

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار ثليجي 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 antioxydant
des métabolites secondaires produits par quelques bactéries
isolées des sols forestiers de la région El Hsasna (Saïda)**

Présenté par :

Bouamama Hafidha
Belhadj Zina

Devant le jury :

Gacem Mohamed Amine
Boudjemaa Badreddine
Krantar Kamel
Zerouki Houcine

Promoteur M.A.A
Co-promoteur
Président M.A.A
Examineur M.A.B

Université Amar Telidji-Laghouat
Université Amar Telidji-Laghouat
Université Amar Telidji-Laghouat
Université Amar Telidji-Laghouat

Année universitaire : 2017 / 2018

Table des matières

Dédicace
Remerciement
Sommaire
Les abréviations
Liste des figures
Liste des Photos
Liste des tableaux
Résumé
Abstract
ملخص

Introduction générale 02

PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Historique	04
I.2 Morphologie et caractéristiques des actinomycètes	04
I.3 Cycle de développement des actinomycètes	05
I.4 Taxonomie des actinomycètes	05
I.5 Distribution dans la nature	06
I.6 Rôle des actinomycètes dans l'environnement	07
I.7 Métabolisme des actinomycètes	08
I.7.1 Métabolisme primaire	08
I.7.2 Métabolisme secondaire	08
I.7.3 Production de biomolécules d'intérêt thérapeutique et biotechnologique.	09
a. Les enzymes	09
b. Les antibiotiques	10
c. Les peptides bioactifs	11
I.2. Les radicaux libres	13
I.2.1. Généralité	13

I.2.2. Origine des radicaux libres	14
I.2.3. Nature des radicaux libres	14
a. Espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO)	14
b. Ion superoxyde -O ₂	14
c. Radical libre hydroxyle (OH)	14
d. Oxygène singulet ¹ O ₂	14
I.2.4. Rôles biologique des radicaux libres	15
I.2.5. Le stress oxydant	16
a. Les conséquences biologiques de stress oxydative	16
a1. Les lipides	16
α. Les protéines	17
β. Les acides nucléiques	17
I.2.6. Les antioxydants	18
a. Définition d'antioxydant	18
b. Mécanisme d'action	18
c. Les systèmes antioxydants	19
c1. Les antioxydants enzymatiques	19
α. Le superoxyde dismutase (SOD)	19
β. La catalase (CAT)	20
θ. Les glutathions peroxydases et réductases	20
c2. Le système antioxydants non enzymatiques	20
α. Le système antioxydants non enzymatiques endogènes	20
β. Le système antioxydants non enzymatiques exogènes	20
β.1. Vitamine C (acide ascorbique)	20
β.2. Vitamine E (α-tocophérol)	20
β.3. Les Caroténoïdes	21

β.4. Les Polyphénols	21
I.2.7. Utilisation des antioxydants	22

PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE

I. Matériels et méthode

I.1. Prélèvement des échantillons	25
I.1.1. Traitement des échantillons	25
I.1.2. Préparation des sols pour isolement des actinomycètes	25
I.1.3. Isolement et purification des actinomycètes	26
I.1.4. Purification et conservation des actinomycètes	26
I.2. Screening de l'activité antifongique	27
I.2.1. Choix des souches fongiques	27
I.3. Evaluation du pouvoir antifongique des actinomycetes par la méthode des cylindre	27
I.3.1. Préparation de la suspension fongique	27
I.3.2. Inoculation des boites	27
I.1.5. Identification génétique des souches	28
I.1.6. Extraction de l'ADN bactérien	28
a. Préparation de la biomasse	28
b. Filtration et séparation de l'ADN des autres débris cellulaire	29
c. Fixation de l'ADN sur la colonne	29
d. Nettoyage de l'ADN des impuretés	
e. Elution de l'ADN de la colonne	29
I.1.7. Vérification de la présence d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose	31
I.1.8. Amplification de l'ADN extrait	31
I.1.9. Purification de l'ADN amplifié	31
a. Préparation de l'ADN pour fixation	31
b. Fixation de l'ADN	32
c. Nettoyage de la membrane	32
d. Séchage de la membrane	32
e. Elution de l'ADN	32
I.1.10. Vérification de l'amplification d'ADN par électrophorèse	32
I.1.11. Le séquençage de l'ADN amplifié	32

I.4. Préparation et extraction des métabolites secondaire	32
I.4.1. Extraction des métabolites secondaires	33
I.5. Mesure de l'activité antioxydant	35
I.5.1 Mesure de l'activité antioxydant par DPPH	35
a. Principe :	35
b. Mode opératoire	
c. Calcul des pourcentages d'inhibition :	35
I.5.2. Mesure de l'activité antioxydant par ABTS	36
a.Principe	36
b. Mode opératoire	36
II. Résultats et discussion	
II.1. Isolement, purification et identification des Actinobactérie	39
II.2. Diversité des souches d'Actinobactéries isolée	39
II.3. Résultats de l'activité antifongique des extraits bactériens	41
II.3.1. Extraits des souches isolées de la région de El Hsasna	42
a. Résultat de l'activité antioxydant des métabolites secondaire obtenus de la souche M3	44
b. Résultat de l'activité antioxydant des métabolites secondaire obtenus de la souche M4	44
c. Résultat de l'activité antioxydant des métabolites secondaire obtenus de la souche M5	44
d. Résultat de l'activité antioxydant des métabolites secondaire obtenus de la souche M7	44
e. Résultat de l'activité antioxydant des métabolites secondaire obtenus de la souche F2	45

Conclusion et perspectives

Références bibliographiques

Annexes

Remerciement

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

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

*Nous exprimons à **Mr.Krantar Kamel**, toutes nos reconnaissances, d'avoir accepté de présider ce jury. Nous le remercions infiniment et sincèrement, pour son aide, son examination et ses corrections sérieuses*

***Mr .ZEROUKI HOCINE** pour ce travail. Ainsi nous adressons nos sincères remerciements à tous les enseignants du*

Département de biologie de laboratoire de Mycologie

De l'Université de Laghouat.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Deux personnes les plus chers au monde que

Je ne remercierais jamais assez : leurs aides, encouragements,

Soutiens, sacrifices et patience pendant toute ma vie :

Mes chers parents

A mon marie KHAMALE pour son

encouragement et son aide pour moi le soutien indispensable que tu as

Toujours su m'apporter.

A mon fils ABED EL KARIME

ET POUR MA Deuxième famille médiha

Mes chères sœurs

Mes chers frères

A toute la famille bouamama

Tous mes chers amis qui ont étaient toujours avec moi avec leurs

aides et soutiens

A ma Binôme «zina» qui a partagé avec moi les moments difficiles de

Ce travail

Sans oublier mes braves Amies de la promotion Master II Génie

Biologique 2017/2018.

BOUAMAMA HAFIDHA

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Deux personnes les plus chers au monde que

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

pendant toute ma vie :

Mes chers parents

Mes chers frères : Ahmed, et Ben adda.

Mes chers sœurs : Naçira, Chaima, et Naama

A toute la famille BELHADJ

Tous mes chers amis qui ont étaient toujours avec moi

Avec leurs aides et soutiens:

Khaoula, Azza, Imen , Nessrine , Ibtissem .

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

Sans oublier mes braves Amies de la promotion Master II

Microbiologie appliquée 2017/2018.

ZINA

Liste des abréviations.

ABTS.	sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique).
ADN.	Acide désoxyribonucléique.
Ae.	Absorbance de l'échantillon.
ARNr.	Acide ribonucléique ribosomique
At.	Absorbance du témoin.
CAT.	Catalase.
DPPH.	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle.
ERO.	espèces réactive dérivées de l'oxygène.
Fe²⁺.	Fer ferrique.
Fe³⁺.	Fer ferreux.
GC%.	Coefficient de Chargaff.
GSH-Px.	la glutathion peroxydase
GYM.	Glucose -Levure –Malt
H₂O₂.	Peroxyde hydrogène.
HOCl.	Acide hypochloreux (Eau de javel).
O₂⁻.	Anion peroxyde.
OH.	radical libre hydroxyle
PDA.	Potato dextrose agar
PI %.	Pourcentage d'inhibition.
ROS.	Espèce réactives de l'oxygène.
SCA.	Starch Caséine agar.
SOD.	Superoxyde de dismutase.
TRXs.	thioredoxines.
UV.	le rayon ultra violet.

DO.	la densité optique
DSMZ.	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
GYM.	Glucose -Levure –Mal
NCBI.	National Center for Biotechnology Information
G + C.	Guanine + cytosine
HPLC/MS.	Chromatographie en Phase Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse

Liste des figures.	Pages
Figure 1. Sporulation et cycle de vie des actinomycètes	5
Figure 2. Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué	14
Figure 3. Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants	15
Figure 4. Organisation des radicaux libres et leur impact sur la santé humaine	15
Figure 5. Cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les EOR	16
Figure 6. Les effets nocifs du stress oxydatif sur la santé humaine	17
Figure 7. Les antioxydants enzymatiques et non enzymatique	21
Figure 8. Site de prélèvement du sol de la forêt El Hsasna Saïda (34.934388, 0.381391)	25
Figure 9. Techniques d'isolement souche des Actinomycètes.	26
Figure 10. Screening de l'activité antifongique	28
Figure 11. Extraction de l'ADN bactérien.	30
Figure 12. Préparation et extraction des métabolites secondaire	34
Figure 13 . Mesure de l'activité antioxydant par DPPH.	36
Figure 14. Mesure de l'activité antioxydant par ABTS.	37
Figure 15. Résultat de l'activité antioxydant des métabolites secondaire obtenus des souches sélectionnée	45

Liste des photos	Page
Photo 1. Les souches des Actinomycètes isolé à partir du sol (Photo originale, 2018).	39
Photo 2. Aspect des colonies d'Actinobactéries après purification sur milieu GYM (Photo originale, 2018).	39

Liste des tableaux.

	<i>Pages</i>
Tableau 1. Classes, ordres, et familles du phylum Actinobacteria	6
Tableau 2. Fréquence des divers genres d'Actinomycètes dans le sol	7
Tableau 3. Quelques exemples d'extrémozymes produites par les actinomycètes	9
Tableau 4. Quelques exemples d'antibiotiques produits par les actinomycètes	11
Tableau 5. Quelques exemples de molécules bioactives non antibactériennes et non antifongiques produites par les actinomycètes	12
Tableau 6. Mécanisme d'action de quelque antioxydant	19
Tableau 7. Souches fongiques utilisées pour tester l'activité biologique des extraits	27
Tableau 8. Nom de souches bactériennes après identification moléculaire.	40
Tableau 9. Résultat de l'activité antifongique des extraits bactériens	42

Résumé

Contribuions à l'étude de l'activité antifongique et antioxydant des métabolites secondaires produits par quelques bactéries isolées des sols forestiers de la région EL Hsasna (Saïda).

Les Actinobactéries sont un groupe de bactéries qui synthétise des métabolites secondaires. L'objectif de cette étude a été d'évaluer l'activité antifongique et antioxydante de quelques souches d'Actinobactéries isolées des sols forestiers de la région d'EL Hsasna (Saïda) contre cinq moisissures réputées toxigènes. Le pourcentage d'inhibition antifongique a été mesuré par la méthode de cylindre sur milieu (CSA, Bennet,) après extraction des isolées 7 souches qui ont été ensuite identifiées génétiquement par séquençage d'ADNr 16S. Les résultats de l'identification ont montré que les souches *Streptomyces flavofungini* ont enregistré une très bonne activité antifongique contre *P. expansum* avec un pourcentage d'inhibition de 30.86%, et *Streptomyces silaceus* avec un pourcentage d'inhibition 30.86 % contre *F. graminearum*, cette activité est dû essentiellement aux composés bioactifs présent dans les extraits et doués d'activité antifongique.

L'activité antioxydant des différents extraits a été évaluée par deux méthodes ; ABTS et le piégeage du radical libre DPPH. Les résultats du test d'activité antioxydante ont indiqués que l'extrait bruts de l'isolat *Streptomyces flavofungini* est doté une activité antioxydante vis-à-vis le DPPH, l'ABTS avec un pourcentage d'inhibition 95.92%, 41,36% respectivement. Tandis que les extraits de *Streptomyces lasiicapitis* présentent une faible activité du piégeage du radical DPPH 4.82%. Cette étude est démontré que les extraits obtenues des actinomycètes sont due d'une très bonne activité antifongiques et antioxydants.

Mots clés : Actinobactéries, , activité antifongique, métabolites secondaires. L'activité antioxydante

Abstract

Contributed to the study of the antifungal and antioxidant activity of secondary metabolites produced by some bacteria isolated from forest soils of the ELHsasna region (Saïda).

Actinobacteria are a group of bacteria that synthesizes secondary metabolites. The objective of this study was to evaluate the antifungal and antioxidant activity of some strains of Actinobacteria isolated from forest soils in the EL Hsasna region (Saïda).against five molds deemed toxinogenic. The percentage of antifungal inhibition was measured by the medium cylinder method (CSA, Bennet,) after extraction of the 7 isolated strains which were subsequently genetically identified by 16S rDNA sequencing. The results of the identification showed that the strains *Streptomyces flavofungini* recorded a very good antifungal activity against *P. expansum* with a percentage inhibition of 30.86%, and *Streptomyces silaceus* with a percentage inhibition of 30.86% against *F. graminearum*, this activity is due essentially bioactive compounds present in extracts and endowed with antifungal activity. The antioxidant activity of the various extracts was evaluated by two methods; ABTS and the trapping of the free radical DPPH. The results of the antioxidant activity test indicated that the crude extract of the isolate *Streptomyces flavofungini* had antioxidant activity with respect to DPPH, ABTS with a percent inhibition of 95.92%, 41.36% respectively. While *Streptomyces lasiicapitis* extracts show a low activity of trapping the radical DPPH 4.82%. This study is demonstrated that the obtuse extracts of actinomycetes are due to a very good antifungal and antioxidant activity.

Key words: Actinobacteria, antifungal activity, secondary metabolites. Antioxidant activity

ملخص

المساهمة في دراسة النشاط المضاد للأكسدة ومضادات الفطريات للمستقبلات الثانوية التي تنتجها بعض البكتيريا من جنس (*Streptomyces*) المعزولة من تربة الغابات في منطقة الحساسنة (سعيدة).

الأكتينوبكتيريا هي مجموعة من البكتيريا المنتجة للمستقبلات الثانوية. الهدف من هذه الدراسة هو تقييم النشاط المضاد للأكسدة ومضادات الفطريات لبعض السلالات من الأكتينوبكتيريا المعزولة من تربة غابات منطقة الحساسنة (سعيدة) ضد خمسة فطريات معروفة بإنتاجها للسموم. تم قياس النسبة المئوية لتثبيط الفطور بواسطة طريقة الاسطوانة المتوسطة على وسط (CSA, Bennet). و هذا بعد استخراج السلالات السبعة المعزولة التي تم تحديدها وراثياً فيما بعد بواسطة تحليل الحمض النووي الريبي الريبوزومي 16S. وأظهرت النتائج أن سلالات *Streptomyces flavofungini* سجلت نشاط مضاد للفطريات عالي مع نسبة تثبيط % 30.86 ضد *P. expansum* و *Streptomyces silaceus* مع نسبة تثبيط % 30.86 ضد *F. graminearum*.

تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة من المستخلصات المختلفة بطريقتين ABTS , DPPH. وقد أشارت نتائج اختبارات النشاط المضادة للأكسدة أن نسبة تثبيط مستخرج سلالات *Streptomyces flavofungini* 95.92%, 41,36% ABTS و DPPH على التوالي و مستخرج سلالات *Streptomyces lasiicapitis* بنسبة تثبيط ضعيفة . 4.82%. أظهرت الدراسة سلالات من الأكتينوبكتيريا ذات نشاط مضاد للفطريات و الاكسدة جيد للغاية .

