 dans la chitine, ce qui donne principalement la <i>N</i>-<i>N</i>'La-diacetylchitobiose, qui est en outre dégradée par les <i>N</i>-acetylglucosaminidases au monomère GlcNAc</p>	<p>Impliquée dans le processus de production de mono-et d'oligosaccharides à partir de la chitine.</p> <p>-Est un agent antifongique</p> <p>potentiel grâce à son activité de dégradation de la chitine (Kunz Et al. 1992 ; Mathivanan et al.,</p>	<p>Sont produites par de nombreux organismes, tels que des virus, des bactéries, des actinobactéries, des plantes et des animaux plus élevés</p>

	crustacés	(Tsuji et al., 2003)	1998)	
Xylanases	<p>Xylan est un composant dominant dans hémicelluloses, est l'une des substances organiques les plus abondantes sur terre Elle a une excellente application dans l'industrie des pâtes et papiers (Chen et al., 1997)</p>	<p>Le traitement par la xylanase à des températures élevées perturbe la structure de la paroi cellulaire</p>	<p>Facilite l'élimination de la lignine dans les différents stades du blanchiment</p> <p>- Doivent manquer d'activité cellulaire pour éviter l'hydrolyse des fibres de cellulose</p> <p>- Faciliter leur diffusion dans les fibres de la pâte (Niehaus et al., 1999)</p>	<p><i>Streptomyces sp.</i> Ont été signalés pour produire des xylanases (Bode et Huber 2005)</p>



*Stress oxydant et
les antioxydants*

II. Stress oxydant et les antioxydants

II.1. Le potentiel antioxydant

Au milieu des années 1950, Gerschman a démontré que l'oxygène, molécule pourtant indispensable à la vie, présente également une toxicité pour l'organisme (**Messali et Senad, 2017**). En effet elle est susceptible d'entraîner des effets dommageables dans l'organisme via la formation de radicaux libres et d'espèces oxygénées réactives (EOA) (**Haleng et al., 2007**). Ces radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable ; mais la production peut devenir excessive ou résulter de phénomènes toxiques exogènes et l'organisme va devoir se protéger par différents systèmes antioxydants (**Favier, 2003**).

II.2. Stress oxydatif

II.2.1. Historique

Les Radicaux libres, les espèces réactives d'oxygène (ERO), le stress oxydant et antioxydants deviennent des termes de plus en plus familiers pour les professionnels de la santé et même pour le grand public. Ces notions ne sont toutefois pas nouvelles puisqu'il faut rappeler que dans le milieu des années 50, Gerschman puis Hartman évoquaient déjà la toxicité de l'oxygène et la « free radical theory » pour expliquer le processus du vieillissement. En 1969, les Américains McCord et Fridovich isolent à partir de globules rouges humains un système enzymatique antioxydant superoxyde dismutase « SOD », démontrant ainsi pour la première fois que notre organisme produit des espèces réactives d'oxygène « ERO » dont il doit se protéger. Cette découverte sera le point de départ d'une intense recherche scientifique dans le monde entier sur le stress oxydant et les antioxydants (**Favier, 2003**).

II.2.2. Définition Stress oxydant

Le stress oxydant est communément défini comme un déséquilibre entre les systèmes oxydants et les capacités anti-oxydantes d'un organisme, d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire (**Baronki, 2006**). Il semble que l'origine d'un stress oxydant ne soit pas la génération d'ERO elle-même, mais le déséquilibre spatiotemporel entre la production d'ERO et leur élimination (**Morel, 2007**).

II.2.3. Les conséquences du stress oxydant

L'attaque des radicaux libres au sein des doubles liaisons lipidiques membranaires, induit des processus de peroxydations en cascade aboutissant à la désorganisation complète de la

membrane, altérant de ce fait ses fonctions d'échange, de barrière et d'information (**Koechlin-Ramonatxo, 2006**). La toxicité des EOR s'exerce également sur les protéines. Les EOR sont en effet capables de réagir avec différents acides aminés des chaînes de protéines, altérant également leur fonction. Les plus sensibles à leur action sont le tryptophane, la tyrosine, l'histidine, la cystéine et la méthionine. Les EOR sont aussi capables de couper des liaisons peptidiques et de former ainsi des fragments protéiques. L'ADN, qu'il soit nucléaire ou mitochondrial, est également une cible majeure des EOR. Ceux-ci peuvent en effet interagir avec les désoxyriboses de l'ADN, mais aussi avec ses bases puriques et pyrimidiques. Ces altérations structurales lorsqu'elles ne sont « réparées » entraînent à long terme des altérations géniques (**Koechlin-Ramonatxo, 2006**).

Les conséquences biologiques du stress oxydant seront extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire. De légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression de protéines d'adhésion, des stress moyens faciliteront l'apoptose, alors que de forts stress provoqueront une nécrose et des stress violents désorganiseront la membrane cellulaire, entraînant des lyses immédiates. De nombreuses autres anomalies biologiques sont induites par le stress oxydant : Mutation, carcinogenèse, malformation des fœtus, dépôt de protéines anormales, fibrose, formation d'auto-anticorps, dépôt de lipides oxydés, immunosuppressions (**Favier, 2003**).

II.2.4. Les maladies liées au stress oxydant

La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge, car le vieillissement diminue les défenses anti-oxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux. En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en sur-exprimant 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 (**Atti, 2014**).

Le stress oxydant est aussi un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles tel que le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (**Favier, 2003**).

II.3. Définition Radicaux libres

Un radical est une molécule ou un fragment moléculaire qui contient un électron (ou plus) non apparié. De par sa structure particulière, il a tendance à attirer les électrons d'autres

atomes et molécules pour gagner sa stabilité. Plusieurs éléments peuvent être à l'origine de radicaux libres. Les sources des radicaux libres sont nombreuses (**Bouhadjra, 2011**).

II.3.1. Nature des radicaux libres

a. Espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO)

L'oxygène doit sa grande réactivité à sa structure particulière. En effet, il possède deux électrons célibataires non appariés sur sa couche orbitale externe. Cette molécule est essentielle au bon fonctionnement de l'organisme (**Mohammedi, 2005**).

a.1 Ion superoxyde $O_2^{\cdot-}$

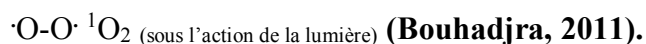
L'ion super oxyde $O_2^{\cdot-}$ est un dérivé très réactif de l'oxygène, relativement stable, il n'est pas très toxique pour l'organisme, mais il est à l'origine de cascades de réactions conduisant à la production de molécules très nocives. (**Bouhadjra, 2011**).

a.2 Radical libre hydroxyle OH.

Le radical libre hydroxyle (OH.) est très réactif. Il peut réagir avec de nombreuses molécules comme l'ADN, les glucides, les nucléotides, les protéines et être à l'origine de lésions de nécrose. C'est un dérivé de l'ion super oxyde (**Bouhadjra, 2011**).

a.3 Oxygène singulet

Lorsque de l'énergie est apportée à l'oxygène, celui-ci passe à l'état singulet qui représente la forme activée. C'est une forme très énergétique de grande réactivité qui peut oxyder de nombreuses molécules. Il est formé à partir de l'ion superoxyde selon la réaction suivante :



b. Espèces libres non oxygénées :

Les espèces libres non oxygénées sont les produits des réactions de certaines molécules avec les espèces réactives dérivées de l'oxygène. Ils peuvent à leur tour réagir avec d'autres molécules et être à l'origine de la multiplication des réactions d'oxydation et de la propagation de dommages oxydatifs. Nous citerons, par Exemple :

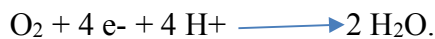
- Les acides gras peroxydés, résultats de l'action des espèces oxygénées sur les membranes biologiques.
- Les fractions protéiques.

- Les acides aminés et les acides nucléiques peuvent aussi réagir avec les ERO générant des molécules réactives et nocives (**Bouhadjra, 2011**).

II.3.2. Origine des radicaux libres

a. Origine endogène

Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques, la plupart des radicaux libres se forment au cours du métabolisme de l'oxygène (réduction de l'oxygène moléculaire en eau) dans les mitochondries. Le passage d'une molécule d'oxygène à deux molécules d'eau nécessite l'action de quatre électrons selon l'équation :



Cependant, et jusqu'à 5 % des cas, on peut assister à une réduction incomplète de l'oxygène en eau. Cette réduction incomplète aboutit à la production de l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) mais surtout de l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$). La dismutation de $\text{O}_2^{\bullet-}$ va donner naissance au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) puis indirectement au radical hydroxyl ($\bullet\text{OH}$) (**Pincemail et al, 2002 ; Valko et al. 2006**).

Les radicaux libres peuvent également être produits lors de la défense antibactérienne. Les cellules phagocytaires (macrophages, neutrophiles...) activées pendant la réaction inflammatoire, vont libérer un anion superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$. Ce phénomène est appelé la flambée respiratoire. Les radicaux superoxydes formés peuvent alors subir eux aussi des transformations donnant naissance aux dérivés oxygénés toxiques.

La régulation des fonctions cellulaires létales telle la mort cellulaire programmée (apoptose) fait appelle aussi à la production endogène des radicaux libre (**Pincemail et al, 2002 ; Valko et al. 2006**).

b. Origine exogène

L'organisme humain est soumis à l'agression de différents agents extérieurs capables de donner naissance à des espèces oxygénées réactives (**Favier, 2003**) :

- Les rayonnements UV (par l'intermédiaire d'agents photo sensibilisants) et les radiations ionisantes induisent la synthèse de radicaux libres dérivés de l'oxygène tels que $\text{O}_2^{\bullet-}$, $\text{OH}\bullet$, $^1\text{O}_2$ et de molécules génératrices de radicaux libres.
- L'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO_2), des toxiques présents dans notre environnement (suie, goudron, tabac, polluants industriels) sont également responsables

de la synthèse de radicaux libres. Ils sont à l'origine d'une auto-oxydation des acides gras poly insaturés (AGPI) des alvéoles pulmonaires (Favier, 2003).

Il a aussi été montré que l'ingestion d'alcool pouvait être à l'origine de la production de radicaux libres. Mais aussi certains médicaments (Favier, 2003 ; Mohammadi, 2005). L'infection au VIH a pour effet d'accroître la production de radicaux libres.

D'autres facteurs sont également capables de générer des radicaux libres dans l'organisme, en citant, les rayonnements UV, les particules inhalées (amiante, silice) l'ingestion d'alcool, des anticancéreux (Favier, 2003). La figure 4 démontre l'origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie.

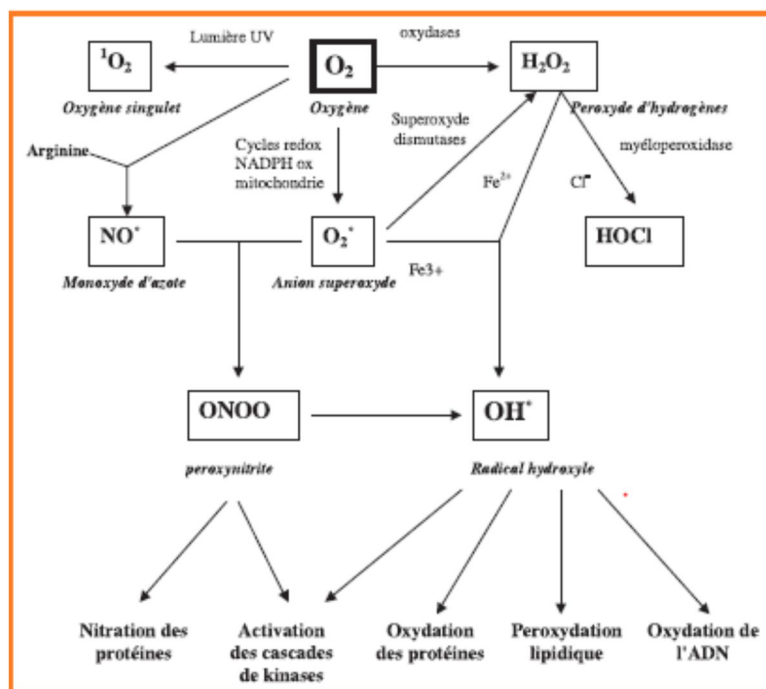


Figure 05. Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie. (Favier, 2003).

II.3.3. Cibles des radicaux libres

D'après (Messali et Senad, 2017), Lors d'un stress oxydant, les espèces oxygénées réactives (EOR) non « détoxiquées » par le système antioxydant attaquent et endommagent par oxydation les macromolécules contenues dans les cellules, directement à leur contact, notamment les lipides, les protéines et l'ADN.

a. La membrane

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

b. L'ADN

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

c. Les protéines

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

II.4. L'activité antioxydante

Pour échapper aux conséquences du stress oxydant, il est nécessaire de rétablir l'équilibre oxydant /antioxydant afin de préserver les performances physiologique de l'organisme. Les antioxydants font actuellement l'objet de nombreuses études car, en plus d'un intérêt certain dans la conservation des denrées comestibles, ils pourraient s'avérer utiles dans la prophylaxie et le traitement des maladies dans lesquels le stress oxydant est incriminé (**servais, 2004**).

II.4.1. Définition d'un antioxydant

Les antioxydants sont des composés chimiques capables de minimiser efficacement les rancissements, retarder la peroxydation lipidique, sans effet sur les propriétés sensorielle et

nutritionnelle du produit alimentaire. Ils permettent le maintien de la qualité et d'augmenter la durée de conservation du produit (**Hellal, 2011**). En outre, l'antioxydant alimentaire idéal, doit être soluble dans les graisses, efficace à faible dose, et non toxique, n'entraîne ni coloration, ni d'odeur, ni saveur indésirable, résistant aux processus technologiques, il est stable dans le produit fini (**Hellal, 2011**).

II.4.2. Mécanismes d'action des antioxydants

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition (**Favier, 2006**). D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci. Un tel effet résulte d'une structure de donneurs d'atome d'hydrogène ou d'électrons souvent aromatiques cas de dérivés du phénol (**Favier, 2006**).