الكلمات المفتاحية: الأكتينوبكتيريا ، النشاط المضاد للفطريات ، المستقبلات الثانوية. نشاط مضاد للأكسدة

Introduction

Introduction

De nombreux antibiotiques ont été isolés dans une variété de microorganismes et ont été employés dans beaucoup de domaines : l'industrie, l'agriculture, science vétérinaire et pharmaceutique (**Oskay et al., 2004**). Cependant, des études sont en cours pour identifier de nouveaux antibiotiques efficaces contre les mycètes et les bactéries pathogènes. A l'heure actuelle, les problèmes de la résistance aux antibiotiques et la sensibilité des patients associée à l'incapacité de contrôler certaines maladies infectieuses ont conduit à la recherche continue de nouveaux antibiotiques, à fin de combattre les organismes résistants parfois à plusieurs antibiotiques. Pour atteindre cet objectif, de nombreuses recherches se sont orientées vers le criblage de nouvelles souches productrices d'antibiotiques.

Les actinomycètes représentent une source biologique utile d'antimicrobiens contre des mycètes et des bactéries pathogènes. Ils sont surtout réputés pour leur grande capacité à produire naturellement des antibiotiques : environ 70% des molécules actives d'origine microbienne (**Okami et Hotta, 1988**), avec des possibilités intéressantes génétiquement pour la production de 10 à 20 métabolites pour chaque souche (**Islam et al., 2009**).

Les sols de l'Algérie bien que soumis à un climat aride à subhumide, montrent une biodiversité surprenante d'actinomycètes, bactéries mycéliennes à Gram positif, ubiquitaires, rencontrés sur tous les substrats naturels et jouent un rôle dans la décomposition des matériaux biologiques et dans le processus d'humification. Leur nombre dans la microflore tellurique dépend de la nature, la profondeur, le pH, l'humidité et l'aération (**Larpent et Sanglier, 1989**).

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 région d'El Hsasna. 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.

Partie I

Etude Bibliographique

I.1. Historique

Le terme actinomycète a été utilisé pour la première fois par **Bollinger**, en **1877**, pour désigner l'agent responsable d'une maladie du bétail. Cette période a été nommée «période médicale» du fait que l'intérêt porté à ces microorganismes était dû presque exclusivement aux propriétés pathogènes qu'on leur attribuait (**Baldacci, 1962**). La seconde période (1900-1940) **Mariat et Sebald** en **1990** se rapportent à la mise en évidence et à l'étude des actinomycètes du sol, suivi des travaux de **Waksman (1919)**, **Lieske (1921)**, **Jensen (1931-1933)**. Ces études couvrent la découverte des conditions saprophytiques d'habitat des actinomycètes et les premières tentatives pour distinguer deux groupes : les pathogènes et les saprophytes. L'époque suivante était celle de la découverte des antibiotiques produits par les actinomycètes avec la découverte de la streptomycine en 1940 produite par *Streptomyces griseus* (**Belyagoubi, 2014**).

La période suivante (**1940-1970**) est définie comme une période de développement des critères morphologiques et biochimiques pour la classification des actinomycètes, en parallèle avec la meilleure compréhension de la physiologie de ces bactéries et de leurs intérêts pour la production de métabolites secondaires et leurs potentialités de biodégradation des composés organiques. Actuellement, l'essor des méthodes de biologie moléculaire et de la méta-génomique ainsi que la découverte de nouvelles techniques d'identification des métabolites secondaires de ces micro-organismes ont rétabli la classification des espèces (**Belyagoubi, 2014**).

I.2. Morphologie et caractéristiques des actinomycètes

Les actinomycètes sont des bactéries à Gram positif, possédant un coefficient de Chargaff (G+C) compris entre 60-70 % (**Sullivan et Chapman, 2010 ; Gao et Gupta, 2012**). Ces microorganismes, tendent à croître lentement formant des filaments ramifiés (hyphe) de 0.5-1 µm de diamètre avec une longueur allant de 1.5-50µm. Ces bactéries peuvent être présentées sous différentes formes à savoir ; des bacilles, des coccobacilles (*Rhodococcus* et *Mycobacterium*) et des fois elles peuvent être présentées plusieurs filaments ramifiés. Le réseau ramifié d'hyphe formé par les actinomycètes se développe à la fois à la surface du substrat solide (gélose) et à l'intérieur de ce dernier pour former respectivement un mycélium aérien et un mycélium végétatif (*Streptomyces*). Dans certains cas, seul le mycélium végétatif est formé (*Frankia*, *Dactylosporangium* et *Sporichthya*). Les filaments mycéliens peuvent produire des spores qui peuvent être soit unique (*Micromonospora*), soit en chaînes (*Streptomyces*) (**Belyagoubi, 2014 ; Barka et al., 2016**).

I.3. Cycle de développement des actinomycètes

Le cycle de vie de nombreux actinomycètes commence par la germination des spores qui donne naissance à un mycélium végétatif, ramifiés et ancrés dans le milieu solide. Un mycélium aérien se développe sur ce mycélium végétatif. En effet, le mycélium végétatif s'autolyse et les produits de la lyse sont utilisés par le mycélium aérien. Les extrémités des hyphes aérien se cloisonnent et se différencient pour former des chaînes de spores uni-nucléées (**Belyagoubi, 2014 ; Barka et al., 2016**). Voir Figure 1.

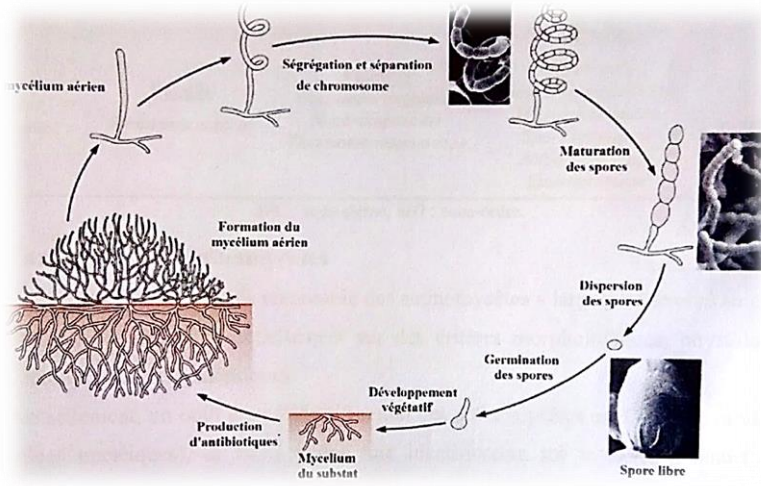


Figure 1. Sporulation et cycle de vie des actinomycètes (**Barka et al., 2016**).

I.4. Taxonomie des actinomycètes

La taxonomie des actinobactéries (Tableau 01) est basée sur un ensemble de caractères morphologiques, physiologiques, chimio-taxonomiques et génomiques. L'ensemble des caractéristiques de chaque taxon bactérien est répertorié dans le Manuel de Bergey, un ouvrage de référence pour la taxonomie des bactéries, dont le plus récent comprend un volume en deux parties dédié aux actinobactéria (**Goodfellow et al., 2012**).

Tableau 1. Classes, ordres, et familles du phylum *Actinobacteria* (Goodfellow et al., 2012).

Classe	Ordres	Familles	
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Actinomycetaceae</i>	
	<i>Bifidobactériales</i>	<i>Bifidobacteriaceae</i>	
	<i>Catenulisporales</i>	<i>Catenulisporaceae, Actinospicaceae</i>	
	<i>Corynebacterales</i>		
	<i>Franjkiiales</i>		
	<i>Glycomycétales</i>	<i>Glycomycetaceae</i>	
	<i>Jiangellales</i>	<i>Jiangellaceae</i>	
	<i>Kineosporales</i>	<i>Kineosporaceae</i>	
	<i>Micrococcales</i>		<i>Micrococcaceae, Beutenbergiaceae, Bogoriellaceae, Brevibacteriaceae, Cellulomonadaceae, Dermabacteriaceae, Dermacoccaceae, Dermatophilaceae, Intrasporangiaceae, Jonesiaceae, Micobacteriaceae, Promicomonosporaceae Rarobacteriaceae, Ruaniaceae</i>
		<i>Micromonosporales</i>	<i>Micromonosporaceae</i>
		<i>Propionibacterales</i>	<i>Propionibacteriaceae, Nocardoidaceae</i>
		<i>Pseudonocardiales</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>
		<i>Streptomycétales</i>	<i>Streptomycitaceae</i>
		<i>Streptosporangiales</i>	<i>Streptosporangiaceae, Nocardiopticaceae, Thermomonosporaceae</i>
<i>Acidimicrobiia</i>	<i>Acidimicrobiales</i>	<i>Actinomicrobiaceae</i>	
	<i>Nitriliruptorales</i>	<i>Nitriliruptoraceae</i>	
<i>Nitriliruptoria</i>	<i>Euzebyales</i>	<i>Euzebyaceae</i>	
<i>Rubrobacteria</i>	<i>Rubrobacterales</i>	<i>Rubrobacteriaceae</i>	
	<i>Thermophilales</i>	<i>Thermophilaceae</i>	
<i>Thermophilia</i>	<i>Solirubrobacterales</i>	<i>Solirubrobacteriaceae, Conexibacteraceae, Patulibactereaceae</i>	

I.5. Distribution des actinomycètes dans la nature

Cette grande diversité métabolique leur permet d'avoir une importance écologique majeure dans l'environnement (Hasley et Leclerc, 1993). Les actinomycètes sont des microorganismes très ubiquitaires, que l'on rencontre sur tous les substrats naturels courants. Dans le sol, les actinomycètes représentent 10 à 20 % de la population microbienne totale (Dommergues et Mangenot, 1970 ; Takahashi et Omura, 2003), dont les *Streptomyces* peuvent être majoritaire dans certains cas (Tableau 02).

Malgré la forte aridité du désert nord-africain, les sols des oasis du désert algérien sont révélés riche en actinomycètes parfois réputés rares (Sabaou et al., 1998 ; Boudemagh, 2007). D'autres actinomycètes sont isolés à partir d'habitat variés, tels que les rhizosphères des plantes médicinales (Khamna et al., 2010), l'écorce d'arbres (Pullen et al., 2002 ; Kitouni et al.,

2005), les sédiments marins (Balagurunthan et al., 2010). Certaines espèces ont, en outre, été isolées à partir des milieux extrêmes et des sols pollués contenant les métaux (Desjardin, 2002), les hydrocarbures ou le pétrole (Baniasadi et al., 2009), les boues activées (Simon et Meunier, 1970). Par ailleurs, d'autres se comportent comme des parasites intracellulaires des spongiaires (Grandhimathi et al., 2007).

L'air n'est pas considéré comme un habitat pour les actinomycètes, mais un moyen de transport (Gazengo et al., 1998, Reponen et al., 1998). Les spores d'actinomycètes thermophiles sont produites en grande quantité et sont facilement mises en suspension dans l'air et leur dissémination se fait facilement grâce au mouvement de l'air (Mazodier, 1974), c'est le cas des spores de l'espèce *Actinomyces invulnerabilis* qui ne se détruisent qu'à une température de 130 °C, le traitement à 120 °C inhibe seulement leur germination (Boudemagh, 2006).

Tableau 2. Fréquence des divers genres d'Actinomycètes dans le sol (Lechevalier et Lechevalier, 1967).

Genre	Pourcentage (%)
<i>Streptomyces</i>	95.34
<i>Nocardia</i>	1.98
<i>Micromonospora</i>	1.4
<i>Thermomonospora</i>	0.22
<i>Actinoplanes</i>	0.20
<i>Microbispora</i>	0.18
<i>Mycrobacterium</i>	0.14
<i>Streptosporangium</i>	0.10
<i>Actinomadura</i>	0.10
<i>Micropolyspora</i>	0.10
<i>Pseudonocardia</i>	0.06
<i>Microellobosporia</i>	0.04

I.6. Le rôle des actinomycètes dans l'environnement

I.6.1. Rôle des actinomycètes dans le sol

Dans les sols forestiers, la densité des actinomycètes est essentiellement représentée par le genre *Streptomyces* (Goodfellow et Williams, 1983). 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 (Crawford, 1993), et à produire des substances bioactives et des 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 (Crawford, 1993).

I.7 Le métabolisme des actinomycètes

La différenciation morphologique s'accompagne d'une différenciation métabolique. Un métabolisme secondaire se met en place donnant lieu à la biosynthèse de composés d'une extraordinaire diversité de structures et d'activités biologiques (**Choulet, 2006**). Deux des propriétés les plus significatives des actinomycètes sont leur capacité à se développer sur les substrats les plus divers et leur aptitude à synthétiser de très nombreux métabolites bioactifs (**Theilleux, 1993**). Les métabolites secondaires des actinomycètes peuvent être séparés en quatre classes distinctes en fonction de leur activité biologique :

- ✓ Agents antagonistes, comportant des antibiotiques, des antifongiques, des antiprotozoaires et même des antiviraux.
- ✓ Agents pharmacologiques tels que des antitumoraux et des inhibiteurs enzymatiques
- ✓ Agents agrobiologiques tels que les herbicides.
- ✓ Composés à activité régulatrice, tels que les facteurs de croissance.

Ces quatre propriétés dévoilent la richesse remarquable du métabolisme cellulaire de ce groupe microbien (**Theilleux, 1993**). Par ailleurs, la diversité métabolique de la famille des *Actinomycetaceae* est due à leurs génome de grande taille qui renferme des centaines de facteurs de transcription contrôlant l'expression des gènes, leur permettant de répondre à des besoins spécifiques (**Singh et al., 2006**).

I.7.1 Le métabolisme primaire

Le métabolisme primaire des actinomycètes est semblable à celui des autres organismes. Ce métabolisme primaire s'occupe de l'entretien de la structure cellulaire et permettent le fonctionnement du métabolisme général (**Theilleux, 1993**). Les métabolites primaires sont des produits issus directement des digestions (sucres simples, acides aminés, protéines, acides nucléiques et organiques), qui participent à la structure ainsi qu'à son fonctionnement de base (**Hopkins, 2003**). Ils sont souvent produits en grande quantité mais présentent une valeur ajoutée relativement basse. Ces métabolites sont aussi définis comme des molécules nécessaires à la croissance et au développement (**Raven et al., 2000**).

I.7.2 Métabolisme secondaire

Le métabolisme secondaire se différencie du métabolisme primaire par le fait qu'il concerne des métabolites non directement impliqués dans la croissance et la vie de l'organisme bactérien (**Theilleux, 1993**). De manière générale, le métabolisme secondaire est considéré

comme l'ensemble des voies de synthèse de composés qui n'ont ensuite pas des fonctions apparentes dans le métabolisme cellulaire (Colombié, 2005).

I.7.3. Production de biomolécules d'intérêt thérapeutique et biotechnologique

a. Les enzymes

Parmi les microorganismes producteurs de métabolites secondaires possédant une activité biologique, 70% appartiennent au groupe des actinomycètes et parmi eux, on trouve 95% de *Streptomyces* (Bastide et al., 1986). Les antibiotiques comme la streptomycine et les enzymes tels que les amylases, les cellulases, les xylanases et les lipases sont les produits industriels les plus importants des actinomycètes (Theilleux, 1993 ; Park et al., 2002). Les protéases d'actinomycètes sous forme libre ou immobilisées, sont employées dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et comme additifs dans les détergents (Theilleux, 1993). D'autre part, certains actinomycètes produisent de fortes quantités de chitinases et de β -1-3-glucanase causant des plasmolyses et des lyses dans les parois cellulaires des germes pathogènes (Conn, 2005). Le tableau 3 démontre quelques enzymes produits par une large gamme d'espèces d'Actinobacteries.

Tableau 3. Quelques exemples d'extrêmzymes produites par les actinomycètes.

Extremozymes	Actinomycètes extremophiles	Références
Actinomycètes Alkalithermophiles		
Cellulase	<i>Streptomyces sp</i>	Aboul-Enein et al., 2010
Kératinase	<i>Streptomyces sp</i>	Korkmaz et al., 2003
Endocellulase	<i>Streptomyces sp</i>	Van Soulinger et al.,
Dextranase	<i>Streptomyces anulatus</i>	Decker et al., 200
Endocellulase	<i>Thermomonospora sp</i>	George et al., 2001
Actinomycète thermophile		
Glucose isomérase	<i>Streptomyces spp</i>	Dhungel et al., 2007
Xylanase	<i>Streptomyces sp</i>	Rawashdeh et al., 2005
Actinomycète alkaliphile		
Aminopéptidase	<i>Streptomyces fradiae</i>	Vitale, 1999
Actinomycète halo-alkaliphile		
Protéase	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	Thumar et Singh, 2007
Actinomycète psychrotrophe		
Alpha-amylase	<i>Streptomyces sp</i>	Cotarlet et al., 2010

b. Les antibiotiques

L'émergence des microbes multi-résistants a orienté les études vers la recherche de nouvelles molécules bioactives. Les actinomycètes est parmi l'une des bases de cette stratégie, en produisant approximativement 2/3 de ces biomolécules (**Bulter et al., 2002**), parmi lesquelles, 75% d'antibiotiques produits sont utilisés respectivement en médecine et en agriculture (**Riedlinger et al., 2006 ; Ben Ameer Mehdi et al., 2006**). Les streptomycètes sont à l'origine de 75% des antibiotiques produits. Le genre *Streptomyces* est considéré en réalité l'une des sources majeures des produits naturels bioactifs (**Pridham et al., 1956 ; Stevenson, 1956 ; Subramani et Aabersgreg, 2012**).

Selon **Llic et ses collaborateurs (2007)**, 60% des composés antifongiques et antibactériens sont produits par *Streptomyces*. La néomycine et la streptomycine sont respectivement produites par *S. griseus* et *S. fradiae* (**Szeszak et Szabo, 1967 ; Szabo et al., 1985**). D'autre part, *S. viridochromogenes* et *S. hygrosopus* synthétisent le tri-peptide phosphinothricine qui possède des propriétés bactéricides, fongicides et herbicides (**Schwartz et al., 2004**). La staurosporine et la rébéccamycine sont des antibiotiques anti-tumoraux (**Onaka, 2006**). *S. fungicidicus* produit l'enduracidine ayant une activité bactéricide considérable contre les streptocoques multi-résistants et les bactéries à Gram positif. D'un autre côté, *S. rochei* sbsp. *volubilis* T-2636 accumule la sédécamycine qui inhibe fortement la croissance de *Staphylococcus aureus* (**Higashide, 1995**). L'érythromycine, la sporaricine, la destomycine, la vanomycine et la saccharomycine sont synthétisés par le genre *Saccharopolyspora* (**Suzuki, 1993**). En outre, *Nocardioopsis* sp. VITSVK 5(FJ973467) a une importante activité antifongique contre *A. fumigatus*, *A. flavus* et *A. niger* en comparaison avec l'amphotéricine-B. De plus, il est actif vis-à-vis *C. cruzi*, *C. tropicalis* et *C. albicans* en comparaison avec la streptomycine (**Vimal et al., 2009**). Des actinomycètes rares tels que *Saccharopolyspora*, *Blastococcus* et *Actinocoralila* isolées à partir de nombreuses plantes médicinales sont douées d'une activité antimicrobienne (**Sheng et al., 2013**). Le tableau 04 illustre les différents antibiotiques produits par une large gamme d'espèces d'Actinobactéries.

Tableau 04. Quelques exemples d'antibiotiques produits par les actinomycètes

Antibiotiques	Actinomycètes producteurs	Références
Les agents antibactériens		
Clostomycine	<i>Micromonospora sp.</i>	Takahashi et al., 2003
Candicidine	<i>Streptomyces griseus</i>	Jine nez et al., 2009
Streptolydigin	<i>Streptomyces lydicus</i>	Liu et al., 2007
Rétamycine	<i>Streptomyces linddensis</i>	Inoue et al., 2007
Marinomycine	<i>Marinispora sp.</i>	Sturdiková et Sturdik, 2009
Abyssomycine	<i>Verrucosipora sp.</i>	Sturdiková et Sturdik, 2009
Les agents antifongiques		
Blasticidine	<i>Streptomyces griseochromogenes</i>	Fukunaga et al., 2008
Phenylacétate	<i>Streptomyces hunidus</i>	Hwang et al., 2001
Transvlencine	<i>Nocardia transvalensis</i>	Mukai et al., 2006
Amphotéricine B	<i>Streptomyces nodosus</i>	Carle et al., 2003
Les bioherbicides et bioinsecticides par les actinomycètes		
Spinosad. neurotoxique	Insecticide <i>Saccharopolyspora spinosa</i>	Williamson et al., 2006
Herbicides. Exemple : 1.2.3-Dilydro-4- (β-D-ribofiranosyl)-1,2,4 (3H)- tiazol-3-one	<i>Actinomadura sp</i>	Schmitzer et al., 2000
Herbimycine	<i>Streptomyces hygrosopicus</i>	Omura et al., 2006

c. Peptides bioactifs

Les peptides antimicrobiens sont des antibiotiques naturels et sont des composants clefs des systèmes de la défense immunitaire innée, non-adaptative des organismes multicellulaires animaux et végétaux (Hoffmann et al., 1999; Ganz et Lehrer, 1998). Il s'agit d'un ensemble de petites protéines, comportant en moyenne de 20 à 50 acides aminés, qui partagent un caractère cationique et des propriétés amphiphiles. A présent, plus de 750 différents peptides antimicrobiens ont été identifiés dans divers organismes couvrant les procaryotes, les plantes, les insectes, et les animaux (y compris les êtres humains) (Boman, 1998 ; Wong et al., 2007). Les peptides antimicrobiens synthétisés par voie ribosomique chez les bactéries sont des molécules de nature protéique ou partiellement protéique, douées d'une activité antagoniste vis-à-vis de souches phylogénétiquement proches des souches productrices, ou occupant les mêmes niches écologiques. Leur synthèse, par voie ribosomique, les différencie des antibiotiques qui résultent d'un assemblage enzymatique. Deux grands groupes de peptides antimicrobiens sont distingués avec, d'une part, les peptides antimicrobiens produits par les bactéries à Gram négatif, représentés par les microcines, et d'autre part, les peptides antimicrobiens produits par les

bactéries à Gram positif (Nissen-Meyer et Nes, 1997). Le tableau 05 dévoilent quelques exemples de molécules bioactives d'origines peptidiques.

Tableau 05. Quelques exemples de molécules bioactives non antibactériennes et non antifongiques produites par les actinomycètes.

Molécules bioactives	Actinomycètes producteur	Références
Les agents anti parasitaires		
Trioxacarcine	<i>Streptomyces sp</i>	Maskey <i>et al.</i> , 2004
Prodiginine	<i>Streptomycescoelicolor</i>	Williamson <i>et al.</i> , 2006
Les agents anti viraux		
9-β-D-arabinofiranosyladénine	<i>Streptomyces antibioticus</i>	Madigan <i>et al.</i> , 1997
Panosialine	<i>Streptomyces sp</i>	Aoyagi <i>et al.</i> ,2006
L'agent hypocholestérolémique		
Rapamycine	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Chen <i>et al.</i> , 1999
Les agents anti tumoraux		
Asterobactine	<i>Nocardia asteroides</i>	Nemoto <i>et al.</i> , 2002
Salinosporamide A	<i>Salinispora tropica</i>	Fenical <i>et al.</i> , 2006
Mecherchamycine	<i>Thermoactinomyces sp</i>	Kanoh <i>et al.</i> , 2005
Marinomycine	<i>Marinospora sp</i>	Kwon <i>et al.</i> , 2006
Borrelidine	<i>Streptomyces sp</i>	Vino et Lokesh, 2008
IB-00208	<i>Actinomadura sp</i>	Malet-Cascon <i>et al.</i> , 2009
Les agents immunostimulateurs		
Rubratin	<i>Nocardia rubra</i>	De boer <i>et al.</i> , 2000
Bestatine	<i>Streptomyces olivoreticuli</i>	Ichinose <i>et al.</i> , 2003
FR- 900494	<i>Kitasatosporia kifumense</i>	Iwami <i>et al.</i> , 2006
Les agents immunosuppresseurs		
Pentalenolactone	<i>Streptomyces filipinensis</i>	Uyeda <i>et al.</i> , 2001
Brasilicardine A	<i>Nocardia brasiliensis</i>	Komatsu <i>et al</i> 2005
Les enzymes à application thérapeutique (anti tumorale)		
L- asparaginase	<i>Streptomyces spp</i>	Saleem Basha <i>et al.</i> , 2009

I.2. Les radicaux libres

I.2.1. Généralité

Un radical libre est défini comme toute espèce chimique (atome ou molécule) possédant un nombre impair d'électrons, cette espèce est très instable et réagit rapidement avec d'autres composants (**Denisov et Afanas'ev, 2005**), essayant de capturer les électrons nécessaires pour acquiescer la stabilité. Une réaction en chaîne débute lorsqu'un radical libre attaque la molécule stable la plus proche au lui arrachant son électron, et la molécule attaquée devient elle-même un radical libre (**Boudjourf, 2011**). La nature des radicaux libres sont nombreuses à savoir ; espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO) (ion superoxyde O_2^- , radical libre hydroxyle (OH), oxygène singulet et espèces libres non oxygénées, les acides gras peroxydés, les fractions protéiques, les acides aminés et les acides nucléiques) (**Ziane, 2013**). Dans tous les systèmes vivants, ces espèces sont produites habituellement par voie endogène durant le métabolisme cellulaire (**Kumari et Kakkar, 2008**). Les ERO sont aussi produites dans des circonstances pathologiques intrinsèques tels que le dysfonctionnement des mitochondries (**Montagnier, 2009**). Des facteurs exogènes à savoir ; les polluants environnementaux, les radiations, les solvants-organique, le tabac ainsi que les agents pathogènes sont aussi incriminés dans la production des ERO (**Ansari, 1997**).

I.2.2. Origine des radicaux libres

Ils sont produits par divers mécanismes physiologiques (**Figure 02**), afin de détruire les bactéries au sein des cellules phagocytaires (macrophages, polynucléaires) ou pour réguler des fonctions cellulaires létales telle la mort cellulaire programmée ou apoptose. Toutefois, au contact entre l'oxygène et certaines protéines du système de la respiration, une production d'anions superoxydes se produit lors du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. Le cycle redox est une autre source de radicaux libres, les rayonnements UV sont capables de générer des radicaux libres et les particules inhalées (amiante, silice) sont aussi des sources de radicaux libres. L'ingestion d'alcool est suivie de la formation de radicaux libres selon divers mécanismes, également les antibiotiques, les anticancéreux ont pour effet d'accroître la production de radicaux libres dans l'organisme (**Mohammedi, 2005**).

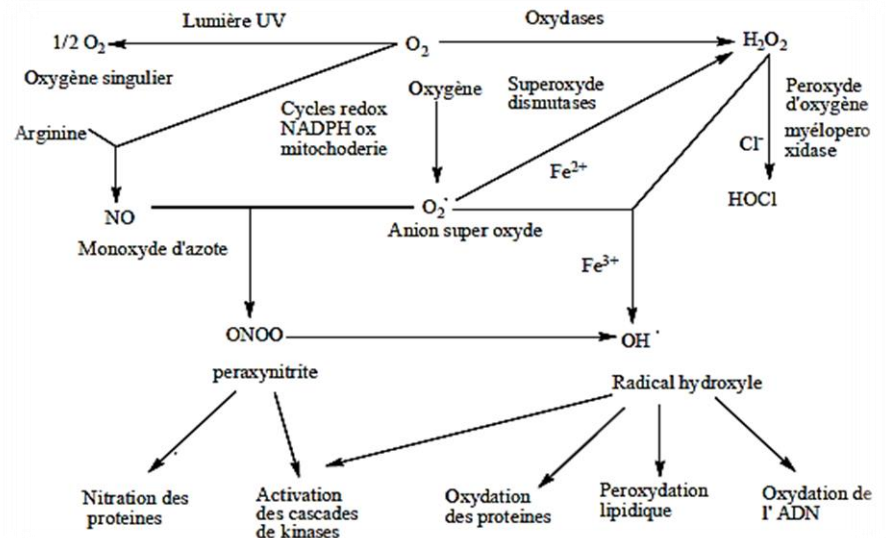


Figure 02. Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie (Mohammedi, 2005).

I.2.3. Nature des radicaux libres

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

En effet, l'oxygène possède deux électrons célibataires non appariés sur sa couche orbitale externe. Cette molécule est essentielle au bon Fonctionnement de l'organisme (Mohammedi, 2005).

b. Ion superoxyde $O_2^{\cdot -}$

L'ion superoxyde $O_2^{\cdot -}$ 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).

c. Radical libre hydroxyle (OH^{\cdot})

Le radical libre hydroxyle (OH^{\cdot}) 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 superoxyde (K. Bouhadjra, 2011).

d. Oxygène singulet 1O_2

Lorsque 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 sous l'action de la lumière (K. Bouhadjra, 2011). La régulation de la production de ces espèces est illustrée dans la figure 5.

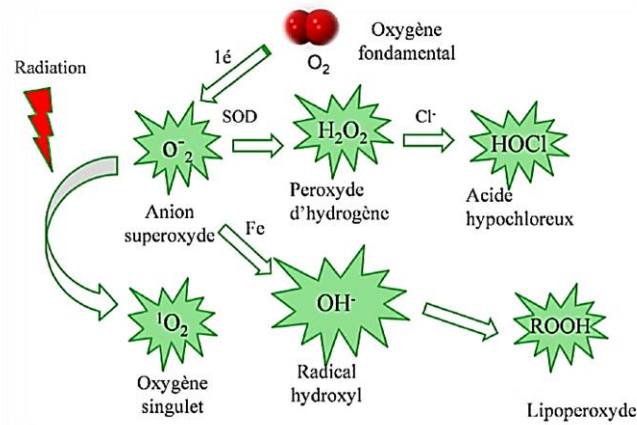


Figure 03. Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants (Milbury et Richer, 2008).

I.2.4. Rôles biologique des radicaux libres

Le paradoxe des radicaux libres en biologie est qu'ils constituent des espèces extrêmement dangereuses, susceptibles d'engendrer un nombre considérable de maladies, tout en étant des espèces indispensables à la vie. Ils remplissent en effet de très nombreuses fonctions utiles qui à part la phagocytose. Les radicaux libres participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes, à la destruction par apoptose des cellules tumorales, à la régulation de la dilatation capillaire, au fonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire, à la fécondation de l'ovule, à la régulation des gènes (Favier, 2003), à la production énergétique, au règlement de la croissance des cellules et à la signalisation intracellulaire (Ardestani et Yazdanparast, 2007 ; Touafek, 2010 ; Marfak, 2011) (Figure 04).

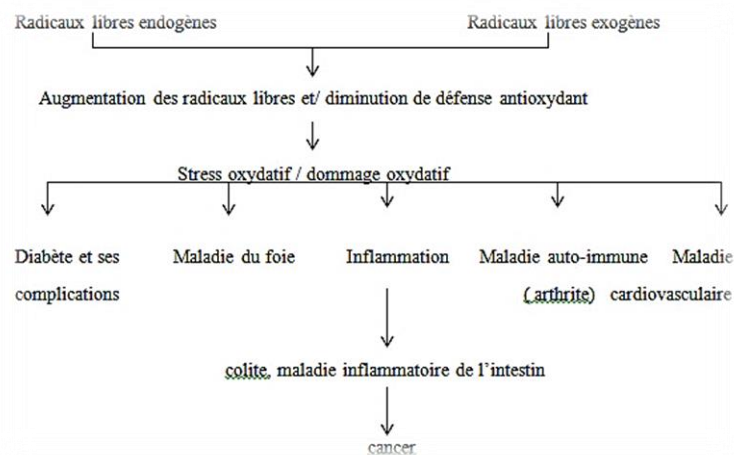


Figure 04. Organisation des radicaux libres et leur impact sur la santé humaine (Vijay et Vimuka., 2014).