Les antioxydants sont en fait des agents de prévention, ils bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène, ou des agents de terminaison capables de dévier ou de piéger les radicaux libres, ils agissent en formant des produits finis non radicalaires. D'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puissent réagir avec un nouvel acide gras. Tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singulet pour la transformer en chaleur (**Hellal, 2011**).

II.4.3. Les sources d'antioxydants

a. Les médicaments

Actuellement, plusieurs agents thérapeutiques notamment les antihypertensifs, les bêta bloquants, les anti-inflammatoires non stéroïdiens, ont été évalués pour leurs propriétés antioxydantes. On cite les exemples : Le Probucol agit comme un antioxydant en supprimant l'oxydation des lipoprotéines de basse densité, la N-acétylcystéine agirait de manière significative dans la régénération d'un antioxydant connu : le glutathion (**Calvin, 2001**).

b. Les antioxydants naturels

Ces dernières années, l'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques a augmenté considérablement. Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles à savoir, les plantes médicinales et les produits agroalimentaires. Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine

A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques.

Les antioxydants d'origine naturelle sont présents dans toutes les parties des plantes supérieures et sont en générales des composés phénoliques. Ils agissent par la désactivation des radicaux par création d'addition covalente, la réduction des métaux ou de peroxydes, la complexation d'ions et de métaux de transition et le captage de l'oxygène singulet. Le (Tableau 4) énumère les principaux antioxydants (**Mohammedi, 2006**).

Tableau 05. Principaux antioxydants non enzymatique et sources alimentaires associées (**Mohammedi, 2006**).

Principaux nutriments antioxydants	Sources alimentaires
Vitamine C	Agrume, melon, brocoli, fraise, kiwi, chou, poivron
Vitamine E	Huile de tournesol, de soja, de maïs, beurre, œuf, noix
β -carotène	Légumes et fruits
Sélénium	Poisson, œuf, viandes, céréales, volaille
Zinc	Viande, pain complet, légumes verts, huitres, produit laitiers
Flavonoïdes	Fruits, légumes, thé vert
Acides phénoliques	Céréales complètes, baies, cerises
Tannins	Lentilles, thé, raisins

b.1. La vitamine E

La vitamine E prévient la peroxydation des lipides membranaires *in vivo* en capturant les radicaux peroxydes. Elle est retrouvée dans les huiles végétales, dans les noix, les amandes, les graines, le lait, les œufs et les légumes à feuilles vertes (**Aouissa, 2002**).

b.2. Le β -carotène

Le β -carotène possède, outre l'activité provitaminique A, la capacité de capter l'oxygène singulet. Il est présent dans les légumes verts, les épinards, les carottes, la papaye et d'autres fruits jaunes. Sa constitution polyénique (Figure 6) lui confère une capacité de piégeage de l'oxygène par formation d'un dioxétane (addition d'une oléfine et d'une molécule d'oxygène) ou par production d'hydroperoxydes (insertion d'oxygène dans toutes liaisons C-H conjuguées d'une double liaison) susceptibles d'être réduits à leur tour.

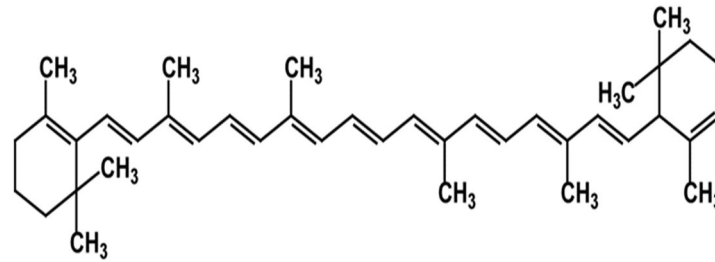


Figure 06. Structure chimique de β-carotène.(Mohammedi, 2006).

b.3. La vitamine C

La vitamine C empêche l'oxydation des LDL produites par divers systèmes générateurs d'espèces réactives de l'oxygène (neutrophiles activés, cellules endothéliales activées, myéloperoxydase). Lors de son oxydation en acide déhydroascorbique, elle passe par une forme radicalaire intermédiaire qui joue un rôle essentiel dans la régénération de la vitamine E oxydée. Elle est présente dans les légumes, le chou, le persil, les agrumes, le kiwi.

b.4. Le sélénium

Le sélénium est un antioxydant essentiel. Il agirait comme une coenzyme pour la glutathion peroxydase, enzyme antioxydant capable de réduire les lipides oxydés des membranes cellulaires (Daas, 2009). Le sélénium est capable d'interagir dans l'organisme avec de nombreux métaux (As, Cd, Pb, Hg) et est de ce fait susceptible de moduler leur toxicité. Le sélénium agit à plusieurs niveaux dans le métabolisme de l'acide arachidonique notamment en contrôlant la concentration intracellulaire des hydroperoxydes, ce qui explique son action anti-aggrégante. Un rôle bénéfique du sélénium est décrit en dermatologie et dans la prévention de maladies rhumatologiques. Le sélénium pourrait également diminuer de façon très significative l'incidence générale des cancers et serait responsable des effets anti-cancéreux et anti-âge. Il est efficace dans le traitement de l'arthrose. On le retrouve dans la viande, le poisson, et les céréales. Il a été montré qu'un apport quotidien en sélénium de 200 microgrammes faisait baisser de moitié le risque du cancer de la prostate (Mohammedi, 2006).

b.5. Le zinc

Son importance dans la prévention des effets toxiques dus aux radicaux libres est primordiale. Le zinc joue un rôle dans l'activité et le maintien de la SOD qui est un piègeur capital des ions superoxydes. Il protège également les groupements thiols des protéines et peut inhiber partiellement les réactions de formation des espèces oxygénées induites par le fer ou le cuivre (Mohammedi, 2006).

b.6. Les polyphénols

Les polyphénols naturels vont de molécules simples, comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés comme les tanins. Les polyphénols végétaux ont d'abord été étudiés pour leurs effets protecteurs contre les pathogènes ou le rayonnement UV. Ils ont été pendant longtemps considérés comme des facteurs antinutritionnels. C'est un regard tout à fait différent qu'on leur porte aujourd'hui, après la reconnaissance de leurs propriétés antioxydants. Leur nature chimique fait de ces composés des agents réducteurs et ce sont, par ailleurs, les antioxydants les plus abondants dans notre alimentation. On en consomme en moyenne 1g par jour. Les bienfaits des polyphénols alimentaires suggèrent un rôle protecteur à l'encontre des cancers et des maladies chronique.

c. Les antioxydants de synthèses

Les butylhydroxyanisole (BHA) (E320) et le butylhydroxytoluène (BHT) (E321) sont les antioxydants synthétiques les plus utilisés dans l'industrie agroalimentaire. Ils sont stables dans les conditions opératoires de plupart des procédés industriels (**Chelghoum, 2017**).

Beaucoup d'études ont montré que le BHT et le BHA sont toxique et/ou cancérigènes à haute dose. Leur utilisation est donc en baisse (**Gordon, 1990**). Ces composés sont utilisés comme additifs pour combattre la détérioration alimentaire, mais il faut les utiliser avec prudence vu leurs risque sur la santé et leur toxicité pour l'organisme (**Moure et al., 2001**). Et par conséquent, certaines restrictions sont placées sur leurs applications et il y'a une tendance à les remplacer par les antioxydants naturels. Ces dernières années, la recherche d'antioxydants naturels en particulier à partir des plantes a augmenté et certaines plantes médicinales ont été largement étudiées pour des activités anti-oxydantes (**Chelghoum, 2017**).

II.4.4. Les molécules antioxydantes chez les actinobactéries

Les Actinobactéries sont des producteurs prolifiques de divers composés y compris des molécules dotés d'une propriété antioxydant. Le tableau 6 présente quelques molécules à activité antioxydant isolées à partir de souche d'Actinobactéries.

Tableau 06 : Quelques exemples de molécules antioxydants produites par différentes souches d'Actinobactéries (Messali et Senad, 2017).

Molécules	Source
La mélanine	<i>Streptomyces sp</i>
L'undécylprodigiosin	<i>Streptomyces sp</i>
Diazepinomidine	<i>Micromonospora sp</i>
Dermacozines A-G	<i>Dermacoccus abyssi sp</i>
PC 766 B	<i>Nocardia brasiliensis</i>
Dihydroherbimycin	<i>Streptomyces sp</i>

II.5. Utilisation des antioxydants

Les antioxydants sont utilisés dans :

- L'industrie chimique : pour éviter le durcissement du caoutchouc ou en métallurgie pour protéger les métaux de l'oxydation. (Bouhadjar, 2011).
- L'industrie agro-alimentaire : pour éviter le rancissement des corps gras. (Bouhadjar, 2011).
- Dans l'industrie teinturerie : pour éviter l'oxydation des colorants au soufre ou des colorants de cuve lors de la teinture (Bouhadjar, 2011).
- Les antioxydants protègent contre des dommages de stress oxydative, qui résulte d'un déséquilibre entre la formation de ROS et les antioxydants de corps (kratchanova *et al.* 2010).



*Deuxième Partie :
Étude
expérimentale*



*Matériel et
méthodes*

I. Matériels et méthodes

I.1. Prélèvement des échantillons

Les échantillons de sol ont été prélevés selon la technique de **Pochon et Tardieux (1962)** à partir du sol de la forêt de Saïda (Forêt de Oued el Oukrif), l'aide d'une grande spatule stérile, les cinq premiers centimètres de la couche superficielle du sol sont écartés, on prélève alors avec une petite spatule stérile dans la couche sous-jacente (entre 5 et 15 centimètres de profondeur) 100 à 150 grammes de terre qui sont déposés sur une feuille d'aluminium stérile. Les gros débris sont écartés (pierres, racines, etc.) et environ 50 grammes sont placés dans un flacon stérile et transportés le plus rapidement possible au laboratoire. Le site de prélèvement est illustré dans la figure suivante.

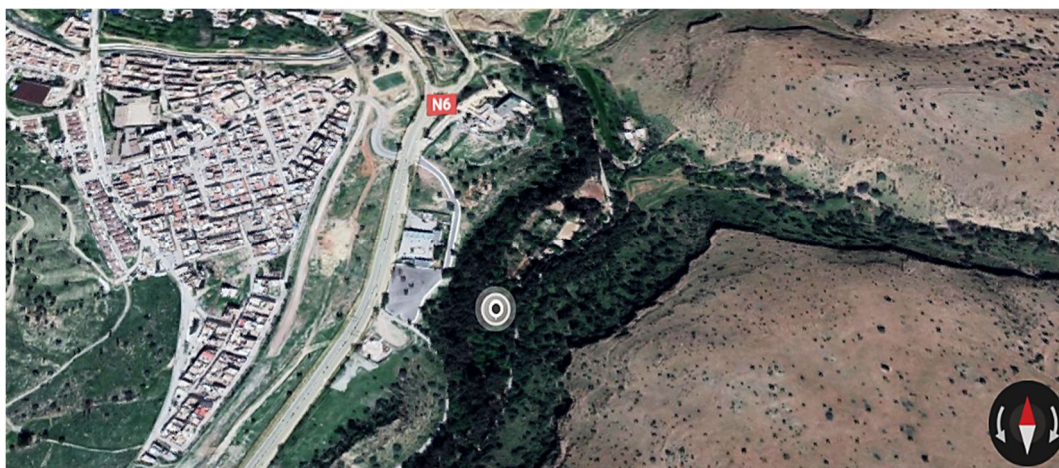


Figure 07. Site de prélèvement du sol de la forêt de la ville de Saïda (34.817947, 0.157382).

I.1.2. Traitement des échantillons

Les échantillons du sol prélevés ont été séchés à l'air libre dans une chambre d'incubation afin de limiter la contamination par les moisissures durant les manipulations. Un gramme de chaque sol séché à l'air est mélangé avec 0,1 gramme de CaCO_3 puis incubé à 28°C pendant 7 jours dans une atmosphère saturée d'humidité (**Cavalla et Eberlin, 1994**).

I.1.3. Préparation des sols pour isolement des actinomycètes

Une fois le sol est prêt, la dilution mère est préparée dans un tube à essai à partir d'un gramme de sols pour chaque échantillon dans 9 ml d'eau physiologique, le mélange doit être homogénéisé à l'aide du vortex pendant 10 minutes. Des dilutions décimales sont ensuite réalisées (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}).

I.1.4. Isolement et purification des actinomycètes

A partir de chaque dilution préparée précédemment, 100 μ l de suspension est inoculé par inondation sur la surface du milieu CSA et Bennett. Les boîtes de pétries sont ensuite incubées à 30°C pendant trois à sept jours (Figure 08).

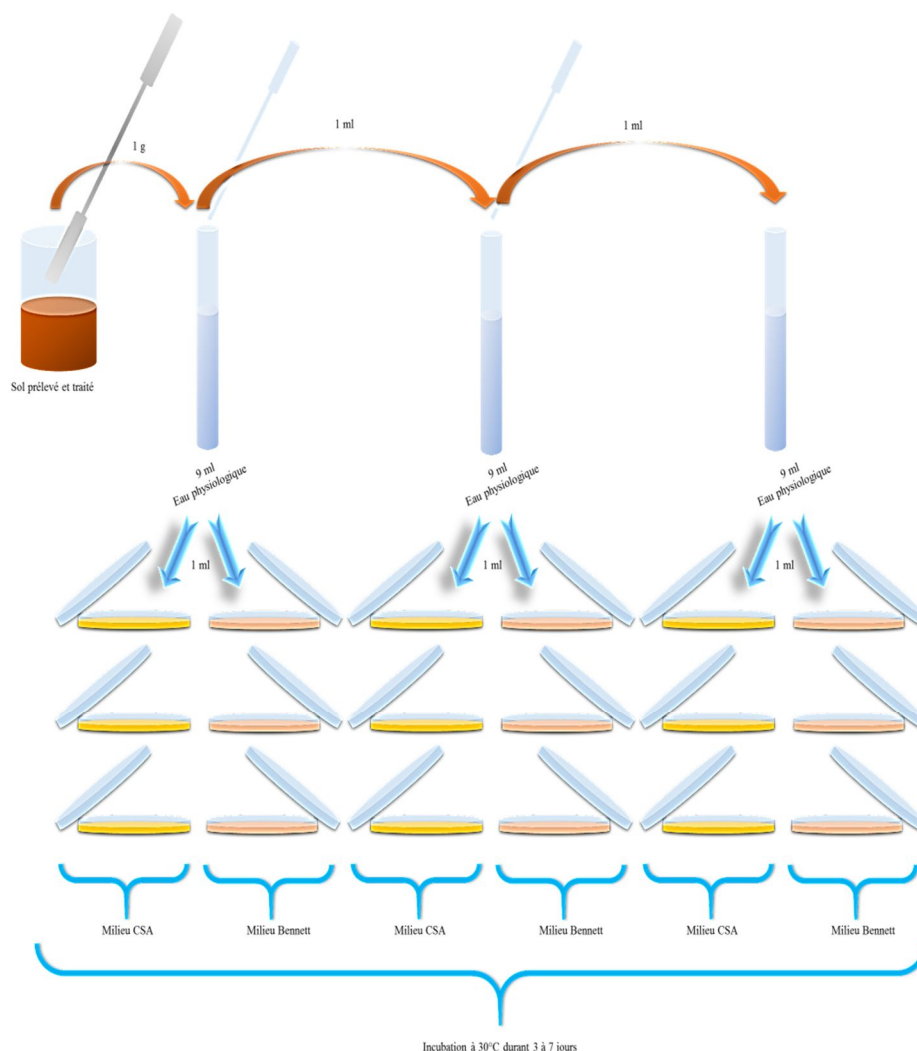


Figure 08. Isolement et purification des actinomycètes

I.1.5. Purification et conservation des actinomycètes

Après examinaisons des colonies à l'aide d'un microscope photonique, les colonies typique d'Actinobactéries sont purifiées sur la surface du milieu CSA puis incubées à 30°C pendant trois à sept jours. Une fois la culture pure, les colonies sont transférées dans 100 ml de milieu Gym liquide. L'incubation se fait à 30°C pendant sept jours. Les colonies actinomycétales pures sont encore, conservées d'une part à -4°C en gélose CSA inclinée, et d'autre part à -20°C en suspension en présence de glycérol à 50 %.

I.2. Screening de l'activité antifongique

I.2.1 Choix des souches fongiques

Les souches fongiques utilisées pour tester l'activité antifongique des actinomycètes sont des champignons microscopiques réputés toxigènes. Elles sont à l'origine d'importantes maladies. Ces souches sont regroupées dans le tableau 06.

Tableau 07 : Souches fongiques utilisées pour tester l'activité biologique des extraits

Souches fongiques	Origine
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Laboratoire de Microbiologie. Département
<i>Aspergillus parasiticus</i>	De biologie. Faculté des sciences –
<i>Fusarium graminearum</i>	Université de Laghouat
<i>Penicillium expansum</i>	

Les quatre souches fongiques ont été choisies soigneusement pour :

- Les différentes altérations alimentaires provoquées.
- Les problèmes potentiels qu'ils posent en clinique.

I.2.2. Evaluation du pouvoir antifongique des actinomycètes par la méthode des cylindres

a. Préparation de la suspension fongique

Pour chaque moisissure, l'inoculum doit être préparé à partir d'une culture de 7 jours sur milieu PDA à 25°C. Récupérer les spores en imbibant un écouvillon stérile avec du Tween 80 et de le transférer dans 3 ml de solution saline stérile 9%. Pour empêcher l'agglutination des spores, mélanger vigoureusement à l'aide d'un vortex la suspension de spores pendant 15-20 secondes, puis transférer le surnageant dans un tube stérile et ajuster la densité optique (DO) à l'aide d'un spectrophotomètre à 530 nm pour obtenir une suspension de stock de 10⁶ spores/ml. Les suspensions fongiques sont ensuiteensemencées pour chaque souche sur les milieux PDA solidifié sur les boîtes.

b. Inoculation des boîtes

Les boîtes de pétrie préalablement préparées, solidifiées etensemencées par les spores fongiques sont inoculé une autre fois par des cylindre de 6mm de culture jeune d'actinomycètes au centre des boîtes. Ces boîtes sont enfin incubées à 25± 2°C pendant une durée de 5 à 7 jours

(figure 09).

L'activité antifongique est mesuré par le rapport entre la surface de l'inhibition créée par l'extrait et la surface de la boites entière multipliée par 100. Le résultat obtenu est évalué comme suit :

- 0.1-3% : Faible activité antifongique
- 3- 8% : Activité antifongique moyenne
- Supérieur à 8% : Bonne activité antifongique

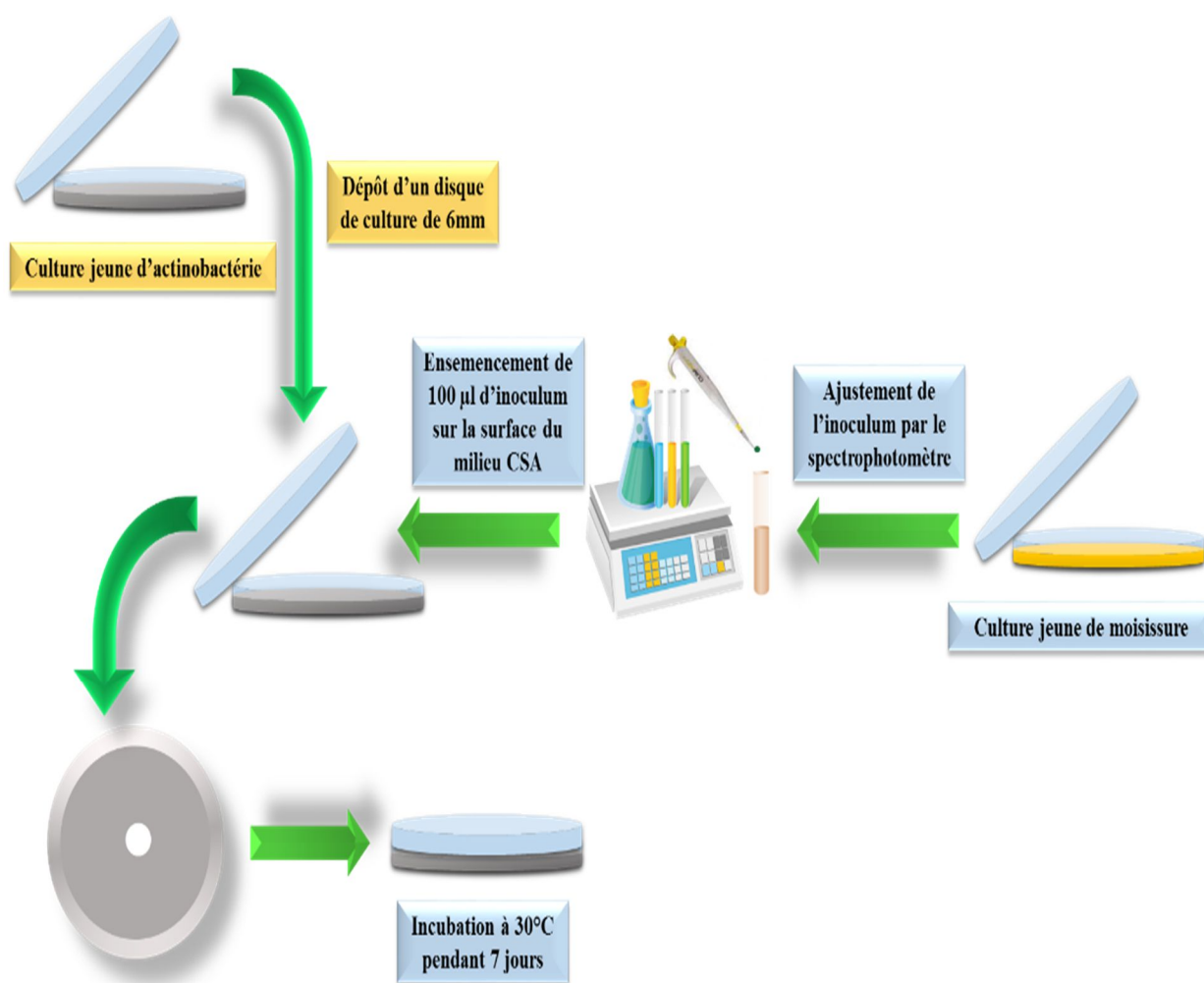


Figure 09. Screening de l'activité antifongique.

I.2.3. Identification génétique des souches

L'identification moléculaire des souches bactériennes actinomycètes est réalisée au niveau de DSMZ, Allemagne suivant le protocole ci-dessous.

a. Extraction de l'ADN bactérien

Cette étape est l'étape cruciale permettant d'avoir un bon résultat pour l'ensemble des étapes qui suivent cette dernière, elle doit se faire dans des conditions bien précises afin d'éviter toute contamination.

a.1 Préparation de la biomasse

Un volume de 0.5ml est prélevé à partir des cultures sur milieu Gym puis porté dans des tubes à eppendorf de 1.5ml suivi d'une centrifugation pendant 2min à 11000rpm afin de séparer les cellules bactériennes du milieu de culture. Le surnageant est ensuite éliminé, un volume de 400 μ l de Lysis Buffer P et 20 μ l de protéinase K sont ajoutés au kilo suivi d'une homogénéisation par le pistil. Les tubes à eppendorf sont enfin mélangés par le vortex et incubés à 65°C sous agitation pendant 30 minutes.

a.2 Filtration et séparation de l'ADN des autres débris cellulaires

Après l'insertion des préfiltres vert dans les tubes jaunes à 1.5ml, la solution de lyse est transférée dans ces préfiltres suivis d'une centrifugation pendant 1 minute à 11000 rpm. Une fois la centrifugation est achevée, les préfiltres sont éliminés.

a.3 Fixation de l'ADN sur la colonne

Afin de fixer l'ADN sur la colonne, un volume de 200 μ l de Binding Buffer A est additionné au volume précédent suivi d'une mixtion avec le vortex, le mélange est incubé pendant une minute après son transfert dans des préfiltres jaunes insérés dans les tubes jaunes à 1.5 ml. Après l'incubation les tubes subissent une centrifugation durant 2 min à 11000 rpm. Les préfiltres sont transférés enfin dans des nouveaux tubes jaunes.

a.4 Nettoyage de l'ADN des impuretés

Un volume de 550 μ l de Wash buffer I est additionné dans le préfiltre jaune suivi d'une centrifugation pendant 1min à 11000rpm, le filtrat obtenu est éliminé, puis un autre volume de 550 μ l de Wash Buffer II est ajouté au préfiltre suivi d'une centrifugation pendant 1min à 11000 rpm. Le filtrat obtenu est encore éliminé et la centrifugation est répétée pendant 4min à 11000 rpm afin de sécher la colonne.

a.5 Elution de l'ADN de la colonne

Les préfiltres jaunes sont placés dans des tubes blancs de 1.5ml, puis un volume de 30 μ l d'Elution Buffer est ajouté. Le tout est incubé pendant 3min à la température ambiante, puis centrifugé durant 1min à 11000rpm. Le préfiltres est éliminé et le tube contenant l'ADN est enfin conservé à 4°C.

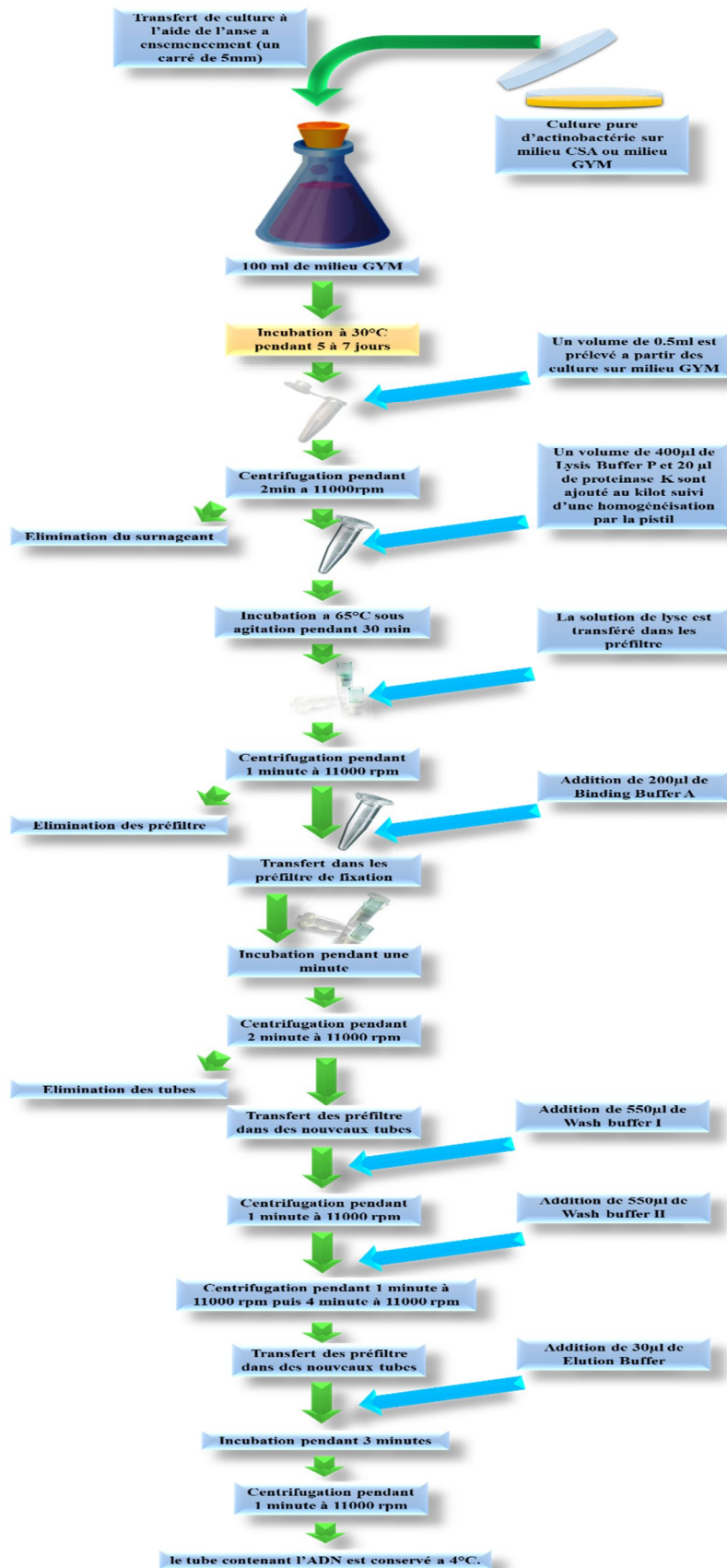


Figure 10. Extraction de l'ADN bactérien.

a. 6 de la présence d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose

Afin de vérifier la pureté d'ADN extrait précédemment, l'électrophorèse est effectuée sur gel d'agarose à 0,8%. La préparation de la plaque nécessite de déposer 30 ml de la solution d'agarose dans le bac à préparation. Une fois gélifié, la plaque est transférée dans le bac d'électrophorèse est imprégné dans la solution tampon. 2 μ l de la solution de révélation marqueur est additionné à 2 μ l de la solution d'ADN marqueur, ce mélange est bien mélangé et est déposé dans le premier puits de la plaque est sert de contrôle.