I.2.5. Le stress oxydant

Le stress oxydatif se produit quand la génération des radicaux libres dans un système dépasse la capacité de ce système à les neutraliser et les éliminer, ou par une diminution des défenses antioxydantes (**Rahman et al., 2012**). Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, citons la surproduction endogène d'agent pro-oxydant d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, médicaments, rayons gamma, rayons ultraviolets du soleil, herbicides, métaux toxiques, plus l'eau et les aliments que nous consommons, l'exercice excessif sont également des facteurs qui augmentent considérablement la présence des radicaux libres dans notre système (**Kanoun, 2011 ; Mezit, 2009**). La principale source de ROS est la mitochondrie par l'intermédiaire de sa chaîne respiratoire, elle produirait en effet 90% des ROS cellulaires (**Mohammedi ., 2012**).

a. Les conséquences biologiques de stress oxydative

L'accumulation des EOR a pour conséquence l'apparition de dégâts cellulaires, et tissulaires souvent irréversibles dont les cibles biologiques les plus vulnérables sont les protéines, les lipides et l'acide désoxyribonucléique (Figure 05).

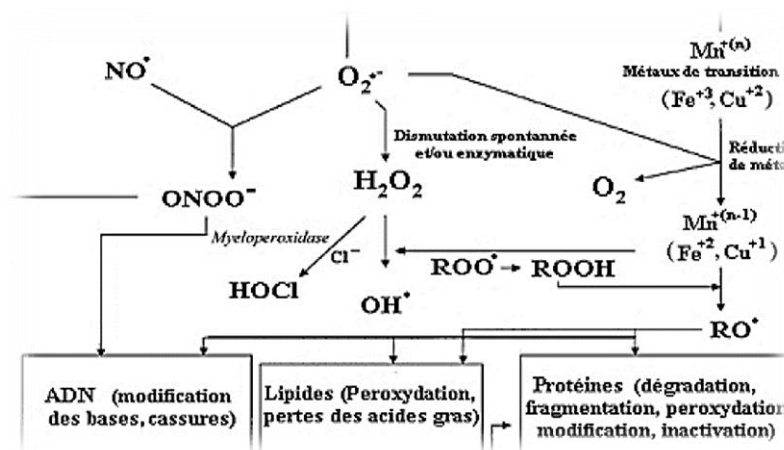


Figure 05. Cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les EOR (**Meziti, 2009**).

a1. Les lipides

Les acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée des EOR en raison de leurs hydrogènes bis allyliques facilement oxydables. C'est le cas des lipides majeurs des membranes cellulaires et des lipoprotéines. Les produits d'oxydation peuvent comporter des substances toxiques responsables des dysfonctionnements et d'altération cellulaires (perte d'acides gras polyinsaturés, diminution de la fluidité membranaire, modification de l'activité des enzymes et des récepteurs membranaires et libération du matériel à partir du compartiment subcellulaire) (**Meziti, 2009**).

α. Les protéines

Les acides aminés des protéines sont la cible des EOR soit au niveau de leur chaîne latérale, avec formation des produits d'oxydation, soit au niveau de la liaison peptidique, entraînant la fragmentation de la chaîne. L'oxydation des acides aminés génère des groupements hydroxyles et carbonyles sur les protéines mais peut également induire des modifications structurales plus importantes comme des réticulations intra ou intramoléculaires, ce qui affecte leurs fonctionnements. Les protéines modifiées deviennent généralement plus sensibles à l'action des protéases et sont alors dirigées vers la dégradation protéolytique au niveau du protéasome (Meziti, 2009).

β. Les acides nucléiques

Les bases azotées et le désoxyribose sont la cible privilégiée des EOR, ils sont alors transformés en produits de fragmentations et en bases oxydées, les altérations du matériel génétique s'accumuleront au sein de l'ADN représentant ainsi la première étape impliquée dans la mutagenèse, la carcinogenèse et le vieillissement (Meziti, 2009).

Le stress oxydatif, est donc impliqué dans un grand nombre de pathologies, tant aiguës que chroniques (Kanoun, 2011), comprenant le cancer, l'athérosclérose, le syndrome chronique de fatigue, l'arthrite rhumatoïde et les maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, et la maladie de Huntington (figure 06) (Rahman et al., 2012).

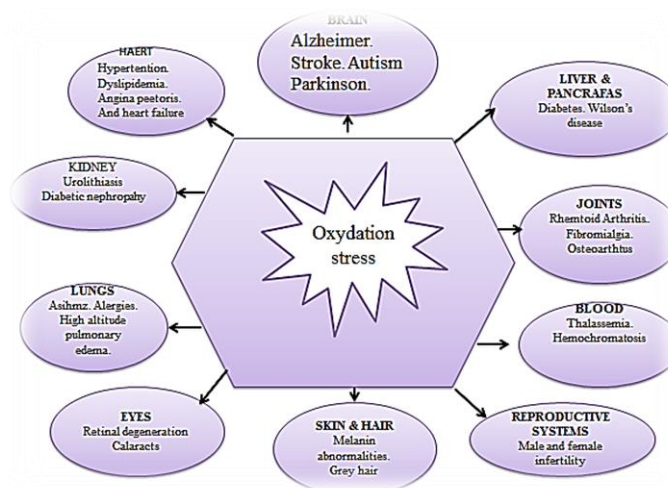


Figure 06. Les effets nocifs du stress oxydatif sur la santé humaine ((Favier, 2003 ; Rahman et al., 2012).

I.2.6. Les antioxydants

La protection contre les effets délétères induits par les radicaux oxygénés s'effectue à l'aide de trois types d'agents différents : les protéines non enzymatiques, Les enzymes tels que les superoxyde-dismutases et les glutathion-peroxydases et enfin les antioxydants d'origine nutritionnelle tels que les caroténoïdes, les tocophérols (vitamine E), l'acide ascorbique (vitamine C) et les polyphénols qui sont des antioxydants essentiels pour l'homme. L'oxydation fait partie d'une réaction d'oxydo-réduction qui transfère des électrons d'une substance vers un agent oxydant. Cette réaction peut produire des radicaux libres qui entraînent des réactions en chaîne destructrices. Les antioxydants sont capables de stopper ou de retarder ces réactions en chaîne en se réduisant avec les radicaux libres et annihilant ainsi leur action. Ces propriétés se trouvent beaucoup dans les familles des thiols et des phénols.

a .Définition d'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. En outre, l'antioxydant alimentaire idéal, doit être soluble dans les graisses, efficace à faible dose, et non toxique, n'entraîne ni coloration, ni odeur, ni saveur indésirable, résistant aux processus technologiques et il est stable dans le produit achevé (**Hellal, 2011**).

b. Mécanisme d'action

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.

En plus, leurs radicaux intermédiaires sont relativement stables du fait de la délocalisation par résonance et par manque de positions appropriées pour être attaqué par l'oxygène moléculaire. 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 puisse réagir avec un nouvel acide gras. Tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singlet pour la transformer en chaleur (Yaacoub, 2009 ; Hellal, 2011). Le tableau 6 illustre les mécanismes d'action de quelques antioxydants.

Tableau 06. Mécanisme d'action de quelque antioxydante.

	Nature	Mode d'action
Défenses non enzymatiques	Vitamine E	
	Vitamine C	
	Béta carotène	
	Béta carotène	
	Béta carotène	Fixation des métaux de transition
	Ubiquinone, acide urique...	
Défenses enzymatiques	Superoxyde dismutase	Catalyse la dismutation de l'anion superoxyde
	Catalase	Métabolise H ₂ O ₂
	Glutathion peroxydase	Action réductrice sur H ₂ O ₂ et les hydroperoxydes

c. Les systèmes antioxydants

Les antioxydants se divisent en deux catégories : enzymatiques et non enzymatiques. La figure 9 illustre les différents antioxydants enzymatiques et non enzymatiques

c1. Les antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques sont le superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT), et la glutathion peroxydase (GSH-Px). Plus de ces enzymes principales, d'autres antioxydants, y compris l'hème oxygénase-1, et les protéines redox, telles que des thioredoxines (TRXs), peroxyredoxins (PRXS), et glutaredoxins, se sont également avérés pour jouer des rôles cruciaux dans les défenses anti-oxydantes pulmonaires (Birben et al., 2012).

α. Le superoxyde dismutase (SOD)

La dismutation de superoxyde (O₂⁻) s'effectue par SOD, afin d'avoir l'oxygène moléculaire (O₂). Donc cette dismutation est importante pour chaque cellule. Le H₂O₂ est produit par l'action de SOD ou par l'action des oxygénases (xanthine oxydase), qui est réduit en eau par la catalase et glutathion peroxydase (Birben et al., 2012).

β. La catalase (CAT) :

Présente en particulier dans les hématies et les peroxysomes hépatiques (Meziti, 2009). La CAT dégrade le H_2O_2 en eau, donc il y a une synergie entre le SOD et CAT. (Birben et al., 2012 ; Meziti, 2009).

θ. Les glutathions peroxydases et réductases

GSH peroxydase catalyses la réduction de H_2O_2 en présence de GSH. En plus le GSH réductase régénère le GSH à partir de GSSG tout en utilisant le NADPH comme cofacteur (Rahman et al., 2012).

c2. Le système antioxydants non enzymatiques**α. Le système antioxydants non enzymatiques endogènes**

Ce groupe de systèmes antioxydants renferme nombreuses substances endogènes parmi les quelles on peut citer le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, la mélanine, la mélatonine, l'acide lipoiq. De tout ces composés endogènes synthétisés par les cellules le plus important est sans doute le glutathion. La bilirubine est, quant à elle, capable de piéger les radicaux peroxy et l'oxygène singulier, protégeant ainsi l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires (Meziti, 2009). Les protéines chélatrices de métaux de transitions comme l'haptoglobine, la ferritine, l'albumine, et la céruloplasmine agissent en diminuant la disponibilité d'agents pro-oxydants, comme les ions Fe^{2+} / Fe^{3+} ou Cu^{2+} / Cu^+ permettant par ce biais de prévenir la production des radicaux libres par la réaction de fenton.

β. Le système antioxydants non enzymatiques exogènes**β1. Vitamine C (acide ascorbique)**

Est un antioxydant hydrosoluble, qui neutralise les radicaux libres oxygénés de la phase aqueuse intracellulaire et extracellulaire. Elle est régénérée par ascorbate réductases (Birben et al., 2012 ; Meziti, 2009).

β2. Vitamine E (α-tocophérol)

La vitamine E fait partie de la famille des tocophérols, cette famille comprend 4 substances (α , β , γ , δ), α -tocophérol est la forme la plus active (Cuvelier et al., 2003). La vitamine E est décrite comme étant le principal antioxydant liposoluble dans le plasma et les érythrocytes chez l'homme, il est capable d'une part, de piéger chimiquement l'oxygène singulier en s'oxydant en quinone, et d'autre part, de réagir avec le radical hydroxyle $HO\bullet$. Mais son

principal rôle biologique est de réagir avec les radicaux peroxydes $\text{ROO}\cdot$ pour former un radical tocophéryle (Dellatre, 2005).

β3. Les Caroténoïdes

Les Caroténoïdes sont des colorants trouvés chez les plants (Birben et al., 2012). L'activité antioxydante de ces molécules repose principalement sur la présence de nombreuses doubles liaisons conjuguées au sein de leur structure. Elles interagissent avec les radicaux libres : peroxyde ($\text{ROO}\cdot$), superoxyde $:\text{O}_2^-$, Hydroxyle $:\text{OH}\cdot$ par 3 mécanismes, soit par l'abstraction d'hydrogène, transfert d'électron et addition du radical (Benhammou, 2011).

β4. Les Polyphénols

Les polyphénols sont des pigments végétaux dont les propriétés antioxydantes, les plus importants sont les flavonoïdes (Médart., 2009). Ils sont naturellement capables de piéger l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ et le radical anion superoxyde $\text{O}_2^-\cdot$ en le dismutant en H_2O_2 (Chen et al., 2003). Leur effet protecteur est notamment connu dans le système cardiovasculaire où ils préviennent l'oxydation des protéines.

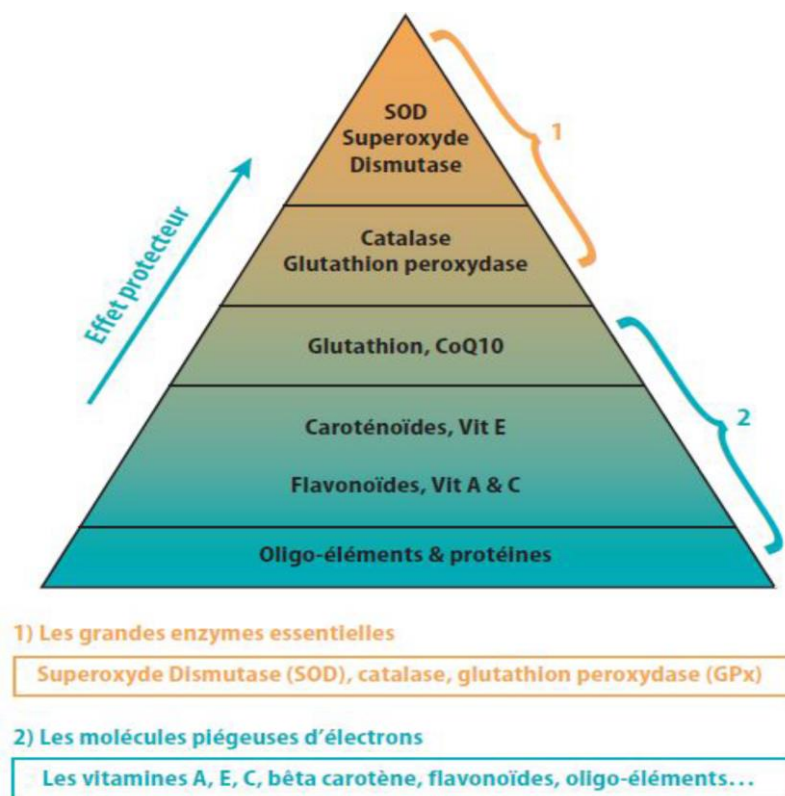


Figure 07. Les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques (Menvielle-Bourg, 2005).

I.2.7. Utilisation des antioxydants :

- ✓ Dans l'industrie chimique : pour éviter le durcissement du caoutchouc ou en métallurgie pour protéger les métaux de l'oxydation.
- ✓ Dans l'industrie agro-alimentaire : pour éviter le rancissement des corps gra
- ✓ Dans l'industrie teinturerie : pour éviter l'oxydation des colorants (**Bouhadjra, 2011**).

Partie II :

Étude expérimentale

Matériels et méthodes

I. Matériels et méthode

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 d'El Hsasna), 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 8. Site de prélèvement du sol de la forêt El Hsasna Saïda (34.934388, 0.381391)

I.1.1. 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 saturé d'humidité (**Cavalla et Eberlin, 1994**).

I.1.2. Préparation des sols pour isolement des actinomycètes

Une fois le sol est prêt, la dilution mère est préparé dans un tube a essaie à partir d'un gramme de sols pour chaque échantillons 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 (1 :100 et 1 :100).

I.1.3. Isolement et purification des actinomycètes

A partir de chaque dilution préparée précédemment, 100 µl 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 9.).