Pour chaque solution d'ADN préparée précédemment, 2 μ l est prélevé et mélangé avec 2 μ l de la solution du marqueur, ce mélange est transféré dans les puits à l'aide de micropipette. Une fois terminé ; un champ électrique de 70 V est appliqué pendant 45 minutes. La plaque est enfin examinée sous lumière UV.

a.7 Amplification de l'ADN extrait

Après la vérification de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose, la PCR est réalisée sur toutes les ADN des souches présentant des bandes nettes. Un volume de 1 μ l d'ADN précédemment extrait est porté dans des tubes à PCR sur lesquels est ajouté 49 μ l de solution à PCR (25 μ l de JSRM, 2 μ l Forward primer, 2 μ l reverse primer et 20 μ l de PCR Wasser). Les tubes à PCR sont incubés pendant une durée de trois heures dans l'appareil PCR réglé automatiquement (36 cycles). À la fin de l'amplification, les tubes sont incubés à 6°C jusqu'à le lendemain.

a.8 Purification de l'ADN amplifié

La purification nécessite plusieurs étapes afin d'avoir un ADN pur avant le séquençage. Le protocole suivi est celui fourni avec les kits de purification de l'ADN.

a.9 Préparation de l'ADN pour fixation

La préparation de l'ADN est nécessaire afin de le fixer sur la colonne et le débarrasser des impuretés. Un volume d'échantillon est mélangé avec deux volumes de Buffer NTI (50 μ l d'ADN amplifié plus 100 μ l Buffer NTII). La solution est laissée à température ambiante pendant 2min.

a.10 Fixation de l'ADN

La solution est transférée dans des NucleoSpin et PCR Clean-up Column insérée dans un tube à collection de 2ml. Le filtrat est éliminé après centrifugation du support pendant 30s à

11000 rpm et le filtre est placé dans le même tube.

a.11 Nettoyage de la membrane

Un volume de 700µl Buffer NT3 est ajouté au NucleoSpin et PCR Clean-up Column puis le filtrat est éliminé après une centrifugation réalisé durant 30s à 11000rpm. Le NucleoSpin et PCR Clean-up column est encore placé dans le même tube et le lavage doit être répété encore une autre fois avec 700 µl Buffer NT3 achevé par centrifugation.

a.12 Séchage de la membrane

Le support est centrifugé encore une autre fois durant 1min a 11000rpm afin d'éliminer complètement le Buffer NT3, puis incubé a 70°C durant 5min.

a.13 Elution de l'ADN

Les NucleoSpin et PCR Clean-up Column est placé dans un nouveau tube a eppendorf (1.5ml) puis un volume de 30µl de Buffer NE est additionné suivi d'une incubation a la température ambiante pendant 1min. le support est ensuite centrifugé durant une minute à 11000rpm.

a.14 Vérification de l'amplification d'ADN par électrophorèse

Les mêmes étapes de l'électrophorèse effectuées précédemment afin de vérifier les présences de l'ADN après extraction sont suivies pour vérifier l'amplification de l'ADN.

a.15 Le séquençage de l'ADN amplifié

L'ADN amplifié et purifié est envoyé au centre de DSMZ afin de subir le séquençage, les résultats des séquences sont comparés à la banque des données sur le NCBI.

I.2.4.Préparation et extraction des métabolites secondaire

A partir des cultures liquides dans les milieux Gym, 10 ml de chaque culture est transféré à l'aide des pipetes XD dans des flacons contenant 100 ml de milieu 5294. L'incubation se fait à 30°C sous agitation continue (160-180 rpm) durant 5 à 10 jours. La vérification de la pureté des cultures se fait sous le microscope afin d'éviter toute contamination.

a. Extraction des métabolites secondaires

Une fois les cultures sont prêtes, l'extraction des métabolites secondaire est réalisée

suivant le protocole décrit comme suit :

20 ml de chaque culture est porté dans des tube en plastique gradué à l'aide de pipetes XD sur lequel 20 ml d'acétate d'éthyle est ajouté, chaque mélange est bien mixé puis porté dans agitateur a rotation pendant 10 à 12 minutes. Les tubes sont ensuite centrifugés à 9000 rpm pendant 10 minutes. Les surnageant sont enfin récupérés dans des boule en verre puis évaporé à l'aide du rotavapor à 40°C sous 82 mbar et 123 rpm jusqu'à l'évaporation à sec. L'extrait est ensuite récupéré dans des tubes contenant 1ml de méthanol-acétone-acétate d'éthyle est gardé à -20°C jusqu'à leur utilisation.

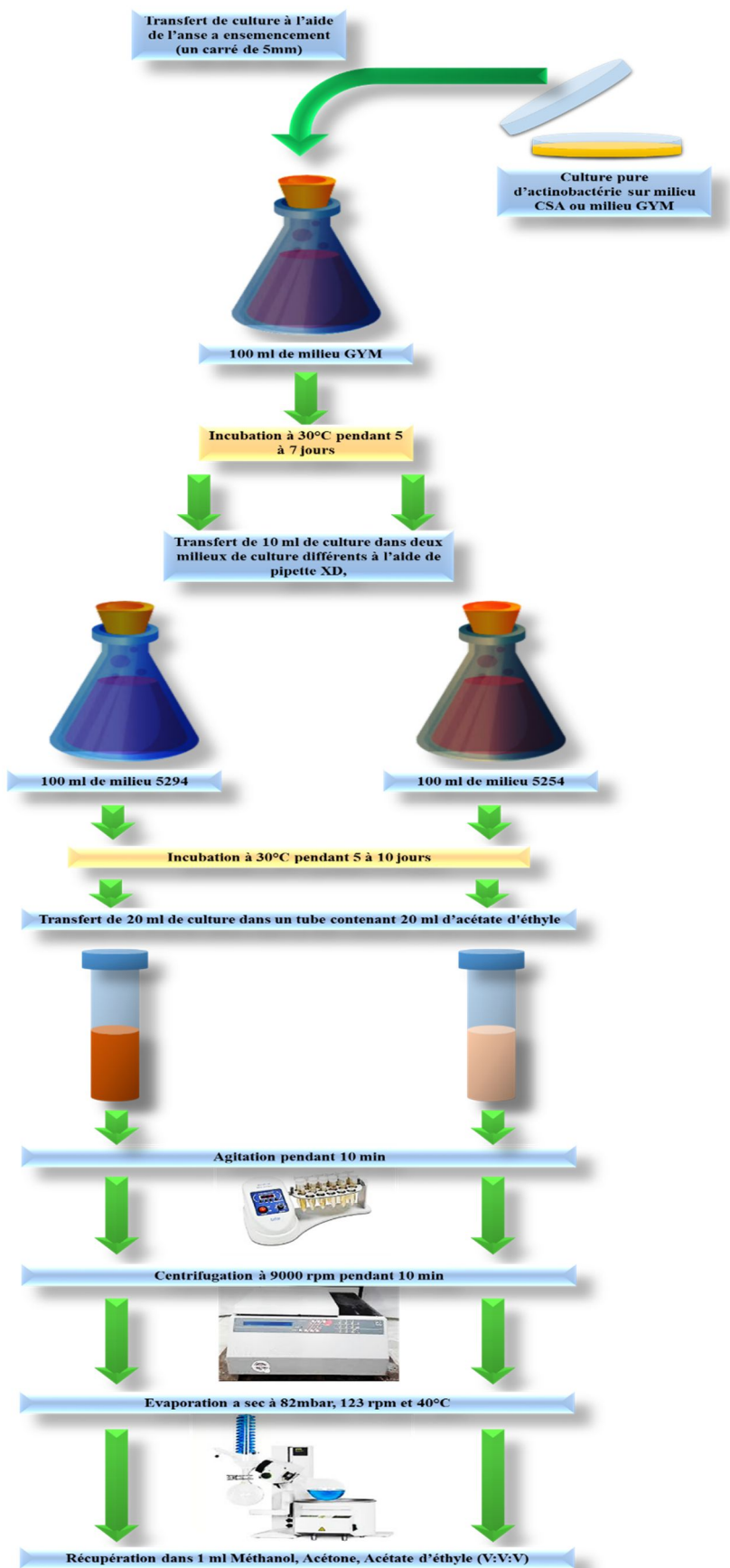


Figure 11. Extraction des métabolites secondaires

I.3.Mesure de l'activité antioxydant

I.3.1.Mesure de l'activité antioxydant par DPPH

L'évaluation de l'activité antioxydant des extraits par DPPH est réalisé suivant le protocole de **Atoui et al en (2005)**

Principe :

C'est une méthode largement utilisée dans l'étude de l'activité antioxydant. Le DPPH (2,2- diphényle-1-picrylhydrazyl) se caractérise par sa capacité à produire des radicaux libres stables. La présence de ces radicaux DPPH donne lieu à une coloration violette foncée de la solution, qui absorbe aux environs de 517 nm. La réduction des radicaux DPPH par un agent antioxydant entraîne une décoloration de la solution.

Mode opératoire

A 3.9 ml de la solution du DPPH ayant une absorbance de 1.1 (0.0025g DPPH dans 100ml méthanol) on ajoute 100, 75, 5, 25µl de chaque extrait, pour le contrôle négatif, on mélangeant 100 µl du méthanol avec 3.9ml de DPPH. Le blanc de l'appareil est le méthanol. L'incubation est durant 30 minutes à température ambiante. La lecture se fait à 517 nm,

Calcul des pourcentages d'inhibition :

Le pourcentage de réduction du DPPH est donné par la formule suivante (**Yen et al, 1994**).

$$\% \text{ PR du DPPH} = \frac{[(\text{DO cont}) - (\text{DO éch})]}{(\text{DO con})} \times 100$$

- % PR du DPPH : pourcentage de réduction ou d'inhibition du DPPH.
- DO cont à t0 : densité optique du DPPH à t0.
- DO cont à t30 : densité optique à 30 min après avoir ajouté l'extrait.

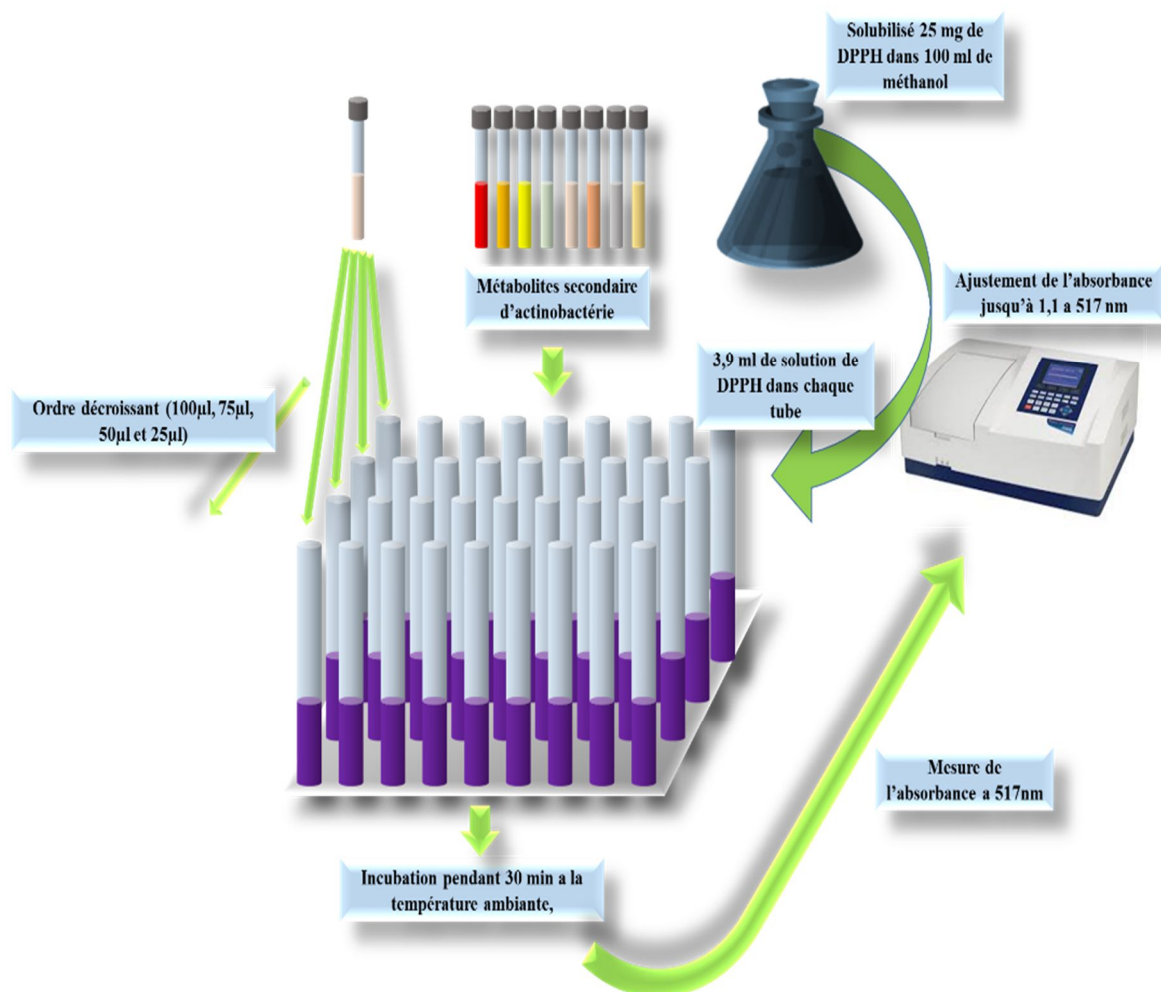


Figure 12. Mesure de l'activité antioxydant par DPPH (Atoui et al.,2005).

I.2.3.Mesure de l'activité antioxydant par ABTS

Principe

L'activité anti radicalaire des extraits est déterminée par une méthode basée sur la réduction du radical ABTS⁺ « 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) » qui est utilisé comme un radical libre pour évaluer l'activité antioxydant des échantillons. Ce radical cationique est facilement formé par oxydation en présence de persulfate de potassium pour donner une solution colorée en vert-bleue (Prouillac, 2006).

L'addition d'un antioxydant à une solution de ce radical cationique entraîne la réduction de ce radical et une diminution de l'absorbance. Cette diminution dépend de l'activité antioxydant des composés testés, du temps et de la concentration (Re et al., 1999).

Mode opératoire

Le pourcentage d'inhibition du radical $ABTS^+$ est évalué par la méthode de **Ramful et al. (2010)**. La solution d' $ABTS^+$ préparé par mélange de 7 mM d'ABTS et de 2,45mM de persulfate de potassium incubé pendant 12-16h à l'abri de la lumière et à température ambiante avant l'utilisation. La solution d'ABTS est diluée avec le méthanol jusqu'à l'obtention d'une absorbance de $0,7(\pm 0,02)$ à 734 nm. 3.9 ml de la solution d'ABTS est additionné à 100, 75, 50 et 25 μ l de l'extrait.

Après l'incubation pendant 7 min à l'obscurité et à température ambiante, On mesure la réaction de réduction de la solution d'ABTS à 734 nm. Le pouvoir anti-radicalaire de l'extrait est exprimé en pourcentage d'inhibition du radical $ABTS^+$:

$$\% \text{ PR du ABTS} = [((DO \text{ cont}) - (DO \text{ éch})) / (DO \text{ cont})] \times 100$$

- % PR du ABTS : pourcentage de réduction ou d'inhibition du ABTS.
- DO cont à t0 : densité optique du ABTS à t0.
- DO cont à t7 : densité optique à 7 min après avoir ajouté l'extrait.

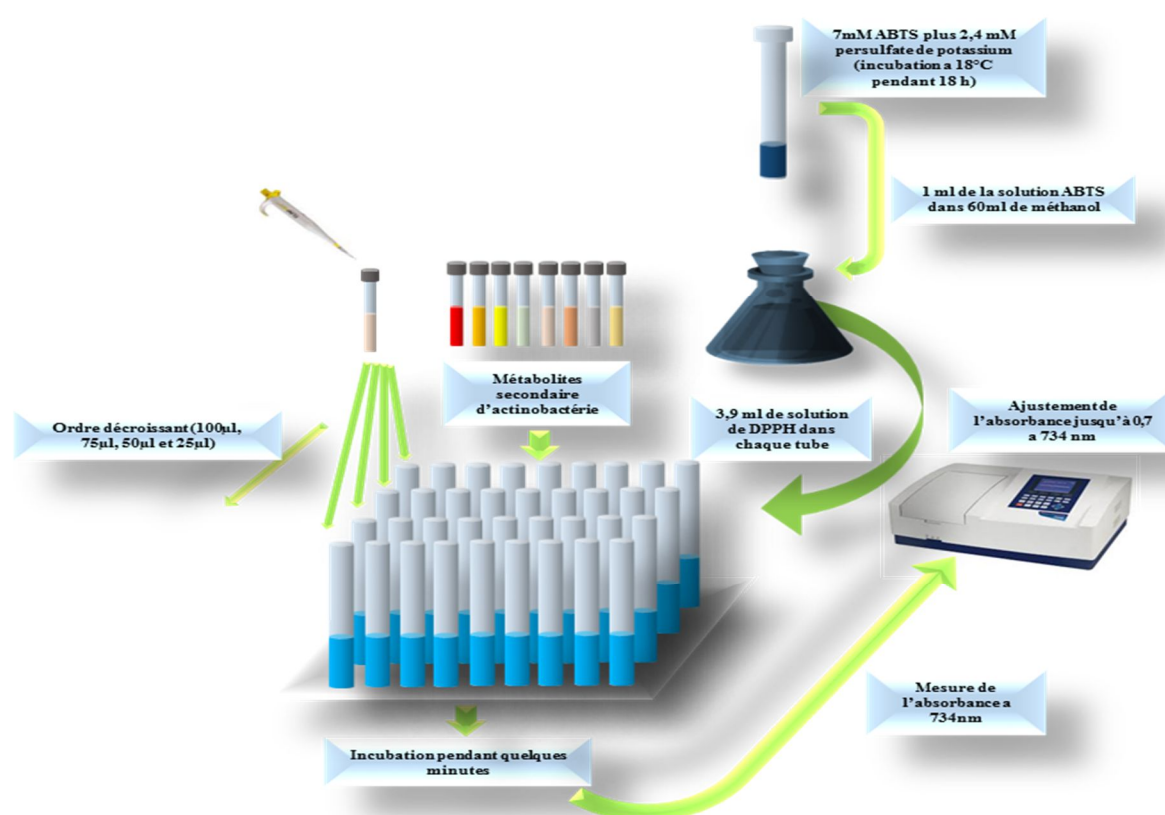


Figure 13. Mesure de l'activité antioxydant par ABTS (Ramful et al.,2010).



*Résultats et
discussion*

II. Résultats et discussion

Dans cette partie les résultats obtenus la pour la mise en évidence de l'activité Antifongique et antioxydant des neuf souches.

II.1. Isolement, purification et identification des Actinobactéries

Les colonies d'Actinobactéries apparaissent après 3 à 5 jours d'incubation à 30°C, sur les milieux d'isolements utilisés (Bennett, CSA et GYM). Ces colonies sont reconnues par leurs aspects macroscopiques (colonies dures incrustées dans la gélose). Les résultats de l'isolement des colonies d'actinomycètes à partir des échantillons du sol sont présentés dans la photo 01

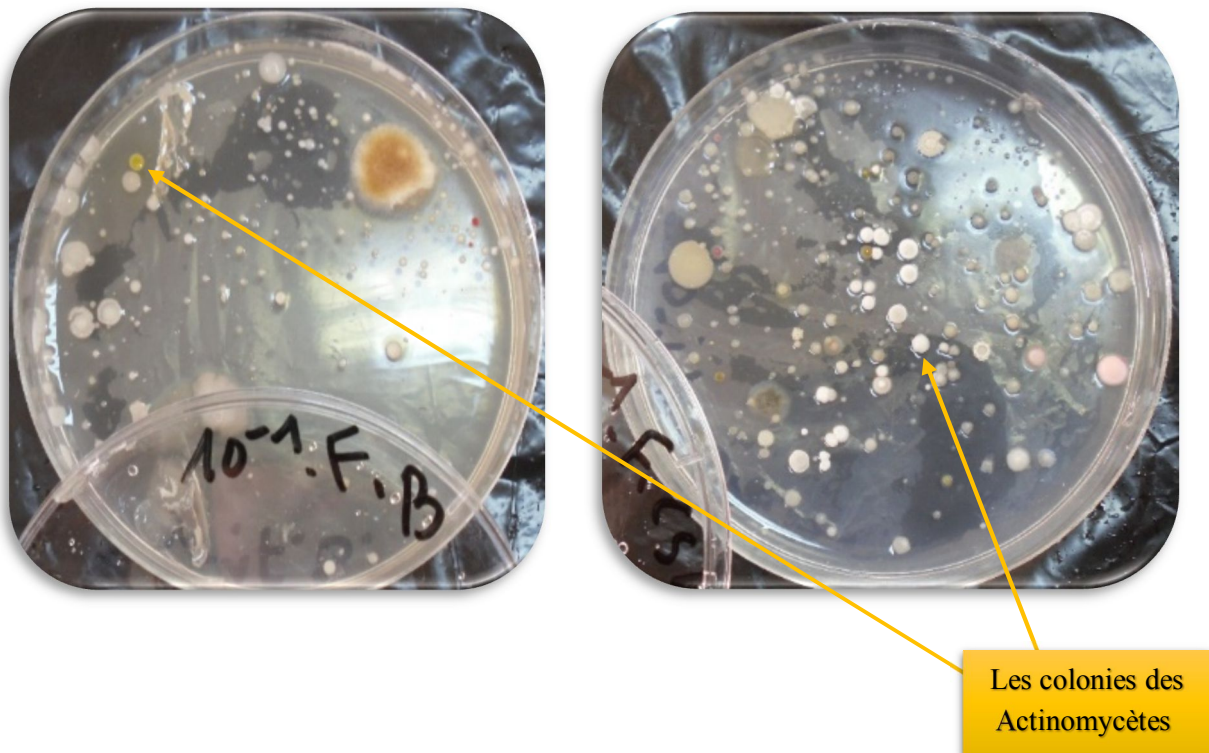


Photo 01 : Les souches des Actinomycètes isolé à partir du sol (Saïda). (Photo originale, 2018).

A partir de 30 souches isolées à partir des sols de la région de Saïda sur milieu GYM, une totale de 9 colonies d'Actinobactéries sont choisis et isolées, les résultats obtenus sont présentés dans la photo 02.

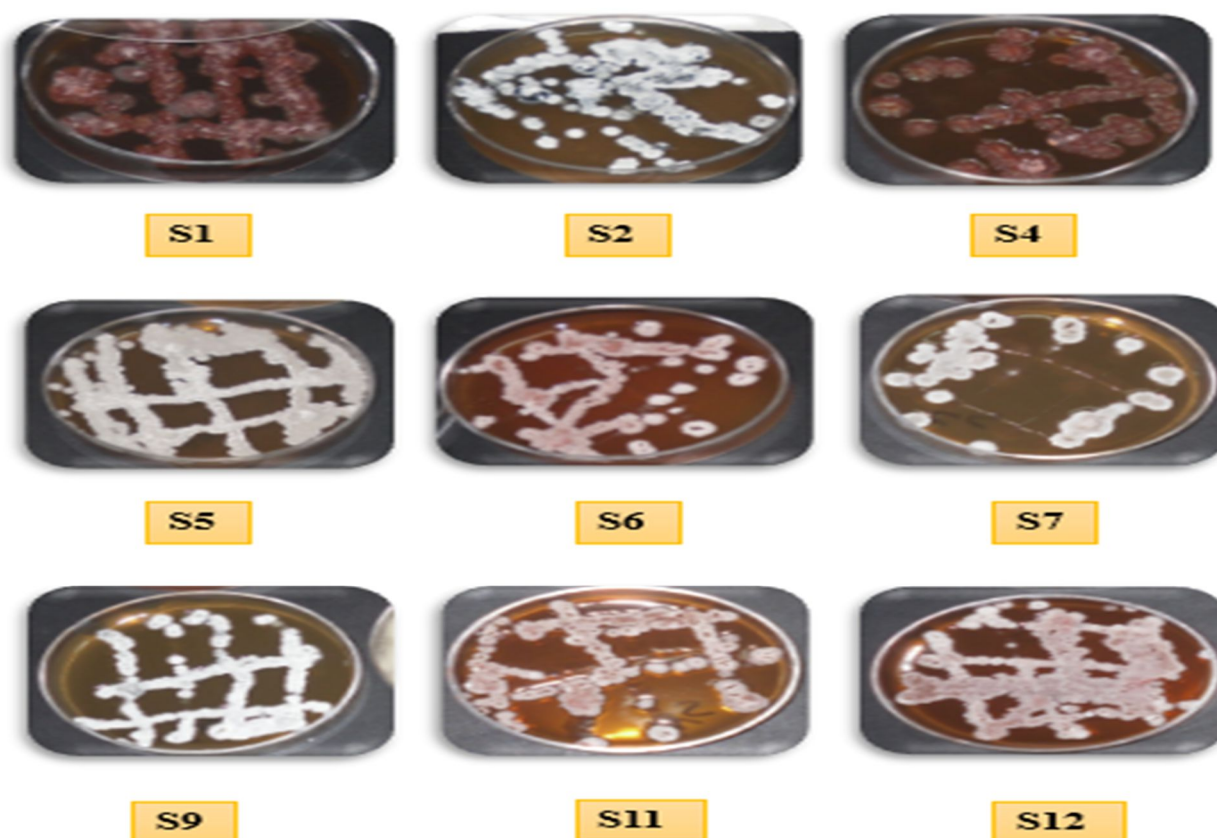


Photo 02 : Aspect de colonies d'Actinobactéries après purification sur milieu GYM (**Photo originale, 2018**).

II.2. Diversité des souches d'Actinobactéries isolée

L'identification moléculaire (par ARNr 16S) des souches purifiées était réalisée au sein du centre DSMZ (Allemagne). Le tableau regroupe le nom des espèces après leurs identifications génétiques.