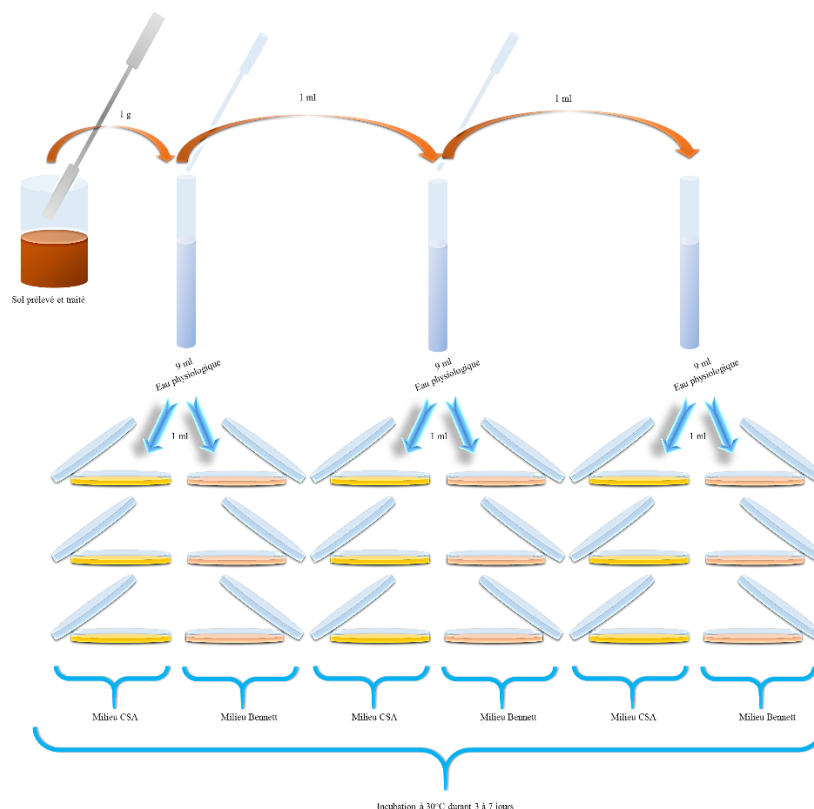


Figure 9. Techniques d'isolement souche des Actinomycètes.

I.1.4. Purification et conservation des actinomycètes

Après examinaisons des colonies à l'aide d'un microscope photonique, les colonies typique d'Actinobactéries sont purifié sur la surface du milieu CSA puis incubé a 30°C pendant trois à sept jours. Une fois la culture et pures, les colonies sont transférées dans 100 ml de milieu Gym liquide. L'incubation se fait à 30°C pendant sept jours. Les colonies actinomycétales pure 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

Tableau 7. 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>	

I.3. Evaluation du pouvoir antifongique des actinomycètes par la méthode des cylindre

I.3.1. 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 10^6 spores/ml. Les suspensions fongiques sont ensuiteensemencées pour chaque souche sur les milieux PDA solidifié sur les boîtes.

I.3.2. Inoculation des boîtes

Les boîtes de pétrie préalablement préparées, solidifiées etensemencées par les spores fongiques sont inoculées une autre fois par des cylindres de 6mm de culture jeune d'actinomycètes au centre des boîtes. Ces boîtes sont enfin incubées à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant une durée de 5 à 7 jours (figure 10.).

L'activité antifongique est mesuré par le rapport entre la surface de l'inhibition crée 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

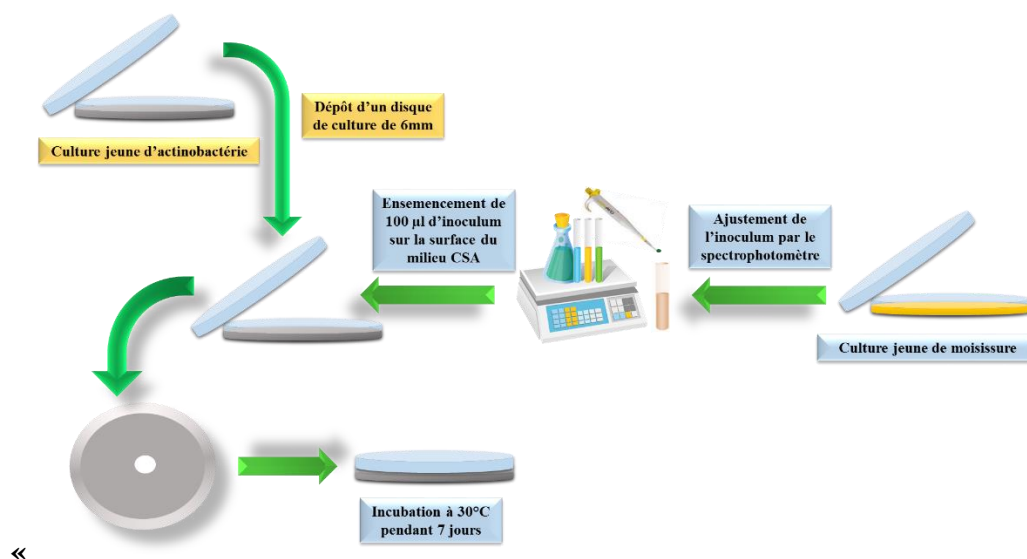


Figure 10. Screening de l'activité antifongique.

I.1.5. Identification génétique des souches

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

I.1.6. 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. Préparation de la biomasse

Un volume de 0.5ml est prélevé à partir des cultures sur milieu Gym puis porté dans des tubes a eppendorf de 1.5ml suivi d'une centrifugation pendant 2min a 11000rpm afin de séparer les cellules bactériennes du milieu de culture. Le surnageant est ensuite éliminé, un volume de 400µl de Lysis Buffer P et 20 µl de protéinase K sont ajouté au kilo suivi d'une

homogénéisation par le pistil. Les tubes à eppendorf sont enfin mixés par le vortex et incubé à 65°C sous agitation pendant 30 minutes.

b. Filtration et séparation de l'ADN des autres débris cellulaire

Après l'insertion des préfiltre vert dans les tube jaune à 1.5ml, la solution de lyse est transfert dans ces préfiltre suivi d'une centrifugation pendant 1 minute a 11000 rpm. Une fois la centrifugation est achevée, les préfiltres sont éliminés.

c. Fixation de l'ADN sur la colonne

Afin de fixer l'ADN sur la colonne, un volume de 200µl 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 jaune 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.

d. Nettoyage de l'ADN des impuretés

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

e. Elution de l'ADN de la colonne

Les préfiltres jaunes sont placés dans des tubes blancs de 1.5ml, puis un volume de 30µl 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 a 4°C.

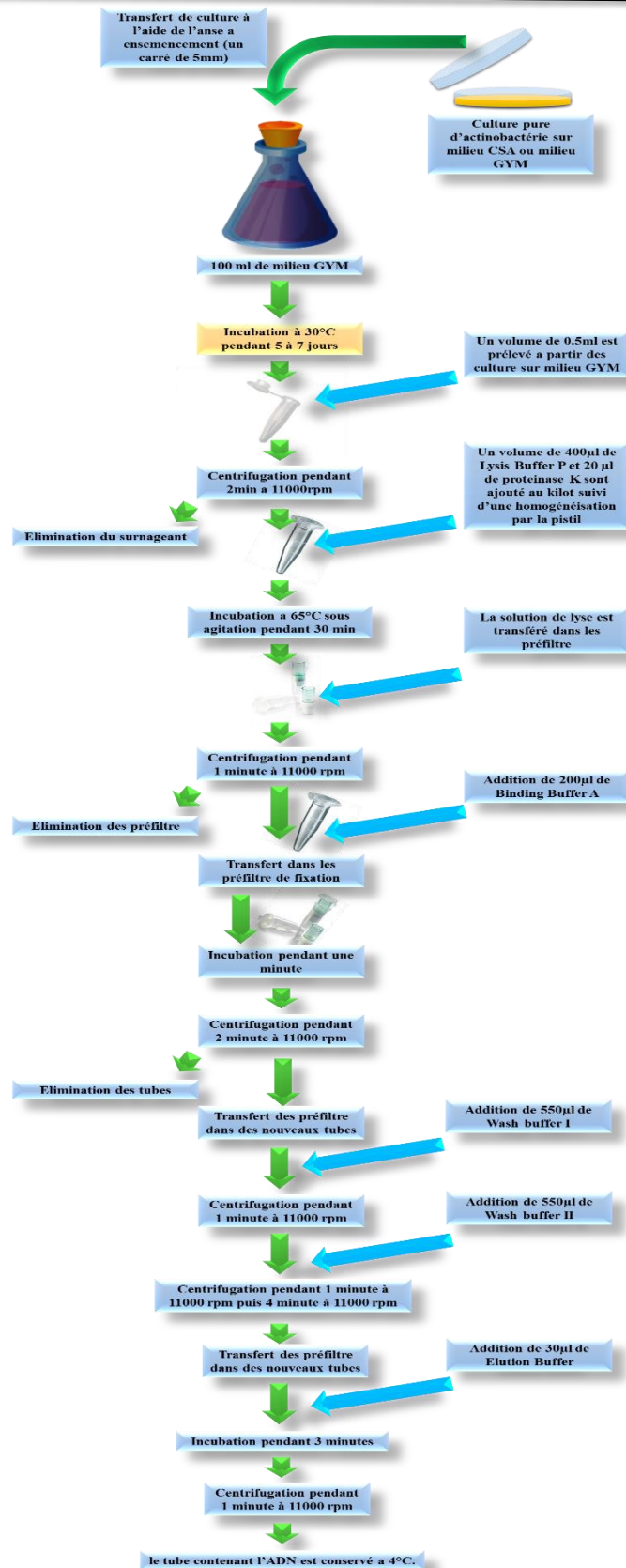


Figure 11. Extraction de l'ADN bactérien

I.1.7. Vérification 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 µl de la solution de révélation marqueur est additionné à 2 µl de la solution d'ADN marqueur, ce mélange est bien mélangé et est déposé dans le premier puits de la plaque sert de contrôle.

Pour chaque solution d'ADN préparée précédemment, 2 µl est prélevé et mélangé avec 2 µl 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.

I.1.8. 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 µl d'ADN précédemment extrait est porté dans des tubes à PCR sur le quel est ajouté 49 µl de solution à PCR (25 µl de JSRM, 2 µl Forward primer, 2 µl reverse primer et 20 µl 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'au lendemain.

I.1.9. Purification de l'ADN amplifié

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

a. 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 µl d'ADN amplifié plus 100 µl Buffer NTII). La solution est laissée à température ambiante pendant 2 min.

b. Fixation de l'ADN

La solution est transférée dans des NucleoSpin et PCR Clean-up Column inséré 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.

c. 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.

d. 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.

e. 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.

I.1.10. 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.

I.1.11. Le séquençage de l'ADN amplifié

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

I.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.

I.4.1. 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. selon la figure suivante(12.).

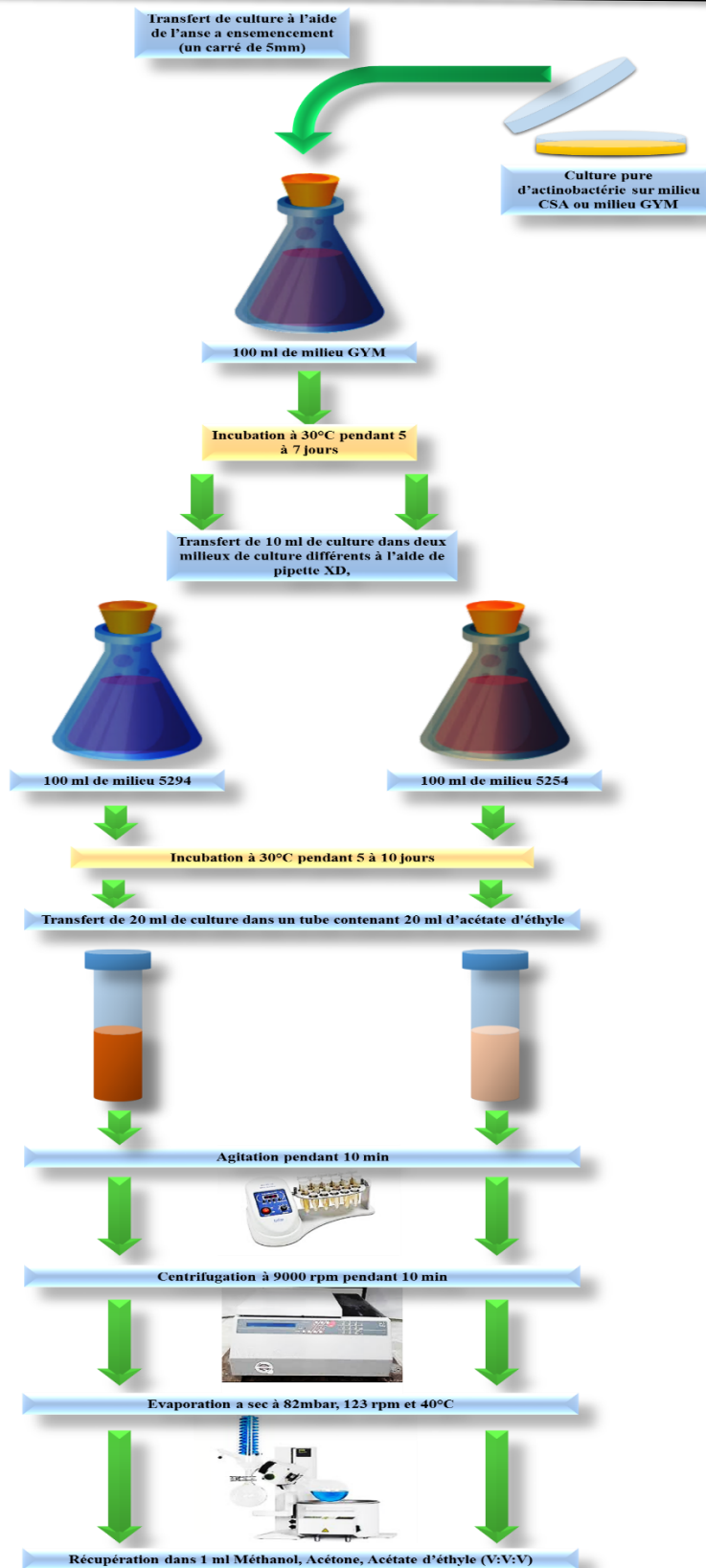


Figure12 :Extraction des métabolites secondaires

I.5. Mesure de l'activité antioxydant

I.5.1 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)**

a.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.

b.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,

c.Calcul des pourcentages d'inhibition :

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

$$\% \text{ PR du DPPH} = [((\text{DO cont à } t_0) - (\text{DO éch à } t \text{ 30 min})) / (\text{DO cont à } t_0)] \times 100$$

- % 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.

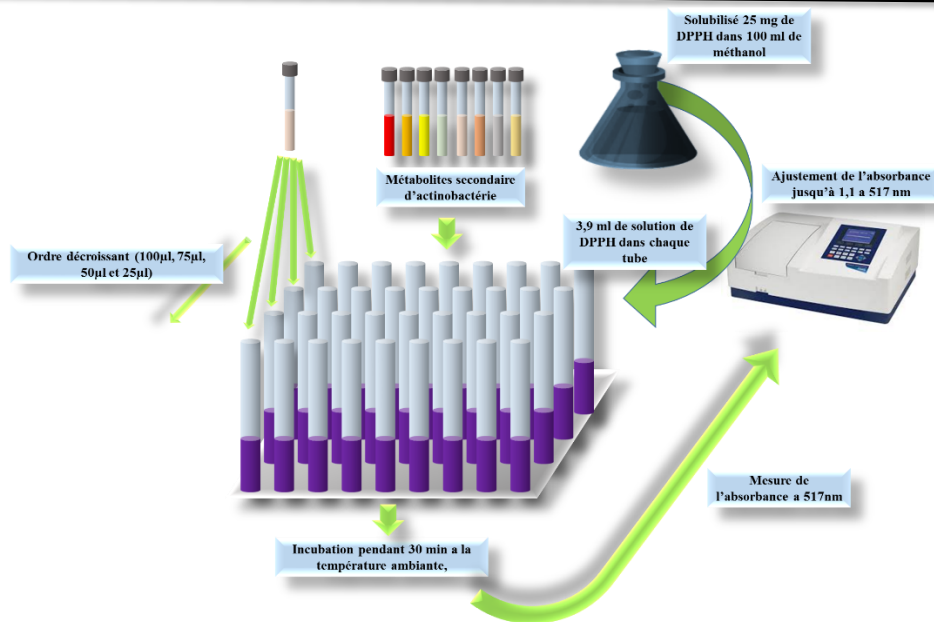


Figure 13. Mesure de l'activité antioxydant par DPPH.