Tableau 08 : Nom de souches bactériennes après identification moléculaire.

Code de la souche	Espèce bactérienne après identification par ARN 16S
S1	<i>Streptomyces lasiicapitis</i>
S2	<i>Streptomyces spectabilis</i> .
S4	<i>Streptomyces intermedius</i>
S5	<i>Streptomyces gougerotii</i>
S6	<i>Streptomyces rutgersensis</i>
S7	<i>Streptomyces coelicoflavus</i>
S9	<i>Streptomyces aureovorticillatus</i>
S11	<i>Streptomyces rubrogriseus</i>
S12	<i>Streptomyces ambofaciens</i>

II.3. L'activité antifongique

II.3.1. Résultats de l'activité antifongiques

Selon les résultats affichés sur la photo 03 et le tableau 09, Les souches S2, S4 et S9 ont démontrées une bonne activité contre *P. expansum* avec des pourcentages d'inhibition de (3-3.2cm), (4-3.5cm), (2.4-2.3cm) respectivement.

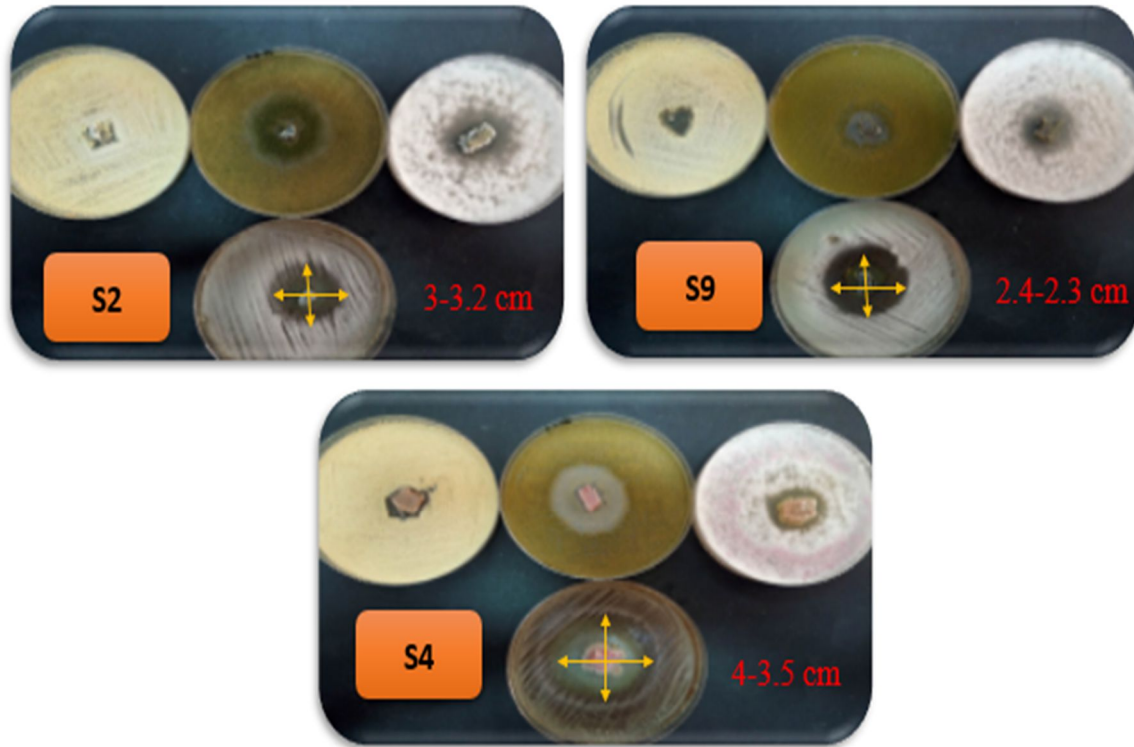


Photo03 :Résultat de l'activité antifongique de la souche S2, S4, S9 contre les souches fongiques sélectionnées. . (Photo originale, 2018).

L'activité antifongique est mesurée par le rapport entre la surface de l'inhibition créée par la souche bactérienne et la surface de la boîte entière multipliée par 100. Le résultat obtenu est évalué comme suit :

- 0.1-3% : Faible activité antifongique
- 3- 8% : Activité antifongique moyenne
- Supérieur à 8% : Bonne activité antifongique

Le tableau représente les souches bactériennes et leur pourcentage d'inhibition contre les quatre les souches fongiques, sachant que les souches (*S. lasiicapitis*, *S. rubrogriseus*, *S. ambofaciens*, *S. rutgersensis*) présentent une faible activité antifongique.

Les souches (*S. gougerotii*, *S. lasiicapitis*) résultent une activité antifongique moyenne.

et les trois souches (*S. spectabilis*, *S. intermedius*, *S. aureoverticillatus*) présentent une Bonne activité antifongique.

Tableau 09 : Le résultat de l'activité antifongique.

Les espèces	AP	AO	PE	FG
<i>S. lasiicapitis</i>	-	2.77% +	3.78% ++	-
<i>S. spectabilis</i>	-	3.16% ++	2.25% +	11.87% +++
<i>S. intermedius</i>	17.37% +++	23.92% +++	3.78% ++	6.82% ++
<i>S. gougerotii</i>	-	3.56% ++	6.25% ++	8.03% +++
<i>S. rutgersensis</i>	-	-	2.25% +	-
<i>S. coelicoflavus</i>	-	4.69% ++	19.76% +++	5.71% ++
<i>S. aureoverticillatus</i>	5.19% ++	14.70% +++	2.59% +	6.82% ++
<i>S. rubrogriseus</i>	-	1.93% +	2.96% +	-
<i>S. ambofaciens</i>	-	1.93% +	1.49% +	-

II.4. L'activité antioxydant.

II.4.1. Résultats de l'activité antioxydant

L'extrait de la souche *Streptomyces lasiicapitis* a prouvé une activité antioxydant de 88.20% contre l'ABTS, cette activité diminue avec la diminution de volume de l'extrait. Alors que le même extrait démontre activité faible contre le DPPH avec un pourcentage qui se situe entre 20.61 % et 5.94%.

L'extrait de la souche *Streptomyces spectabilis* est montré une bonne activité contre le radical ABTS (88.81%) et diminue avec la diminution du volume de l'extrait jusqu'au 5.94%, un faible pourcentage est enregistré pour le DPPH, il est situé entre 20.61% et 5.94 %.

L'extrait de la souche *Streptomyces intermedius* démontre une activité très élevée contre le radical ABTS, il est de 81.32 % et diminue jusqu'au la valeur de 46.03%, par contre l'activité du e se situe entre 20.61% jusqu'au 5.94%.

L'extrait de la souche *Streptomyces gougerotii* démontre une très bonne activité contre le radical ABTS avec un pourcentage de 99.50 % et cette valeur reste élevée tout le long de volume de l'extrait. Le DPPH montre une activité aussi élevée; elle est de 92.82 %.

L'extrait de la souche *Streptomyces rutgersensis* a montré une faible activité de pourcentage 35.12 % qui diminue avec la diminution de volume de l'extrait , alors que le même extrait montre une très faible activité avec le radical DPPH qui ne dépasse pas la valeur 11.79%.

L'extrait de la souche S7 prouve une activité antioxydant très élevée contre l'ABTS de 80.20 % , par contre le DPPH démontre une très faible activité qui ne dépasse pas 12%.

L'extrait de la souche *Streptomyces aureovercillatus* démontre une bonne activité antioxydant contre l'ABTS de 74.44 %, par contre le DPPH démontre une très faible activité ne dépasse pas 20%.

L'extrait de la souche *Streptomyces rubrogriseus* prouve une faible activité antioxydant pour les deux radicaux qui ne dépasse pas la valeur de 25%.

L'extrait de la souche *Streptomyces ambofaciens* prouve une très faible activité antioxydant pour les deux radicaux l'ABTS et DPPH qui ne dépasse pas la valeur de 17%.

II.5 Discussion

II.5.1. L'activité antifongique

De nombreuses espèces d'actinomycètes, en particulier celles appartenant au genre *Streptomyces*, sont bien connus comme agents de lutte biologique inhibant plusieurs champignons pathogènes (Errakhi et al., 2007; Khamna et al., 2009). L'analyse des séquences du gène de l'ARNr 16S a montré que toutes les souches isolées possèdent une similarité complète (100% de similitude) avec la base de données NCBI, ce qui signifie que toutes les souches isolées dans la Wilaya de Saida ont été déjà identifiées.

Nos résultats indiquent que parmi les 30 souches d'actinomycètes isolées des sols forestiers (Commune de Saïda), et nous avons choisis seulement neuf souches (*Streptomyces lasiicapitis*, *Streptomyces spectabilis*, *Streptomyces intermedius*, *Streptomyces gougerotii*, *Streptomyces rutgersensis*, *Streptomyces rutgersensis*, *Streptomyces aureovorticillatus*, *Streptomyces aureovorticillatus*, *Streptomyces ambofaciens*) certaines ont montré une nette performance à produire des molécules douées d'une activité antifongique. Nous constatons que les trois souches *Streptomyces spectabilis*, *Streptomyces intermedius* et *Streptomyces aureovorticillatus* ont montré une bonne activité contre la totalité des souches fongiques testées (*Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium graminearum*, *Penicillium expansum*) avec des pourcentages d'inhibition de 11.87% pour la souche *Streptomyces spectabilis* avec la souche fongique FG), et de 23.92% pour la souche *Streptomyces intermedius* avec la souche fongique AO et de 14.70% pour la souche *Streptomyces aureovorticillatus* avec la souche fongique AO. Par contre, les autres souches ne présentent aucune activité antifongique contre les souches fongiques sélectionnées.

Certaines études publiées en 2015 ont déjà démontré l'activité antifongique de 13 souches d'actinomycètes isolés à partir du sol agricole dans la région de Ain M'Lila ont présenté une activité antifongique vis-à-vis d'au moins une souche test utilisée. Les deux souches SA14 et SAiC3 sont actives sur les trois champignons (*Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* et *Fusarium oxysporum*), alors que *Fusarium oxysporum* est le plus sensible. (Belaidi et Sahour, 2015).

II.5 .2. L'activité antioxydant

Nos résultats indiquent que parmi les 9 extraits d'actinomycètes isolées à partir du sol (Wilaya de Saida), certains ont montrés une bonne activité antioxydant pour le teste DPPH et le test ABTS. Nous constatons que les extraits des souches (*Streptomyces gougerotii*, *Streptomyces*

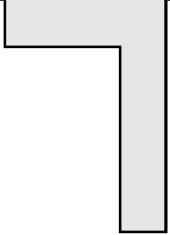
lasiicapitis, *Streptomyces spectabilis*, *Streptomyces intermedius*, *Streptomyces coelicoflavus*, *Streptomyces aureovorticillatus*, *Streptomyces rutgersensis*), possèdent un pourcentage d'inhibition très élevé entre (99.50% et 35.12%) pour le radical ABTS par rapport les autres souches , et pour le test DPPH ,l'extrait de la souche *Streptomyces gougerotii* ayant un pourcentage d'inhibition de 92.82%.

D'après l'étude de quatre souches d'actinomycètes isolées à partir sol (Wilaya de Bejaia), et d'après les résultats obtenus du test DPPH, l'isolat ND101 présente le pourcentage d'inhibition très élevé avec 68.03%. Et pour le test ABTS la souche ND101 présente aussi le pourcentage d'inhibition très élevé avec 85.36% suivie des souches SC20 et B01 avec le pourcentage d'inhibition de 61.18 et 56.77 % respectivement. **(Benbara et Lalali.2017)**.

Cette activité antifongique et antioxydant sont due à la sécrétion des métabolites secondaires de l'espèce *Streptomyces*

S.spectabilis secrète l'antibiotique Spectinomycine de la classe Aminocyclitol.

S.ambofaciens secrète l'antibiotique Spiramycine de la classe des macrolides. **(Boughachiche F.2012)**.



*Conclusion
Générale
et perspectives*

Conclusion et perspectives

Dans le cadre de recherche de métabolites secondaires des actinomycètes, ce travail présente l'activités antifongique et antioxydant de neuf souches d'actinomycètes isolés à partir d'un sol de la forêt d'Oued el Oukrif a Saida.

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

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité antifongique et antioxydant des métabolismes secondaires produits par des actinomycètes isolés des sols de la région de Saïda.

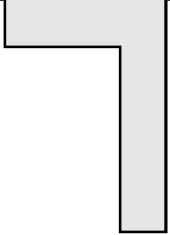
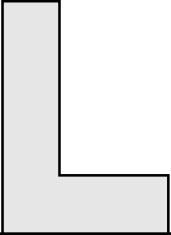
Au cours de cette étude nous avons réalisé également un test d'antagonisme vis-à-vis de quatre souches fongiques (*Aspergillus parasiticus*, *Fusarium graminearum*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium expansum*)

Selon les résultats dévoilés précédemment, nous concluons que les souches (*Streptomyces spectabilis*, *Streptomyces intermedius* et *Streptomyces aureoverticillatus*) présentent de substance bioactive. Les autres souches possèdent une faible activité antifongique et autres aucune activité du a la résistance des souches fongiques ou l'absence de substances bioactives contre certaines moisissures.

L'activité antioxydant des neuf extraits a été déterminé par la méthode du piégeage des radicaux de DPPH, ABTS. Les résultats indiqués que l'extrait de l'isolat *Streptomyces gougerotii* est doté d'une bonne activité antioxydant vis-à-vis le DPPH et l'ABTS.

Les résultats obtenus à travers cette étude semblent prometteurs et nous incitent à poursuivre nos efforts de recherche dans cette thématique afin de sélectionner des espèces d'actinobactéries dotées d'activités biologiques intéressantes. Toutefois, Il serait souhaitable de compléter et d'approfondir ce travail par :

- La purification et la caractérisation des extraits bruts dont le but d'identifier les molécules responsable de l'activité antioxydant.
- Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits



*Références
bibliographiqu*

Andriambololona T. Etude bibliographiques et chimiques des métabolites secondaires des actinomycètes telluriques cas du forêt d'ANKAFOBE. Mémoire de recherche pour l'obtention du Diplôme d'études approfondies de biochimie. Université d'Antananarivo, Madagascar 2010; p5.