I.5.2. Mesure de l'activité antioxydant par ABTS

a.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**).

b. 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 µl 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⁺ :

$$\% \text{ PR du ABTS} = [((\text{DO cont à } t_0) - (\text{DO éch à } t_7 \text{ min})) / (\text{DO cont à } t_0)] \times 100$$

- % 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.

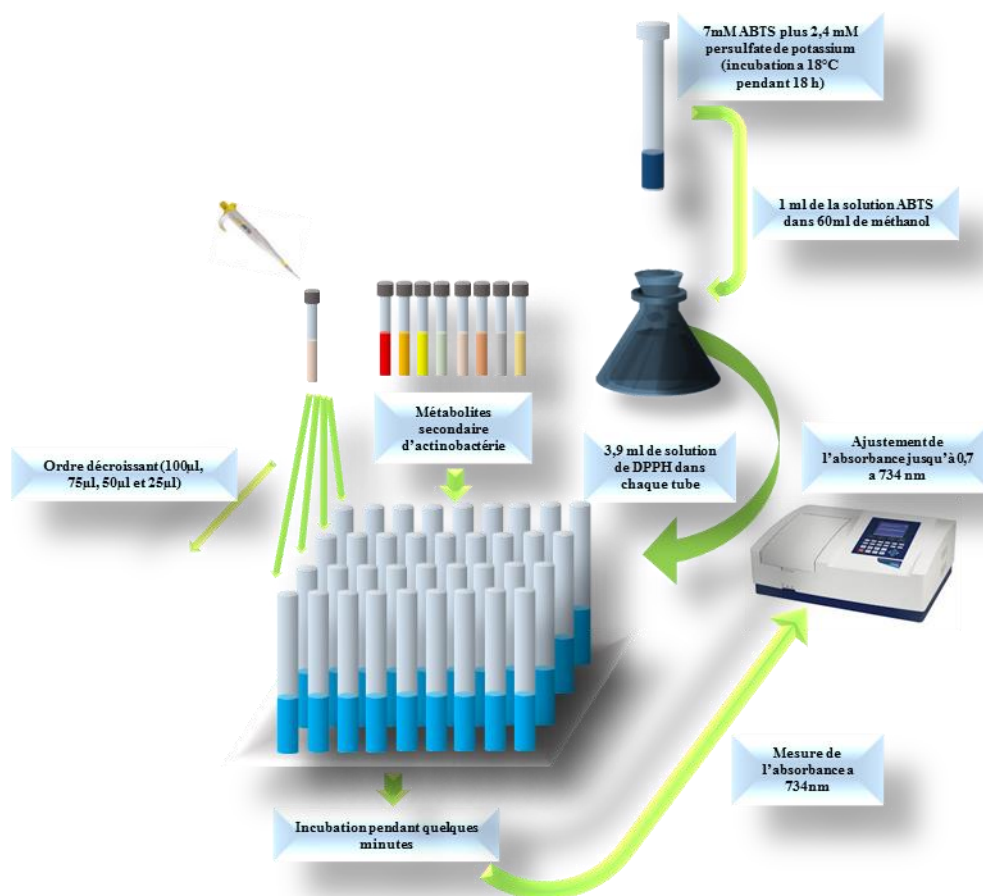


Figure 14. Mesure de l'activité antioxydant par ABTS.

Résultat et discussion

II. Résultats et discussion

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 et CSA). 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 d'échantillons du sol sont présentés dans les photos 1.

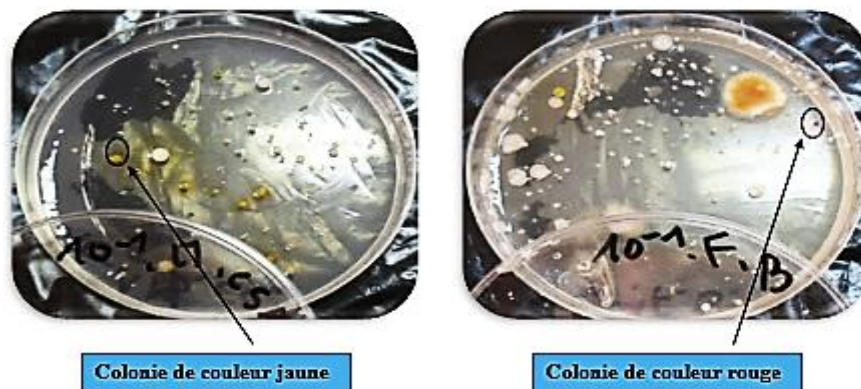


Photo 1 Les souches des Actinomycètes isolés à partir du sol (**Photo originale, 2018**).

Un totale de sept colonies d'Actinobactéries sont isolées à partir des sols de la région d'El Hsasna. Le choix des colonies est basé sur la couleur et l'aspect de ces dernières après leur purification. L'aspect macroscopique des isolats est différent. La forme des colonies est différente aussi (photo2) : colonies bombées, aplatie, ...etc. sont tous incrustées dans la gélose, possédant un mycélium végétatif surmonté d'un mycélium aérien de couleurs différentes (jaune, blanche, marron...etc.), parfois le mycélium aérien est absent .



Photo 2. Aspect des 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) par l’utilisation de trois amorces universelles à savoir : F27, R518 et R1525. Les résultats reçus ont été traités par Geneious V10 et Mega 7 software. (Le tableau 9) regroupe le nom des espèces après leurs identifications génétiques.

Tableau 9. Nom de souches bactériennes après identification moléculaire.

Code de la souche	Espèce bactérienne après identification par ARN 16S
F2	<i>Streptomyces lasiicapitis</i>
M3	<i>Streptomyces flavofungini</i>
M4	<i>Streptomyces silaceus</i>
M5	<i>Streptomyces alfalfae</i>
M7	<i>Streptomyces alboflavus</i>

II.3. Résultats de l’activité antifongique des extraits bactériens

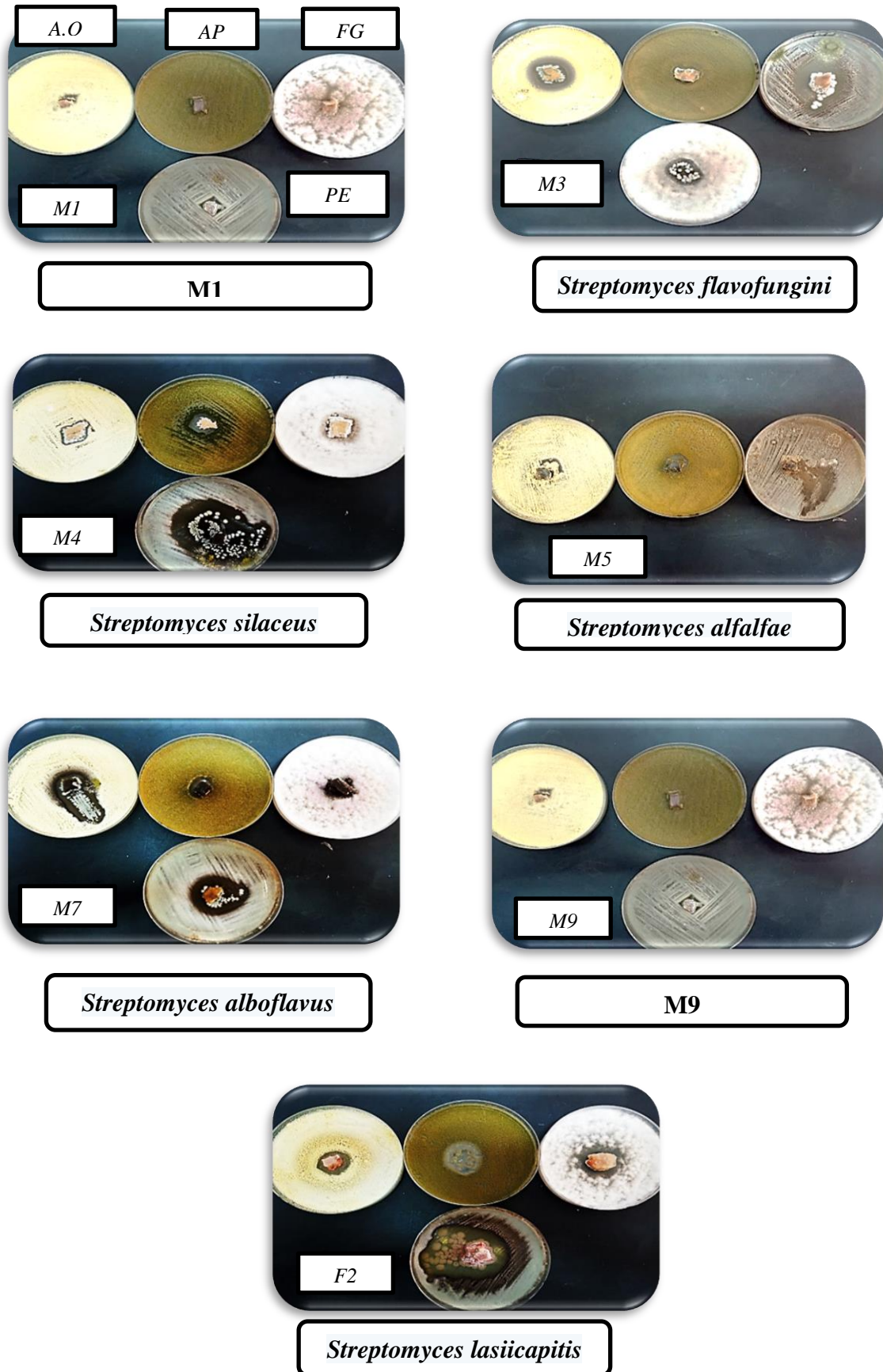


Figure 15 . Résultats de l'activité antifongique des extraits bactériens

Tableau 10. Résultats du screening de l'activité antifongiques des souches isolées de la région de El Hsasna

Les souches bactériennes	Les souches fongiques	% de l'activité	Qualité de l'activité
<i>Streptomyces lasiicapitis</i>	AP	10.75 %	+++
	AO	5.97 %	+
	PE	10.38 %	+++
	FO	30.86 %	+++
M1	AP	0%	-
	AO	0%	-
	PE	0%	-
	FO	0%	-
<i>Streptomyces flavofungini</i>	AP	0%	-
	AO	5.97 %	+
	PE	30.86 %	+++
	F	6.53 %	+
<i>Streptomyces silaceus</i>	AP	4.45 %	+
	AO	5.97 %	+
	PE	34.02 %	+++
	F	4 %	+
<i>Streptomyces alfalfae</i>	AP	0%	-
	AO	0%	-
	PE	0%	-
	F	0%	-
<i>Streptomyces alboflavus</i>	AP	0%	-
	AO	14.27 %	+++
	PE	17.36 %	+++
	F	0%	-
M9	AP	0%	-
	AO	0%	-
	PE	0%	-
	F	0%	-

Fusarium graminearum, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium expansum*

- ✓ Selon les résultats affichés sur la photo et le tableau, la souche *Streptomyces lasiicapiti* enregistre une bonne activité antifongique contre *P. expansum*, *A. parasiticus* et *F. graminearum* avec un pourcentage d'inhibition de 10.38 %, 10.75 % et 30.86 % respectivement. *A. ochraceus* est apparu sensible avec un pourcentage d'inhibition de 5.97 % qui reflète une activité moyenne (tableau).
- ✓ Suivant les résultats affichés sur le tableau et la photo, la souche M1 a enregistré une Faible activité antifongique contre *F. graminearum*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus* et *P. expansum*.

- ✓ Selon les résultats affichés sur le tableau et la photo, la souche *Streptomyces flavofungini* a enregistré une bonne activité antifongique contre *P. expansum* avec un pourcentage d'inhibition de 30.86%, *A. parasiticus*, est apparue très résistante à la souche *Streptomyces flavofungini* avec un pourcentage d'inhibition nul (tableau).
- ✓ les résultats affichés sur le tableau et la photo, la souche *Streptomyces silaceus* a enregistré une bonne activité antifongique contre *P. expansum* avec un pourcentage d'inhibition de 34.02 %, ce qui reflète selon le tableau une très bonne activité antifongique. Les trois souches fongiques à savoir *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *F. graminearum* enregistrent une activité moyenne avec la souche *Streptomyces silaceus* avec un pourcentage d'inhibition de 5.97%, 4.45%, 4% respectivement (tableau).
- ✓ Selon les résultats affichés sur le tableau et la photo, la souche *Streptomyces alfalfae* a enregistré une faible activité antifongique contre *F. graminearum*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus* et *P. expansum* sont apparues très résistantes à cet extrait avec un pourcentage d'inhibition nul (tableau)
- ✓ Suivant les résultats affichés sur le tableau et la photo, la souche *Streptomyces alboflavus* a enregistré une bonne activité antifongique contre *P. expansum* et *A. ochraceus* avec un pourcentage d'inhibition de 17.36 %, 14.27 % et *A. parasiticus* et *F. graminearum* sont apparues très résistantes avec un pourcentage d'inhibition nul (tableau)
- ✓ Les résultats affichés sur la figure dévoilent que les quatre souches fongiques à savoir : *A. flavus*, *A. parasiticus*, *F. graminearum*, *P. expansum* sont très résistantes à la souche M9 avec un pourcentage d'inhibition nul (tableau).

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

D'après ces résultats obtenus l'extrait brut de l'isolat *Streptomyces silaceus* présente le pourcentage d'inhibition le plus élevée avec 97,43 % suivi les extraits des souches *Streptomyces flavofungini*, *Streptomyces alfalfae*, *Streptomyces alboflavus* et *Streptomyces lasiicapitis* avec des pourcentage d'inhibition de 95,92%, 95,86% , 40,10 % et 33,89% respectivement.

Le dosage ABTS est aussi une des méthodes utilisées pour tester l'activité radicalaire des substances bioactives (Elmastas et al., 2007). Ce radical présente une absorbance caractéristique à 430 nm et une couleur bleu nuit qui devient incolore après sa réduction. La capacité des antioxydants présents dans le milieu est proportionnelle à l'intensité de la couleur. Les valeurs dans la figure ont été obtenues en calculant des pourcentages d'inhibition (PI%) de deux expériences et exprimées en pourcentage d'inhibition (PI%) en se référant à la courbe d'étalonnage. D'après ces résultats la souche *Streptomyces flavofungini* présente le pourcentage d'inhibition le plus élevé avec 41,36 % suivi des souches *Streptomyces alfalfae*, *Streptomyces silaceus* et *Streptomyces alboflavus* avec des pourcentages de 28,18% , 25,45% et 14,55% puis l'extrait de l'isolat *Streptomyces lasiicapitis* avec le plus faible pourcentage d'inhibition à savoir 4,82%.

II.4 Discussion

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 forêt ont été déjà identifiées. Les sept souches isolées des sols forestiers de la région de El Hsasna et après l'identification moléculaire sont *Streptomyces lasiicapitis*, *Streptomyces flavofungini*, *Streptomyces silaceus*, *Streptomyces silaceus*, *Streptomyces alboflavus*. Parmi ces souches *Streptomyces lasiicapitis*, *Streptomyces*

flavofungini, *Streptomyces silaceus*, *Streptomyces silaceus*, *Streptomyces alboflavus* possèdent une activité antifongique et antioxydant cette activité antifongique est due par la méthode Cylendre.

Nos résultats indiquent que parmi les sept souches d'actinomycètes isolées des sols forestières (Commune de Saïda), certaines ont montré une nette performance à produire des molécules douées d'une activité antifongique. Nous constatons que les quatre souches *Streptomyces lasiicapitis* ; *Streptomyces flavofungini* ; *Streptomyces silaceus* ; *Streptomyces alboflavus* ont montré une bonne activité contre la totalité des souches fongiques testées. Par contre, la souche *Streptomyces alfalfae* ne présente aucune activité antifongique contre les souches fongique sélectionnées.

Certaines études publiées ont déjà démontré l'activité antifongique des deux souches à savoir : *Streptomyces fulvissimus* et *Streptomyces kasugaensis* contre d'autre champignons pathogènes. **Kanini et al., (2013)** ont démontré qu'un total de 605 isolats *Streptomyces* provenant de 12 habitats grecs divers ont été criblés pour une activité antifongique contre *Rhizoctonia solani* DSM843. Les données obtenues ont démontré que les isolats *Streptomyces pseudovenezuelae* et *Streptomyces fulvissimus* ont présenté la plus grande activité antagoniste. *Streptomyces kasugaensis* est un microorganisme antagoniste isolé des sols et présente une forte activité antifongique contre les agents pathogènes fongiques tels que *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium cucumerium* ou *Botrytis cineria* (Jae et al., 2001). L'activité antifongique du *streptomyces kasugaensis* a été étudiée, les résultats ont montré que les substances bioactive (Kasugamycine), générée par *S. kasugaensis* inhibent les croissances de champignon pathogènes (**Shinji, 2004**).

Le degré de l'activité antifongique dépend de la composition de l'extrait. Plusieurs chercheurs ont déjà signalé que l'activité antimicrobienne est variable chez les actinomycètes. (**Prapagdee et al.,2008**) a trouvé que sur 146 souches d'actinomycètes indigènes isolées des sols, seulement 10 souches présentaient une activité antifongique. (**Khamna et al. ,2009**) ont isolé 396 souches du genre *Streptomyces* et seulement 27 souches ont montré une activité antifongique. (**Bharti et 51al.,2010**) ont obtenu 316 souches d'actinomycètes de différents échantillons de sols, dont 31% ont présenté une activité antifongique.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Les actinomycètes sont des procaryotes les plus économiquement et bio-technologiquement précieux, responsables de la production d'environ la moitié des métabolites secondaires bioactifs découverts, y compris les anti-tumoraux, les agents immunosuppresseurs et les antibiotiques. Les actinomycètes sont largement distribués dans les sols et autres milieux terrestres et marins, où ils ont joué un rôle écologique important dans le renouvellement des éléments nutritifs du sol.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité antifongique des métabolismes secondaires produits par des actinomycètes isolés des sols Alhasna de la région de Saïda contre des moisissures toxigènes. Selon les résultats dévoilés précédemment, nous concluons que l'extrait résultant des souches *Streptomyces flavofungini* et *Streptomyces silaceus* possèdent une importante activité contre les souches fongiques sélectionnées du a la présence de substance bioactive. L'extrait provenant des souches M9 et M1 ne possèdent aucune activité antifongique du a la résistance des souches fongiques ou l'absence de substances bioactives contre ces moisissures. Dans le cadre de recherche de métabolites secondaires bioactifs des actinomycètes, ainsi que la mise en évidence de leurs activités antifongique et antioxydant.

L'étude de l'activité antioxydant des sept extraits bruts par la méthode du piégeage des radicaux libres DPPH et ABTS,; a révélé une meilleurs activité antioxydant de l'extrait *Streptomyces flavofungini* avec un pourcentage d'inhibition 95.92 et 41.36 respectivement,

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

Comme perspectives, cette étude doit être complétée par les points manquants suivant

- Identification des substances bioactive des extraits par HPLC-MS,
- l'étude de l'activité antibacterienne des extraits

Références

Bibliographique

Références bibliographique :

A

1. **Alharbi, N.S. (2016).** Novel Bioactive Molecules from Marine Actinomycetes . Biosciences Biotechnology Research Asia , 13(4) , 1905-1927.
2. **Asolkar, R.N., Kirkland , T.N., Jensen , P.R., Fenical , W.** Arenimycin . (2010). An antibiotic effective against rifampin –and methicillin-resistant staphylococcus aureus from the marine actinomycete *Salinispora aericola*. J .Antibiot., (Tokyo), 63 :37-9.

B

3. **-Balagurunatha R., Radhakrishnon M., Somasundarom S.T. 2010.** L-glutaminase Producing Actinomycetes from marine sediments-selective isolation, semi quantitative assay and characterization of potential strain. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 4: 698-705.
4. **Baldacci, E. (1962).** Tendances actuelles de la classification des actinomycètes. *Ann Soc. Mariat F. et Sebald M. (1990).* Actinomycetes In :Bactériologie Medicale. Le Minor L. et véron M. 2éme édition, Flammarion. Paris. 935-949.
5. **-Baniyadi F., Shahidi G.H., Karimi Nik A. 2009.** In Vitro Petroleum Decomposition by Actinomycetes Isolated from Petroleum Contaminated Soils. *American-Eurasian. Journal of Agricultural and Environmental Science*. 6: 268-270.
6. **Barka EA., Vatsa P., Sanchez L., Gaveau-Vaillant N., Jacquard C., Klenk H-P., Clément C., Ouhdouch Y., Van Wezel GP. (2016).** Taxonomy , physiology , and , natural products of actinobacteria . *Microbiol .Mol. Biol. Rev.* (80) :1-43 .
7. **Bastide A., M. de Méo, M. Andriantsoa, M. Laget & G. Duménil., (1986).** Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques de structure non-polyénique mircen J. 2 : 453-466.
8. **Belyagoubi L. (2014).** Antibiotiques prouduits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactique) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. Thèse de Doctorat en Biologie, Soutenue le 26 Juin 2014, Université Aboubaker Belkaid-Tlemcen.
9. **Belyagoubi, L.(2014)** Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. Th. doctorat : biologie :Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen.
10. **Ben Ameer Mehdi, R., S. Sioud, L. Fourati Ben Fguira, S. Bejar, et L. Mellouli.2006.** Purification and structure determination of four bioactive molecules from a newly isolated *Streptomyces* sp. TN.97 strain. *Process Biochem.* 41: 1506-1513.
11. **Bharti A, Kumar V, Gusain O, Bisht GS. (2010).** Antifungal Activity of Actinomycetes isolated from Garhwal Region. *J. Sci. Eng. Technol. Manag.*, 2(2) : 3-9.
12. **Boman, H. G. (1998).** Gene-Encoded Peptide Antibiotics and the Concept of Innate : An Update Review. *Scand J Immunol*, 48(1):15–25.
13. **Bulter, M. J., P. Bruheim, S. Jovetic, F. Marinelli, P. W. Postma et M. J. Bibb.2002.** Engineering of primary carbon metabolism for improved antibiotic production in *Streptomyces lividans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(10): 4731-4739.

Ƨ

14. Carle S., Pharm B. 2003. Les antifongiques dans le traitement des infections invasives. *Pharmactuel*. 36: 25-41.
15. Choulet. F. (2006). Evolution du génome des Streptomyces : transfert horizontal et variabilité des extrémités chromosomiques. Thèse de Doctorat. Université Henri Poincaré, Nancy 1, pp 210.
16. Colombié. V. (2005). Description de la production de spiramycine par Streptomyces ambofaciens. Modélisation métabolique, simulation et capteurlogiciel. Thèse de Doctorat. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse. pp174.
17. Conn. V.M. (2005). Molecular Interactions of Endophytic Actinobacteria in Wheat and Arabidopsis. Thèse de Doctorat. Flinders University. pp 297.
18. Crawford, D. L. J. M. Lynch, J. M. Whipps, M. A. Ousley. 1993. Isolation of actinomycetes antagonists of a fungal root pathogen. *App. Environ. Microbiol.* 59: 3899-3905.

Ɖ

19. -Desjardin V. 2002. Réduction du chrome (VI) par la souche *Streptomyces thermocarboxydus* NH50 isolée à partir d'un sol pollué. Thèse de Doctorat en Sciences techniques du déchet. 247p
20. Dommergues Y., Mangenot F. 1970. Ecologie microbienne du sol, Masson et Cie. France.

Ɛ

21. Errakhi R, Bouteau F, Lebrihi A, Barakate M (2007). Evidences of biological control capacities of Streptomyces spp. against Sclerotium rolfsii responsible for damping-off disease in sugar beet (Beta vulgaris L.). *World J. Microb. Biot.* 23 :1503-1509.
- 22.

Ƒ

23. Fukunagak K., Misatot T., Asakawa M. Blastocidin, A new Anti-Phytopathogenic Fungal Substance. Part I. *Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan*. 19: 181-188.

24.

ƒ

25. Gao B., Gupta RS. (2012) . Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum Actinobacteria . *Microbiol. Mol . Biol . Reviews* 76(1) : 66-112.
26. -Gazenko S. V., Reponen T. A., Grinshpun S. A., Willeke K. 1998. Analysis of airborne actinomycete spores with fluorigenic substrates. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 4410-4415.
27. Goodfellow, M. et S. T. Williams. 1983. Ecology of the actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* 37: 189-216.
28. -Grandhimathi R., Arunkumar M., Selvin J., Thangavelu T., Sivaramakrishnen S., Kiran G.S. et al., 2007. Potentiel antimicrobien d'actinomycètes marins associés aux éponges. *Journal of Medical Mycology*. 18: 16-22.

H

29. **-Haslay C., Leclerc H. 1993.** Microbiologie des eaux d'alimentation. Lavoisier TEC & DOC. France.
30. **Higashide, E. 1995.** Screening of new antibiotics produced by actinomycetes and their production. *Actinomycetol.* **09** (1): 75-82.
31. **Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A., Ezekowitz, R.A. (1999).** Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity. *Science*, 254(5418): 1313–8.
32. **Hopp U., Baltensweiler J. (2009).** Mycoses-Mycoses cutanées-Candidoses-Moniliases ou
33. **-Hwang B.K., Lim S.W., Kim B.S., Lee J.Y., Moon S.S. 2001.** Isolation In Vivo and In Vitro of Antifungal Activity of Phenylacetic Acid and Sodium Phenylacetate from *Streptomyces humidis*. *Applied and Environmental Microbiology.* **67**: 3739-3745.
- 34.

I

35. **Igarashi, I. 2004.** Screening of novel bioactive compounds from plant-associated actinomycetes. *Actinomycetol.* **18** (2): 63-66.
36. **-Inoue O. O., Netto W., S., Padilla G., Facciotti M.C.R. 2007.** Carbon catabolite repression of retamycin production by *Streptomyces olindensis* ICB20. *Brazilian Journal of Microbiology.* **38**: 58-61.

J

37. **Jensen PR , Williams PG, Oh DC ,Zeigler L, Fenical W. (2007) .** Species –specific secondary metabolite production in marine actinomycetes of the genus salinispora . *Appl Environ Microbiol.* **73**(4) : 1146-52.
38. **Jensen, H.L. (1931).** *Proc. Linnean Soc. N. S. Wales*, 56, 334–370.
39. **-Jinenez J. T., Sturdikova M., Sturdik E. 2009.** Natural products of marine origin and their perspectives in the discovery of new anticancer drugs. *Acta chimica Slovaca.* **2**: 63-74.
40. **Johnson, L. E. et A. Dietz. 1968.** Kalafungin, a new antibiotic produced by *Streptomyces tanashiensis* strain Kala. *Appl. Microbiol.* **16**(12): 1815-1821.
- 41.

K

- Kanini, G. S., Katsifas, E. A., Savvides, A. L., Hatzinikolaou, D. G., & Karagouni, A. D. (2013).** Greek indigenous streptomyces as biocontrol agents against the soil-borne fungal plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Journal of applied microbiology*, **114**(5), 1468-1479.
42. **Khamna S, Yokota A, Peberdy JF, Lumyong S (2009).** Antifungal activity of *Streptomyces* spp. isolated from rhizosphere of Thai medicinal plants. *Int. J. Integr. Biol.*, **6**(3): 143-147.
43. **-Khamna S., Yokota A., Peberdy J.F., Lumyong S. 2010.** Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces sp* isolated from some Thai medicinal plant rhizospheres soil. *EurAsian Journal of BioSciences.***4**: 23-32.

44. **Kieser, T., M. J. Bibb, M. j. Dutnner, K. F. Chater et D. A. Hopwood. 2000.** General introduction to actinomycete biologie in practical Streptomyces genetics. The John Innes Foundation, Crowes, Norwich, England. 1-21.
45. **-Kitouni M., Boudemagh A., Oulmi L., Reghioua S., Boughachiche F., Zerizer H et al., 2005.** Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north-east of Algeria. *Journal of Medical Mycology*. **15: 45-51.**

L

46. **-Leveau J. Y., Bouix M.1993.** Microbiologie industrielle. Ch 6: **425-481.**
47. Lieske, R., (1921). Morphologie und Biologie der Strahlenpilze, Lipsia.
48. **Liu S., Liu S. Y., Lu Z. X. 2007.** Antibacterial activity and property of the fermentation product of marine *Streptomyces* sp GB-2. *Chinese Journal of Biotechnology*. **23: 1077-1081**
49. **Llic, S. B., S. S. Konstantinovic, Z. B. Todorovic, M. L. Lazic, V. B. Veljkovic, N.Jokovic, et B. C. Radovanovic. 2007.** Characterization and antimicrobial activity of the bioactive metabolites in streptomycetes isolates. *Microbiol*. **76:421-428**

M

50. **Maloney ,K.N . , Macmillan , J.B ., Kauffman , C.A., Jensen , P.R., Dipasquale .A.G., Rheingold , A.L., Fenical, W.(2009) .**Lodopyridone , a structurally unpercedented alkaloid from a marine actinomycete . *Organic letters*,11(23) :5422-5424.
51. **-Mazodier J. 1974.** Sociétés industrielles et dechets solides. *Sciences et Vie*. **106: 109-115.**
52. **Mc Neil MM ., Brown JM .,Jarvis WR. , Ajello L . (1990) .** Comparison of species distribution and antimicrobial susceptibility of aerobic actinomycetes from clinical specimens. *ReV. Infect. Dis.* (12) : 778-783.
53. Monilioses,causes et facteurs de risque.France. figr.
54. **-Mukai A., Fukai T., Matsumoto Y., Ishakawa J., Hoshino Y., Yazawa K et al., 2006.** Transvalencin Z, a new antimicrobial compound with salicylic acid residue from *Nocardia transvalensis* IFM 10065. *The Journal of Antibiotics*. **59: 366-9.**
- 55.

N

56. **Nissen-Meyer, J., Nes, I. F.(1997).** Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Arch Microbiol*, 167(2-3): 67–77.

O

57. **-Omura S., Iwai Y., Takahashi Y., Sadakane N., Nakagawa A., Oiwa H et al., 2006.** Herbimycine, a new antibiotics produced by a strain of *Streptomyces*. *The journal of Antibiotics*. **32: 255-261.**
58. **Onaka, H. 2006.** Biosynthesis of heterocyclic antibiotics in actinomycetes and an approach to synthesize the natural compounds. *Actinomycetol*. **20(2): 62-71.**
- 59.

P

- 60. Park. J.O; El-Tarabily. K.A; Ghisalberti. E.L; and Sivasithamparam. K. (2002).** Pathogenesis of *Streptovorticillium albireticuli* on *Caenorhabditis elegans* and its antagonism to soil-borne fungal pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 35: 361–365.
- 61. Prapagdee B, Kuekulvong C, Mongkolsuk S (2008).** Antifungal Potential of Extracellular Metabolites Produced by *Streptomyces hygroscopicus* against Phytopathogenic Fungi. *Int. J. Boil. Sci.*, 4(5): 330-337. 2842 *Afr. J. Agric. Res.*
- 62. Pridham, T. G. Colour and streptomycetes. 1965.** Report of an international workshop on determination of colour of streptomycetes. *Appl. Microbiol.* 13: 43-
- 63. -Pullen C., Schmitz P., Meuer K., Bamberg D. D., Lohman S., De Castro França S et al., 2002.** New and bioactive compounds from *Streptomyces* strain residing in the wood of Celastraceae. *Planta*. **16: 162-167.**



- 64. Rossi-Doria, T. (1891).** *Ann. Igiene Sper. Roma*, 1 (n.s.), 339–428.