Atawodi S. Antioxidant potential of African plants. African journal of Biotechnology 2005; 2, 128-133.

Athamena S, Chalghem I, Kassah-Laour A , Laroui S, Khebri S. Activite anti-oxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum L.* Lebanese Science Journal 2010; Vol 11 (1) :72p.

Atoui AK , Mansouri A, Boskou G ,Kefalas P . Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. Food Chemistry 2005; 89: 27-36.

Atti I. Evaluation des activités antioxydant et antiradicalaire d'un mélange d'épices « Ras el hanout » Université KASDI MERBAH Ouarglap 2014; p18

Avilala J, Arthala P,Kumar B,Viswanath D ,Saigopal R, and Golla.Inomynarasimh.Production of bioactive Compounds by actinomycetes and therantioxidant Properties 2013 ; ID 217030 ,.8P.

Awika J M,Rooney LW. Sorghum phytochemicals and their potential impact on human health. Photochemistry. 2004; 65:1199-1221.

Barouki R. Stress oxydant et vieillissement.médecine/ science 2006; 22 :266-72.

Belaidi I Sahour F.Etude de l'activité antibactérienne et antifongique d'une collection d'actinomycètes. Université des Frères Mentouri Constantine 2015.

Belyagoubi L. Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens 2014; p7.

Benbara S, Lalali S. Activité antimicrobienne et antioxydante de souches d'actinomycètes isolées de la région de Bejaïa Université A. MIRA-Bejaia 2017; 21 24p..

Berdy J. Bioactive microbial metabolites. Journal of antibiotics 2005; 58: 1-26.

Bergey's M. Systematic of bacteriology,Taxonomic outline of the prokaryotes.Second edition. Garrity. G.M ; Bell. J. A; Lilburn.T.G, Springer, NewYork Berlin Heidelberg 2004.

Bode W, Huber R.Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with Proteinases. Euro J Biochem 2005; 204(2) :433–51.

Bougandoura N, Bendimerad N. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp. Nepeta (L.)* Briq. Nature & Technologie 2013; 9 : 15p.

Bouhadjar K. Etude de l'effet des antioxydants naturels et de synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge, these pour l'obtention du diplôme de magister, Université Moiloud Mammeri, Tizi Ouzou 2011.

Bousseboua H. Microbiologie générale, édition de l'université Mentouri Constantine, Algerie 2002; P17.

Calvin A. investigation phytochimique de trois indonesiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires. *Tinospora crispa, merremiemarginata et oropheaenne-andra*. These de doctorat. Univerite de lausanne 2001; 243.

Cavalla M, Eberlinberlin T. Isolement des streptomycetes du sol. L'opéron, XIX 1994; 13-17.

Chang HB, Kim J.Antioxidant properties of dihydroherbimycin A from a newly isolated Streptomyces sp., Biotechnology Letters vol 29. 2007; p 599-603.

Chelghoum,M .Contribution à l'étude de l'activité antioxydant et l'effet inhibiteur sur l'alpha-amylase de l'espèce *Globularia alypum* L14 2017.

Chen CC, Adolphson R, Dean JFD, Eriksson KEL, Adams MWW, Westpheling J. Release of lignin from kraft pulp by a hyperthermophilic xylanase from *Thermatoga maritima*. Enzyme Microbiol Technol 1997; 20(1) :39–45.

Coates A, Hu Y. Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections .British journal of pharmacology 2007; 152, 1147-1154.

Conn M. Molecular Interactions of Endophytic Actinobacteria in Wheat and Arabidopsis. Thèse de Doctorat.Flinders University 2005; pp 29.

Dacosta Y. Les phytonutriments bioactifs: 669 références bibliographiques. Ed. Yves Dacosta, Paris 2003; p. 317.

De Oliveira S, de Souza G A, Eckert C R. Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. Quimica Nova, 2014; Vol : 37, n°3.

Favier A. Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique* 2003; p 108-11.

Gordon M. The mechanism of antioxydant action in vitro. *In: BJF Huddon (Ed.), Food antioxidants Elsevier applied science, London 1990; :1-18.*

Guinebert E, Durand P, Prost M, Grinand R, Bernigault R. Mesure de la résistance aux radicaux libres. Sixièmes Journées de la Recherche Avicole 2005; 554-558.

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

Hamedeyazdan S, Sharifi S, Nazemiyeh H, Fathiazd F. Evaluating and Antioxidant Activity of Marrubium crassidens. *Adv Pharm Bull*, 2014; 459-464.

Hellal Z. Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de Magister, Université Mouloud Mammeri De Tizi-Ouzou 2011.

Kerbab S. Les actinomycètes d'un sol salé : rôle des osmoprotecteurs naturels (Doctoral dissertation, Université Ferhat Abbas de Sétif 1 2012.

Kieser T, Bibb M, Buttner J, Chater F, Hopwood A. Practical Streptomyces genetics. John Innes Centre, Norwich Research Park 2000.

Kitouni M. Isolement de bactéries actinomycètes productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Université Mentouri Constantine 2007; P8.

Koechlin-ramonatxok C. Oxygène, stress oxydant et suppléments anti-oxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme* 2006; 20: 165-177.

Korn-Wendisch F, Kutzner H J. The family Streptomycetaceae, dans: Balows A., Truper H. G., Dworkin M., Harder W et Schleifer K. H. The Prokaryotes. Springer Edition New York 1992; 921-995.

Kratchanova M, Denev P, Ciz M, Lojek A, Mihailov A. Evaluation of antioxidant activity of medicinal plants containing polyphenol compounds. Comparaison of two extraction systems *Biochiica Polonica* 2006; 57 :229-234.

Madigan M, Martinko J. Biologie des microorganismes. Pearson Education France, 11e édition 2007; 331-423, 686-718.

Mathivanan N, Kabilan V, Murugesan K. Purification, characterization, and antifungal activity of chitinase from *Fusarium chlamydosporum*, a mycoparasitete groundnut rust, *Puccinia arachidis*. *Can J Microbiol* 1998; 44(7) :646–51.

Messali R, Senad K. Etude de potentiel antioxydant d'extraits bruts de deux souche d'actinobactéries *Streptomyces sp.* D1 et *Streptomyces sp.*D2 , Bejaïa Université A. MIRA-Bejaia 2017; 17 18p.

Mohammedi Z. Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et falvonoides de quelques plantes de la région du Tlemcen , Thèse de magistère . Université-Abou Bakr Belkaid-Telemcen. 2005; P14.

Mohammedi Z. Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et falvonoides de quelques plantes de la région du Tlemcen, Thèse de magistère , Université-Abou Bakr Belkaid-Telemcen 2006 .

Mohankumar Th, Krishnan K. Antimicrobial and antioxidant properties of marine actinomycetes *Streptomyces Sp* VITSTK7 2012.

Morel C. Etude de la régulation de la sulfhydryl oxydase GSOX1 et de son implication dans l'apoptose induite par le stress oxydant-Thèse de Doctorat de l'université de franche comté 2007.

Moure A, Cruz M, Franco D, Domnguez M, Sineiro L, et al . Domnguez H. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry* 2001; 72 :145-171

Niehaus F, Bertoldo C, Kähler M, Antranikian G. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl Microbiol Biotechnol* 1999; 51(6) :711–29.

O'Gara F, Dowling D, Boesten B. Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms: Biotechnology and the Release of GMOs. John Wiley & Sons : Weinheim 2008; Pp: 192.

Pandey A, Shukla A, Majumdar S. Utilization of carbon and nitrogen sources by *Streptomyces kanamyceticus* M 27 for the production of an Anti bacterial antibiotic. *Afr J Biotech* 2005; 4(9) : 909–10.

Pincemail J, Bonjean K, Cayeux K, Defraigne O . Mécanismes physiologiques de la défense anti-oxydante Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition clinique et metabolism* 2002; 16: 233-239.

Pochon J, Tradieux P. chniques d'analyses en microbiologie du sol. Edition de la tourelle, St Mandé 1962; pp. 110-111.

Prescott L, Harley J, Klein D. Microbiologie. De Boeck : Bruxelles. 2eme édition 2010; Pp : 1088.

Prouillac C. Synthèse et évaluation de nouveaux composés organique et phosphorés contre les effets des rayonnements ionisants. Etude de leur mécanisme d'action in vitro. Thèse de doctorat, Université Paul Sabatier Toulouse III. 2009.

Ramful D , Tarnus E, Aruoma O, Bourdon E ET Bahorun T. Polyohénol composition, vitamin C content and antioxydant capacity of mauritian citrus fruit pulp. Food Research International 2011; 44 : 2088-2099.

Rangaswami. G, Bagyaraj J, Bagyaraj G. Agricultural Microbiology. PHI: New Delhi 2004; Pp: 440.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, ET Rice-Evans, C. Antioxydant activity applying and inapoved ABTS radical cation decolorization assay free radical biology and medicine 1999; 26: 1231-1237.

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

Riche W, Mehenni D. Contribution à l'étude de l'activité antifongique des métabolites secondaires produits par quelques bactéries du genre Streptomyces isolées des sols forestiers de la région de Saïda, université Amar Telidji Laghouat 2017; p6.

Saci K, Safane A. Isolement des souches d'actinomycètes d'un sol agricole contaminé par l'herbicide Apyros et étude de leur capacité à le dégrader. Université des Frères Mentouri Constantine 2015; p21.

Servais S. Alteration mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone. Université de Claude Bernard Lyon 2004.

Shukla G. Soil Enzymology. Springer: Berlin 2010; Pp: 384.

Smaoui S. Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse doc : Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse) 2010 ; Pp : 207.

Stamford T, Stamford N, Coelho L, Araujo J. Production and characterization of a Thermostable -amylase from *Nocardiopsis* sp. Endophyte of yam bean. *Bioresour Technol* 2001; 76(2) :137–41.

Tsujibo H Kubota T, Yamamoto M, Miyamoto K, Inamori Y. Characterization of chitinase genes from an alkaliphilic actinomycete. *Nocardiopsis prasina* OPC-131. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69 (2) :894–900.

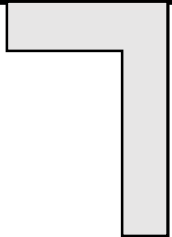
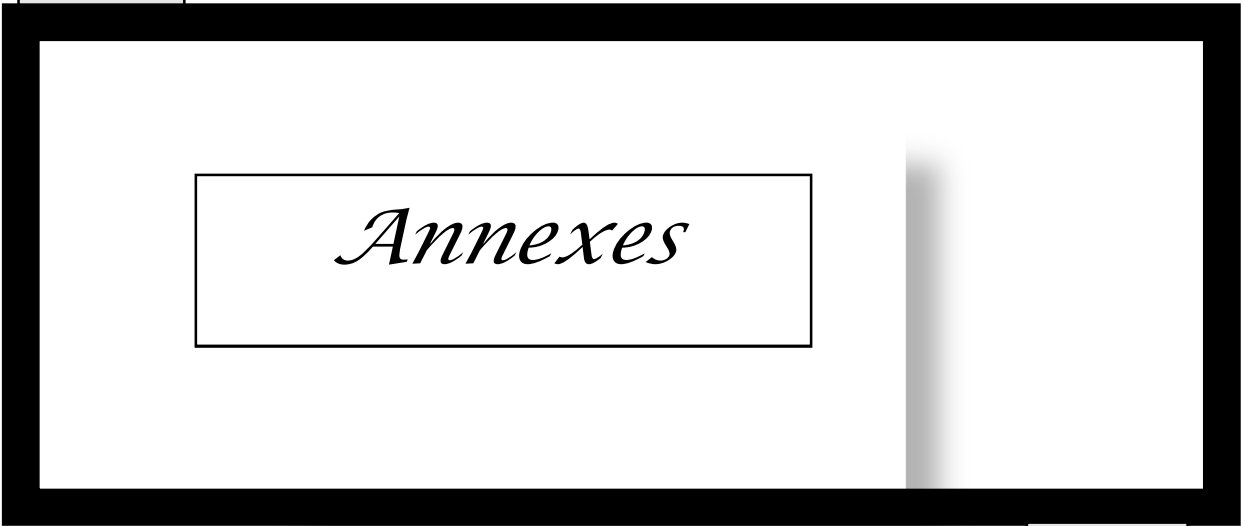
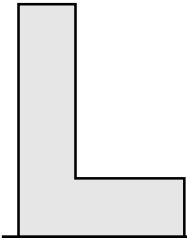
Valko M ,Rhodes B, Moncol J, Izakivic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 2006; 160:1-40.

Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald F, Chater K, van Sinderen D. Genomics of *Actinobacteria*: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol Mol Biol Rev* 2007; 71(3) : 495–548.

Windish WW, Mhatre NS. Microbial amylases. In : Wayne WU, editor. *Advances in Applied microbiology*, 7. New York : Academic Press 1965; p. 273–304 (3).

Winn W, Koneman W. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Lippincott Williams & Wilkins: Washington 2006; Pp: 1565.

Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. The determination of flavonoids contents on mulberry and their scavenging effects of superoxide radical. *Food Chem.* 1999; Vol : 64, 555–559.