- 65. Sabaou N., Boudjella H., Bendji A., Mostefaoui A., Zitouni A., Lamari L et al., 1998.** Les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes rares producteurs d'antibiotiques d'antibiotiques. *Secheresse*. **9: 147-153.**
- 66. Schmitzer P.R., Graupner R.R., Chapin E.L., Fields S.C., Gilbert J.R., Gray J.A et al., 2000.** Ribofuranosyl Adenylosuccinate Synthetase Following Phosphorylation. *Natural Products*. **63: 777-781.**
- 67. Sheng, Q., L.Jie, C. Hua-Hong, Z. Guo-Zhen, Z. Wen-Yong, J. Cheng-Lin, X. Li-Hua et l. Wen-Jun. 2013.** Isolation, diversity and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China. *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (19): 6176-6186.
- 68. -Simon P., Meunier R. 1970.** *Microbiologie industrielle et genie biochimique.* Masson ETC editions. France.
- 69. Singh. S.L; Baruah. I; and Bora. T.C. (2006).** Actinomycetes of lake Loktat Habitat: Isolation and screening for Antimicrobial Activities. *Biotechnol*, 5 (2),217-221.
- 70. Stevenson, I. I. 1956.** Antibiotic activity of actinomycetes in soil and their controlling effects on root-rot of wheat. *J. Gen. Microbiol.* **14: 440-448.**
- 71. -Sturdikova M., Sturdik E. 2009.** Natural products of marine origin and their perspectives in the discovery of new anticancer. *Acta Chgimica Slovaca*. **2 : 63-74.**
- 72. Subrabani, R. et W. Aalbersberg. 2012.** Marine actinomycetes : an ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiol. Res.* **167 (10): 571-580.**
- 73. Sullivan DC., Chapman SW. (2010) .** Bacteria that masuerade as fungi : actinomycosis and nocardiosis . *Proc. Am . Thorc. Soc . (7) : 216-221 .*
- 74. Suzuki, K. I. 1993.** Search and discovery of soil microorganisms which produce new bioactive substances: selective isolation of microorganisms and their fermentation products. *Actinomycetol.* **07: 107-109.**



- 75. Takahashi Y., Omura S. 2003.** Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds. *Journal of Genetic Applied Microbiology*. **49: 141-154.**

76. Takahashi Y., Omura S. 2003. Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds. *Journal of Genetic Applied Microbiology*. **49: 141-154.**

77. -Tanaka Y. 1992. Fermentation processes in screening for new bioactive substances, dans «The search for bioactive compounds from microorganisms» **303-325** pp. Springer-Verlag, New York, (Ed).

78. Theilleux J. (1993). Les actinomycètes in : Microbiologie Industrielle, les microorganismes d'intérêt industriel. Lavoisier , Tech et Doc, V 612p, pp

70

79. Vimal, V., B. M. Rajan et K. Kannabira. 2009. Antimicrobial activity of marine actinomycete, *Nocardiopsis* sp. VITSVK 5 (FJ973467). *Asian J. Med. Sci.* **01: 57-63.**

80. Waksman, S.A. (1919). *Soil Sci*, 8: 71–215.

70

81. Williamson N. R., Fineran C. P., Leeper F.j., Salmon P. C. 2006. The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginin. *Nature Microbiology Review*. Vol 4.

Annexe I : Les différents milieux de culture utilisés.➤ **Starch Casein Agar (S.C.A) :**

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
Agar - agar	20.0 g
Eau distillée	1 000 ml

➤ **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

Annexe II : Préparation des différentes solutions utilités.

➤ Préparation de l'eau physiologique

Afin de préparer de l'eau physiologique en mélange 4.5 mg de NaCl dans 500 ml d'eau distillé, en agite bien à l'aide d'une plaque agitatrice. Puis la solution sera autoclave pour qu'elle soit stérile.

➤ Préparation de la solution DPPH

Le DPPH se trouve sous forme de poudre, on le prépare on ajoutant du méthanol.

Une petite quantité de la poudre de DPPH sera suffisante. Après l'ajout du méthanol, on agite bien puis on mesure sans absorbance à la longueur d'onde 517 nm.

L'absorbance de la solution doit être 0.1 donc si on la trouve supérieur on continue à ajouter le méthanol et si on la trouve moins on ajoute de la poudre à fin d'obtenir une absorbance de 0,1.

➤ Préparation de la solution d'ABTS

L'ABTS se trouve sous forme liquide très concentré de couleur blanc, on lui ajoute de K₂S₂O₄ ou la couleur sera changer vers le bleu. Après l'ajout du K₂S₂O₄, on agite bien puis on mesure sans absorbance à la longueur d'onde 734 nm. L'absorbance de la solution doit être 0.1 donc si on la trouve supérieur on continue à ajouter du K₂S₂O₄ et si on la trouve moins on ajoute de l'ABTS à fin d'obtenir une absorbance de 0,1.

Annexes III.

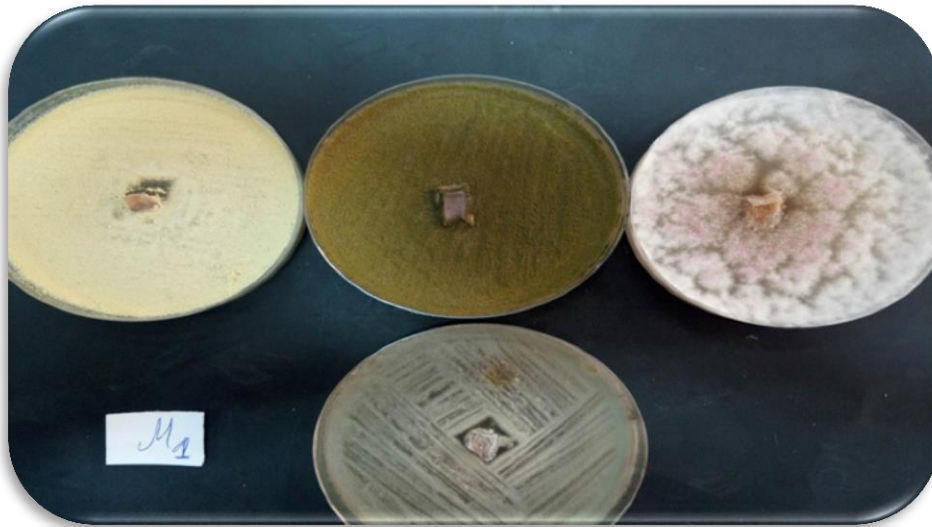


Photo Résultat de l'activité antifongique de l'extrait M1 contre les souches fongiques sélectionnées

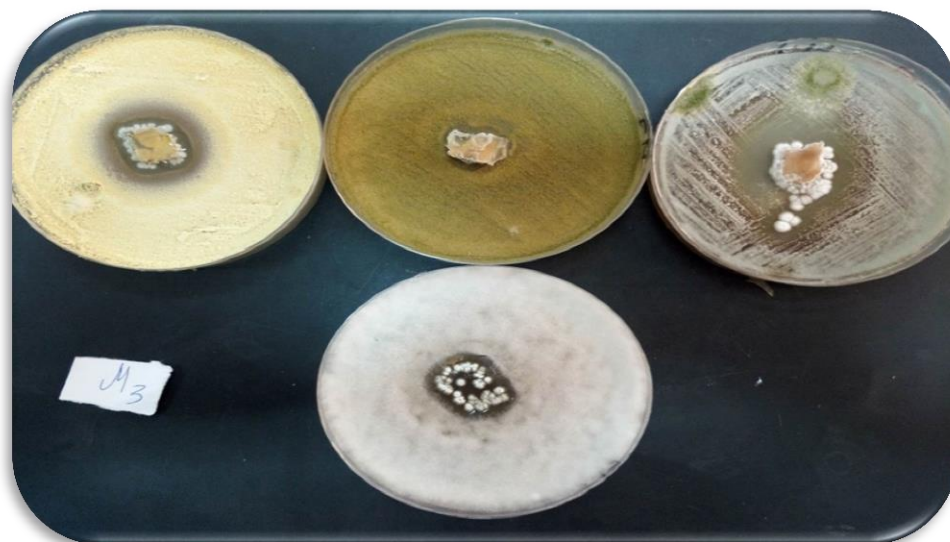


Photo Résultat de l'activité antifongique de l'extrait M3 contre les souches fongiques sélectionnées



Photo Résultat de l'activité antifongique de l'extrait M4 contre les souches fongiques sélectionnées

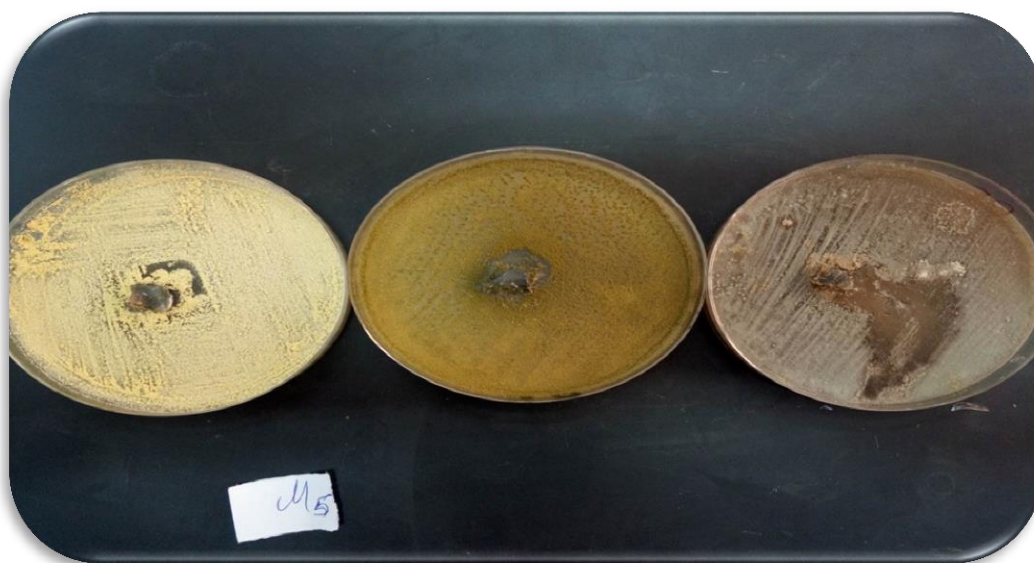


Photo Résultat de l'activité antifongique de l'extrait M5 contre les souches fongiques sélectionnées

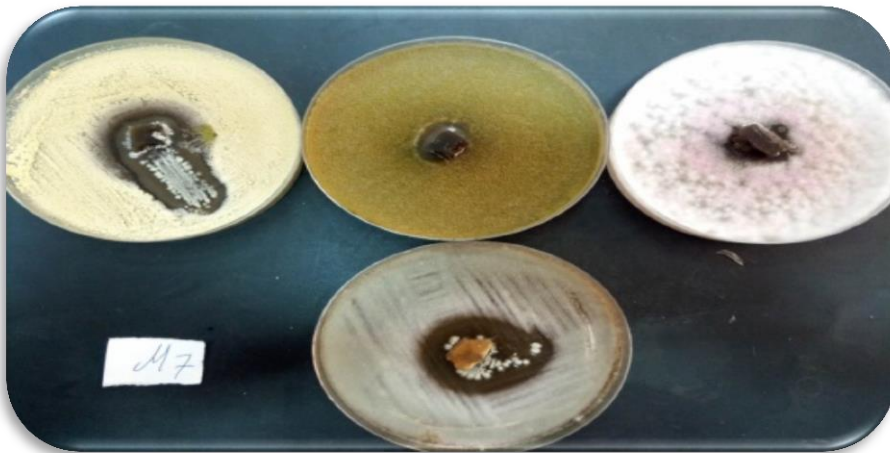


Photo Résultat de l'activité antifongique de l'extrait M5 contre les souches fongiques sélectionnées

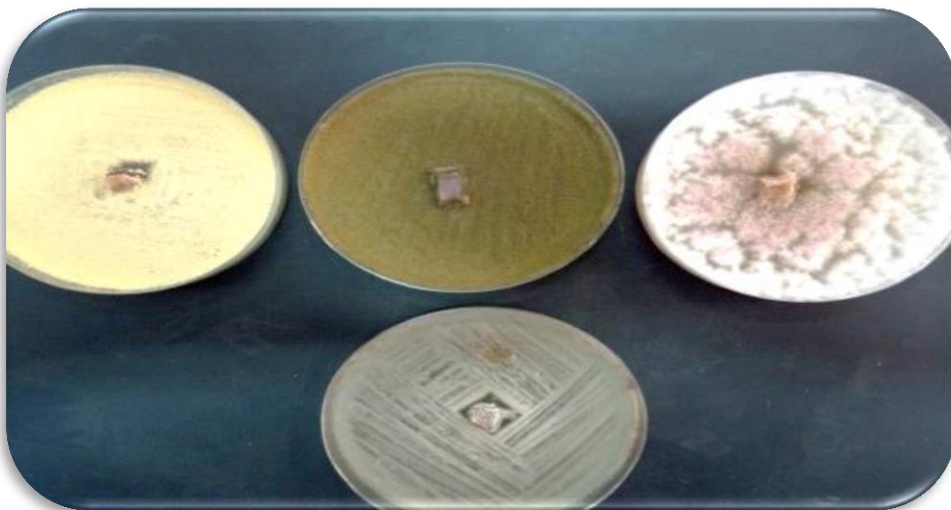


Photo Résultat de l'activité antifongique de l'extrait M9 contre les souches fongiques sélectionnées

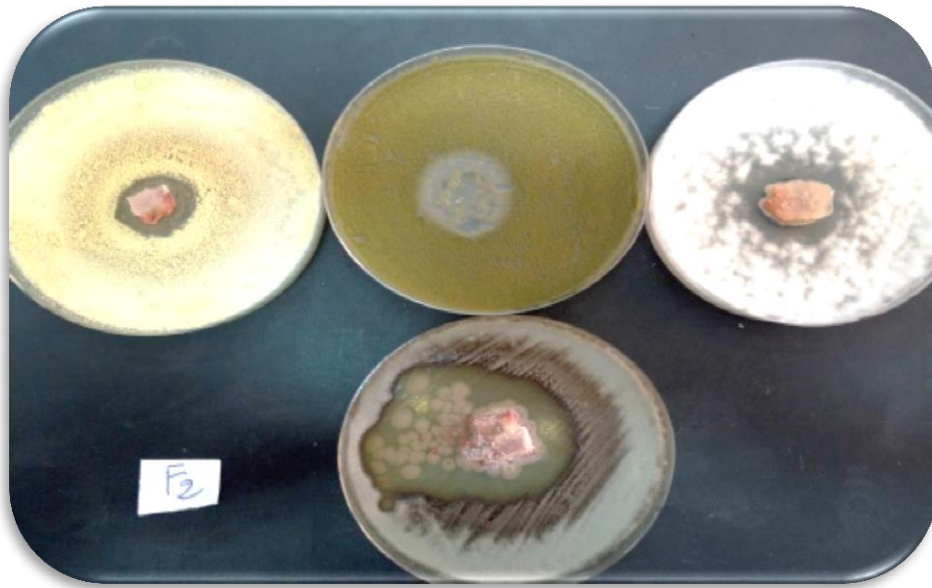


Photo Résultat de l'activité antifongique de l'extrait f2 contre les souches fongiques sélectionnées