Composition des milieux de culture

Bennett :

Glucose	10.0 g
Peptone pancréatique de caséine	2.0 g
Extrait de Levure	1.0 g
Extrait de Viande	1.0 g
Agar	15.0 g
Eau distillée	1 000 ml
PH	7,2

GYM Streptomyces Agar (DSMZ Medium 65)

Agar	12.0g
Extrait de malt	10.0g
Extrait de levure	4.0g
CaCO ₃	2.0g
Glucose	4.0g
Eau distillée	1 000 ml
PH	7.2

CSA Starch Casein Agar

Amidon	10.0 g
KNO ₃	2.0 g
K ₂ HPO ₄	2.0 g
NaCl	2.0 g
Caséine	0, 3 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05 g
CaCo ₃	0,02 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g
Agar - agar	18.0 g
Eau distillée	1 000 ml

Gélose dextrosée à la pomme de terre (PDA)

Pomme de terre	200 g
Dextrose 15.0 g	15.0 g
Agar agar	20.0 g
Eau distillée	1 000 ml

Résultat de la purification

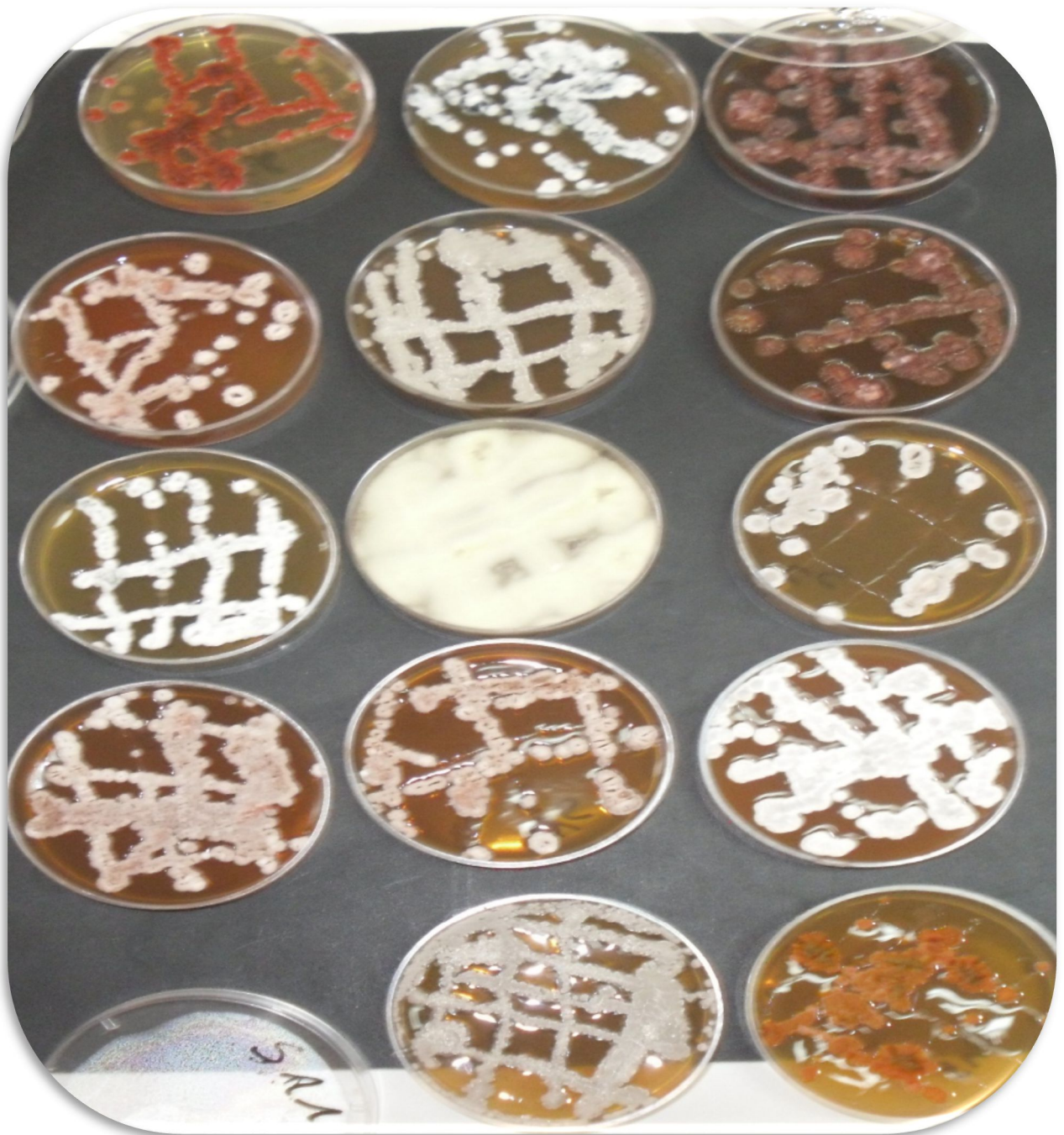


Photo 04 : Résultat de la purification sue milieu GYM. (Photo originale 2018)

Résultats de l'activité antifongique

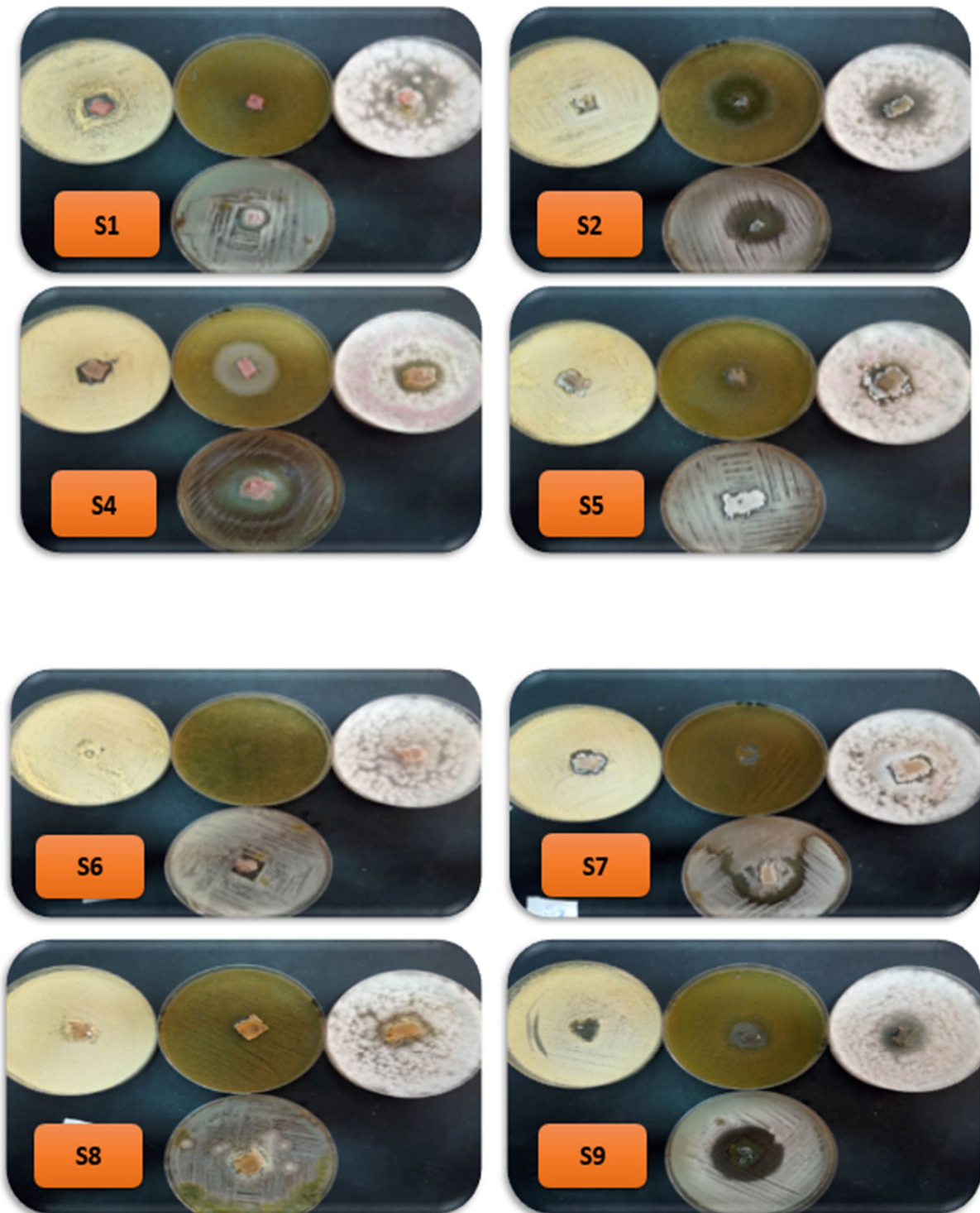


Photo 05 : Résultat de l'activité antifongique des souche (S1,S2,S4,S5,S6,S7,S8,S9) contre les souches fongiques sélectionnée . (Photo originale 2018)



Photo 06 : Résultat de l'activité antifongique des souche (S10, S11, S12, S13, S14) contre les souches fongiques sélectionnées. (Photo originale 2018)

Résumé

Contribution à l'étude de l'activité antifongique et l'activité antioxydant des métabolites secondaires produits par quelques bactéries du genre *Streptomyces* isolées des sols de la région d Oued el Oukrif (Saida).

Ce travail porte sur l'étude de la production, et la mise en évidence de l'activité antifongique et antioxydant de neuf souches d'actinomycètes isolées du sol de la région de Saida. Nous avons isolé 30 souches et nous avons choisis seulement neuf souches qui ont été ensuite identifiées génétiquement par séquençage d'ADNr 16S. Les résultats de l'identification ont montré que les neuf isolats appartiennent au genre *Streptomyces*. Les souches (*Streptomyces spectabilis*, *Streptomyces intermedius* et *Streptomyces aureovorticillatus*) ont enregistré une très bonne activité antifongique contre la totalité des souches fongiques testées (*Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium graminearum*, *Penicillium expansum*) avec des pourcentages d'inhibition de 11.87% pour la souche *Streptomyces spectabilis* avec la souche fongique FG), et de 23.92% pour la souche *Streptomyces intermedius* avec la souche fongique AO et de 14.70% pour la souche *Streptomyces aureovorticillatus* avec la souche fongique AO. Par contre, les autres souches (*S. rutgersensis*, *S. rubrogriseus*, *S. ambofaciens*) ne présentent aucune activité antifongique contre les souches fongiques sélectionnées. Les résultats du test d'activité antioxydant ont indiqués que l'extrait de l'isolat *Streptomyces gougerotii*, est doté d'une bonne activité antioxydante vis-à-vis le DPPH et l'ABTS elle est de 99.50 % et 92.82 % respectivement. On conclue que les actinobactéries précisément les *Streptomyces* possèdent une activité antifongique et antioxydant.

Mots clés : Actinobactéries, *Streptomyces*, activité antifongique, métabolites secondaires, activité antioxydante.

Abstract

Contribution to the study of the antifungal activity and antioxidant activity of secondary metabolites produced by some bacteria of the genus *Streptomyces* isolated from the soils of Oued el Oukrif region(Saida).

This work deals with the study of production and highlighting the antifungal and antioxidant activity of nine strains of actinomycetes isolated from the soil of the Saida region. We isolated 30 strains and chose only nine strains that were subsequently genetically identified by sequencing of 16S rDNA. The results of the identification showed that the nine isolates belong to the genus *Streptomyces*. The Strains (*Streptomyces spectabilis*, *Streptomyces intermedius* et *Streptomyces aureovorticillatus*) recorded a very good antifungal activity against all the fungal strains tested (*Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium graminearum*, *Penicillium expansum*) with inhibition percentages of 11.87% for the strain *Streptomyces spectabilis* with the fungal strain FG), and 23.92% for the strain *Streptomyces intermedius* with the fungal strain AO and 14.70% for the strain *Streptomyces aureovorticillatus* with the fungal strain AO. On the other hand, the other strains (*S. rutgersensis*, *S. rubrogriseus*, *S. ambofaciens*) show no antifungal activity against the selected fungal strains. The results of the antioxidant activity test indicated that the extract of the isolate *Streptomyces gougerotii* has good antioxidant activity against DPPH and ABTS with inhibition percentage of 99.50 % for ABTS and DPPH the percentage inhibition is 92.82%. While the other isolates show low activity of DPPH radical scavenging and ABTS. It is concluded that actinobacteria specifically *Streptomyces* having antifungal activity and antioxidant activity.

Keywords: Actinobacteria, *Streptomyces*, antifungal activity, secondary metabolites, antioxidant activity.

المخلص

المساهمة في دراسة النشاط المضاد للفطريات للمستقلبات الثانوية التي تنتجها بعض البكتيريا من جنس (*streptomyces*) المعزولة من التربة في منطقة واد الوكريف ولاية سعيدة.

يتناول هذا البحث دراسة الإنتاج ومظاهر النشاط المضاد للأكسدة ومضاد للفطريات لتسع سلالات من الأكتينوبكتيريا المعزولة من تربة منطقة سعيدة. عزلنا 30 سلالة واخترنا تسعة سلالات فقط تم تحديدها عن طريق تحليل الحمض النووي الريبي الريبوزومي S16, وأظهرت نتائج التحديد أن السلالات التسع تنتمي إلى جنس *Streptomyces* السلالات (*Streptomyces spectabilis*, *Streptomyces intermedius* et *Streptomyces aureovorticillatus*) سجلت نشاطاً مضاداً جيداً جداً ضد جميع السلالات الفطرية المختبرة (*Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium graminearum*, *Penicillium expansum*) مع حساب معدل التثبيط الذي كانت نتاجه 11.87% بالنسبة للسلالة *Streptomyces spectabilis* مع السلالة الفطرية FG و 23.92% بالنسبة للسلالة *Streptomyces intermedius* مع السلالة الفطرية AO و أيضاً 14.70% بالنسبة ل *Streptomyces aureovorticillatus* مع AO. و من ناحية أخرى، لم يلاحظ وجود أي نشاط للسلالات الأخرى ك (*S. rutgersensis*, *S. rubrogriseus*, *S. ambofaciens*) أشارت نتائج اختبار نشاط مضادات الأكسدة إلى أن مستخلص العزلة (*Streptomyces gougerotii*) لديها نشاط مضاد للأكسدة جيد ضد DPPH بنسبة 99.50% بالنسبة ل DPPH و ABTSS بنسبته المنوية هي 92.82%.

الكلمات المفتاحية : أكتينوبكتيريا، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للفطريات، المستقلبات الثانوية، *Streptomyces*.